

Abschlussbericht

Projekttitle: Entwicklung eines innovativen und umweltfreundlichen Verfahrens zur erstmaligen biotechnologischen Produktion von natürlichem (+)-Nootkaton als Riech- und Aromaduftstoff für die Kosmetik- und Arzneimittelindustrie sowie als Aromastoff für die Lebensmittelindustrie

Aktenzeichen: 13187

Verfasser: Dr. Stefan Marx, N-Zyme BioTec GmbH
Prof. Dr. Ralf G. Berger, Leibniz Universität Hannover
Prof. Dr. Holger Zorn, Justus-Liebig Universität Gießen

Projektbeginn: 01.05.2007

Laufzeit: 28 Monate

Darmstadt, 23.11.2009

1 Projektkennblatt



der

Deutschen Bundesstiftung Umwelt

AZ	13187-32	Referat	Fördersumme	341.230,00
----	-----------------	---------	-------------	-------------------

Antragstitel Entwicklung eines innovativen und umweltfreundlichen Verfahrens zur erstmaligen biotechnologischen Produktion von natürlichem (+)-Nootkaton als Riech- und Aromaduftstoff für die Kosmetik- und Arzneimittelindustrie sowie als Aromastoff für die Lebensmittelindustrie

Stichworte Biokatalyse, Biotechnologie, Downstream-Processing, Verfahren, Mikrobiologie

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
28 Monate	01.05.2007	31.08.2009	2

Zwischenberichte	04.08.2008
------------------	------------

Bewilligungsempfänger N-Zyme BioTec GmbH Riedstr. 7 64295 Darmstadt	Tel	06151-3912772
	Fax	06151-3912779
	Projektleitung	Dr. Stefan Marx
	Bearbeiter	Fr. Maya Andert /Fr. Annika Zocher

Kooperationspartner Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus Liebig Universität Gießen (nach Wechsel von Prof. Zorn)
Döhler GmbH

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Der vorliegende Projektantrag beschreibt ein Verfahren der Weißen Biotechnologie, das die bestehenden Prozesse zur Gewinnung von Nootkaton ersetzt. Nootkaton findet wegen seines intensiven citrusartigen Geruchs breite Anwendung als Riech- und Duftstoff in der Kosmetik- und Arzneimittelindustrie und als Aromastoff für Lebensmittel. Lebensmittelindustrie und verwandte naturstoffverarbeitende Industriezweige produzieren große Volumina von Reststoffströmen, die als Substrate für Bioprozesse dienen können. Neben der angestrebten Senkung des Energie- und Rohstoffverbrauchs steht daher die Minderung des Reststoffaufkommens durch Schließung von Stoffkreisläufen und durch die Verwertung und Veredelung von einzelnen Reststofffraktionen zu vermarktaren Produkten zunehmend im Mittelpunkt des Interesses. Zur Substitution der chemischen Nootkatonsynthese, die mit einer hohen Belastung für Mensch und Umwelt einhergeht, bieten sich biotechnologische Verfahrensalternativen an.

Während des DBU Verbundprojektes BIOL 13053/17 sind Mikroorganismen entdeckt worden, die eine hohe Terpentoleranz aufweisen und supplementierte Terpenkohlenwasserstoffe zu aromawirksamen Folgeprodukten konvertieren können. Dieses offenkundige biochemische Potential soll durch gezielte Prozessentwicklung und Maßstabsvergrößerung für ein industriell anwendbares und modellhaftes Pilotverfahren zur Produktion nutzbar gemacht werden. Die wissenschaftlichen Ziele umfassen die nähere Charakterisierung der einzigartigen enzymatischen Schlüsselaktivitäten sowie die Identifizierung von biochemischen Parametern zur Induktion und Stabilisierung der Enzymaktivität.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Als Prozess- bzw. verfahrenstechnische Ziele lassen sich die Maßstabsvergrößerung mit einem substratadaptierten Produktionsstamm, die Steigerung der Nootkatonausbeute, die Abtrennung und das Recycling von Produkt und Biomasse sowie eine systematische Prozessoptimierung und Produktkonfektionierung formulieren.

Getrocknetes Mycel des essbaren Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* dient als konzentrierter Biokatalysator für die nebenproduktarme Oxidation des Sesquiterpenkohlenwasserstoffs Valencen (aus Orangensaftöl) zu (+)-Nootkaton. Im Labormaßstab liefert das Verfahren die derzeit besten Raum/Zeitausbeuten aller Bioprozesse zur Synthese natürlichen Nootkatons. Als Substrate zur Submerskultivierung des Speisepilzes *P. sapidus* dienen organische Reststoffströme wie Melasse oder Molke und anorganische Salze wie NH_4NO_3 als Stickstoffquelle. Biotransformation und Stofftrennung (DSP) erfolgen unter ressourcenschonenden Bedingungen (Umgebungstemperatur und -druck, neutraler pH-Wert, geschlossene Kreisläufe).

Ergebnisse und Diskussion

Dem Projektantrag lag ein Lösungskonzept aus fünf Arbeitspaketen zugrunde, die zeitlich überlappend innerhalb des akademisch-industriellen Verbundes bearbeitet werden sollten. Während die erste Projekthälfte im Wesentlichen auf die Entwicklung eines ökonomischen Produktions- und Transformationssystem abzielte, sollte innerhalb des zweiten Projektabschnittes die Biotransformationsreaktion und das Downstream-Processing unter ökologischen und ökonomischen Aspekten untersucht und optimiert werden.

Das im ersten Arbeitspaket A zu entwickelnde Produktionssystem für *Pleurotus sapidus* konnte bis in den halbtechnischen Maßstab erfolgreich umgesetzt werden. Neben einem kosteneffizienten Fermentationsmedium konnten wesentliche Prozessgrößen (Schaumbildung, pO_2 , pH) bestimmt werden, so dass eine industrielle Produktion im 2 – 5 m^3 -Maßstab möglich erscheint. Anfänglich auftretende Probleme mit ausgeprägter Schaumbildung während der Fermentation, konnten durch geeignete Antischaummittel verhindert werden, ohne signifikante Einbußen an Biomasse und Aktivität in Kauf nehmen zu müssen. Da weiterhin gezeigt werden konnte, dass die Sauerstoffversorgung von *Pleurotus sapidus* während der Fermentation unkritisch ist, sind keine besonderen Anforderungen an Gasversorgung bzw. Rührertechnik bei der Übertragung des Prozesses auf den industriellen Maßstab zu erwarten. Die Fragmentierung des Myzels der Vorkultur, die im Labormaßstab mit einem Ultra-Turrax-Stab durchgeführt wurde, konnte mit einem Inline-Turrax im Technikumsmaßstab abgebildet werden.

In Arbeitspaket B, welches die Vorbereitung des gewonnenen Pilzmyzels für die Transformation umfasst, wurde in Abweichung zum Projektplan auf die Untersuchung zur Lyophilisation alternativer Trocknungsverfahren (z.B. Vakuumbandtrocknung) verzichtet, da frühzeitig gezeigt werden konnte, dass mit aufgeschlossener Biofeuchtmasse Biotransformationsraten erzielt werden können, die denen von Lyophilisaten überlegen sind. Da sehr gute Ergebnisse mit Ultra-Turrax-Dispergierung und Hochdruckhomogenisierung erzielt werden konnten, musste im zweiten Projektabschnitt unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Kenngrößen, die beste Methode identifiziert und optimiert werden. Der so hergestellte aktive Biokatalysator stellte die Basis für das in Arbeitspaket C zu untersuchende Biotransformationssystem dar. Wesentliche physikalische und chemische Schlüsselparameter wurden bestimmt. Die Maßstabsvergrößerung vom Mikro- in den 250-mL-Maßstab war nicht nur mit lyophilisierter Biomasse, sondern auch mit dispergierter und homogenisierter Biofeuchtmasse problemlos möglich. Mittels Fed-Batch Dosierungsstrategien von Valencen konnten Nootkatonwerte bis 880 mg/L erzielt werden, jedoch war diese Ausbeute noch nicht zufriedenstellend.

Auch wenn die bisherigen Ziele des Arbeitspaketes im Wesentlichen erreicht werden konnten, mussten nun die Arbeiten zum Recycling von nicht umgesetztem Substrat forciert werden. Diese Aktivitäten, gemeinsam mit dem Arbeitspaket D, welches alle Arbeiten zur effizienten Produktabtrennung für industrielle Applikationen umfasst, stellten die Schwerpunkte des zweiten Projektabschnittes dar. Unter Berücksichtigung der beim Statusseminar erteilten Gutachteraufgaben wurden zusätzlich Untersuchungen zur Enzymaktivität und der Enzymlokalisierung vorgenommen.

Aus dem Überstand rehydratisierter Lyophilisate gelang es durch eine aktivitätsgeleitete dreistufige chromatographische Reinigung eine elektrophoretisch reine Bande zu isolieren und zu sequenzieren. Die kodierende Sequenz der cDNA wurde mit einer Länge von 1191 bp ermittelt. Die erhaltene Sequenz wurde Homologievergleichen unterzogen und als Fragment einer neuartigen Oxygenase identifiziert. Die übersetzte Proteinsequenz zeigte eine Homologie von ~ 50% zu einer Oxygenase aus dem Basidiomyceten *Laccaria bicolor*. Anhand eines generierten 3-D-Strukturmodells wurde eine geeignete Peptidsequenz zur Produktion polyklonaler Antikörper ausgewählt. Mit Hilfe dieses Antikörpers gelang es, die neuartige Oxygenase hoch reproduzierbar und konzentrationsabhängig spezifisch zu färben. Mit lyophilisiertem Myzel von *P. sapidus* wurde eine Korrelation zwischen der Bandenstärke im Westernblot und der Aktivität der Biomasse gezeigt.

Eine Beteiligung von P450-Aktivitäten zur Bildung der Nootkatole mit nachfolgender Oxidation zum Nootkaton konnte ausgeschlossen werden. Durch spezifische Färbung, Dünnschichtchromatographie und HPLC Retention zusammen mit UV- und APCI⁺-Spektren wurden isolierte Verbindungen als die postulierten Valencenhydroperoxide eindeutig nachgewiesen. Ein vorgeschlagener Bildungsmechanismus für (+)-Nootkaton und die beiden Nootkatole kann somit als bestätigt angesehen werden.

Für die Arbeiten zum Recycling von nicht umgesetztem Substrat und die effiziente Produktabtrennung wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Mit dem Zeolithen ZSM-5 150 gelang es zwar, nicht umgesetztes Valencen direkt aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, Nootkaton konnte aufgrund seiner Molekülgröße auf diese Weise jedoch nicht entfernt werden. Mit dem biogenen Lösungsmittel Limonen wurden Flüssig-Flüssig-Extraktionen durchgeführt. Im Modellversuch ohne vorherige Biotransformation konnten zugesetztes Nootkaton und Valencen vollständig extrahiert werden. Bei biotransformierten Proben wurden bereits im kleinen Maßstab (5 - 10 mL) feststoffstabilisierte Emulsionen beobachtet, die die Phasentrennung und Ausbeuten nachteilig beeinflussten.

Eine effiziente Produktabtrennung im technischen Maßstab ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht gelungen.

Der ökoefiziente Vergleich Chemosynthese und enzymatische Katalyse zur Produktion von Nootkaton konnte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt werden, da für die vollständige Prozessbewertung des chemischen Verfahrens noch eine detaillierte Bilanzierung der Abfälle und weiterer Energiebedarfe fehlt. Hinsichtlich der Ökoefizienz der biotechnologischen Verfahren kann festgehalten werden, dass das Szenario Fermentation und Zellaufschluss mittels Homogenisierung in allen bislang untersuchten Kategorien sowohl ökologisch und ökonomisch besser aufgestellt ist, als das Szenario Fermentation und Zellaufschluss mit Lyophilisation. Hervorzuheben ist eine 35%ige Einsparung im Bereich Energieverbrauch durch das Homogenisierungsverfahren.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Patentanmeldungen:

N-Zyme BioTec: Enzymatic synthesis of the grapefruit flavour nootkatone EP 08.1711483, 2008

Begutachtete Publikationen:

Fraatz MA, Berger RG, Zorn H: Nootkatone – a Biotechnological Challenge, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009, **83**, 35-41.

Fraatz MA, Kopp SJL, Stöber R, Kaspera R, Nimtz M, Berger RG, Zorn H: A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone, J. Mol. Cat. B 2009 **61**, 202–207.

Krügener S et al.: A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation, Bioresour Technol 2010, **101**:457-462.

Zorn H et al.: "Bioflavours" – an excursion from the garlic mushroom to raspberry aroma. In: Hofmann T, Meyerhof W, Schieberle P (Eds.) Recent Highlights in Flavor Chemistry and Biology. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München, 2008, 203-209.

Krügener S, Krings U, Zorn H, Berger RG: Gewinnung des Aromastoffs Nootkaton: Biokatalyse und Downstream-Processing, Chem. Ing. Tech. 2009, **81**(8), 1071.

Berger RG: Biotechnology of flavours – the next generation, Biotech. Lett. 2009, **31**, 1651-1659.

Sonstige Publikationen:

Fraatz MA, Rinne S, Berger RG, Zorn H (2007) Terpenoide Aromen aus nachwachsenden Rohstoffen. Lebensmittelchemie **61**:159-160.

Linke D, Kopp SJL, Zorn H, Berger RG: Enzyme aus Basidiomyceten – Biokatalysatoren der Zukunft. Lebensmittelchemie 2007, **61**, 135-136.

Berger RG: From fermentation to white biotechnology: how microbial catalysts generate flavours, In: Modifying flavour in food, A. Taylor, J. Hort (Eds.), Woodhead, Cambridge, England, 2007, pp. 64-94.

Berger RG, Zorn H (2008) Biotechnology of flavours – recent progress. In: Koutinas A, Pandey A, Larroche C (Eds) Current topics on bioprocesses in food industry, Vol II. Asiatech Publishers, New Dehli, pp 30-42.

Fraatz MA et al.: Synthese von natürlichem Nootkaton. Lebensmittelchemie 2009, **63**:130-131.

Krings U, Lehnert N, Rheinheimer, M, Berger RG: Mikroorganismen erzeugen hochwertige Aromen, 2009, www.aktuelle-wochenschau.de/w41/woche41.html.

Zorn H, Riemer SJL, Szweda R, Fraatz MA (2009) Neue enzymatische Verfahren für die Lebensmittel- und Aromabiotechnologie. Lebensmittelchemie; im Druck.

Berger RG: White Biotechnology: Sustainable Options for the Generation of Natural Volatile Flavours, Proc.12th Weurman Flavour Symposium, Eds. Imre Blank, Matthias Wüst, Chahan Yeretian, im Druck.

Vorträge:

Zorn H: Natural flavours from renewable resources. European BioPerspectives, Köln, 2007.

Zorn H et al.: "Bioflavours" – an excursion from the garlic mushroom to raspberry aroma. Wartburg Flavour Symposium, 2007, Dt. Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie

Fraatz MA et al.: Terpenoide Aromen aus nachwachsenden Rohstoffen. Regionaltagung West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft 2007.

Fraatz MA et al.: Enzymatische Synthese von Nootkaton. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2009.

Krügenger S et al.: Gewinnung des Aromastoffs Nootkaton: Biokatalyse und Downstream-Processing. 27. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 08.-10. Sept. 2009.

Zorn H: Sustainable biochemical and chemical engineering – *SusChemEng*. Deutsch-Russisches Forum Biotechnologie, Pushchino, Russland, 2008.

Zorn H: Basidiomyceten – Aromafabriken und Werkzeugkasten für die Weiße Biotechnologie. GDCh-Kolloquium der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2009.

Zorn H et al.: Neue enzymatische Verfahren für die Lebensmittel- und Aromabiotechnologie. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2009.

Doktor- und Diplomarbeiten:

Fraatz MA (2007): Enzymatische Oxidation von Mono- und Sesquiterpenen. Leibniz Universität Hannover

Krügenger S., Leibniz-Universität Hannover, Dissertation 2009

Zoher A: Biotechnologische Produktion von natürlichem (+)-Nootkaton, Diplomarbeit, HS Mannheim, 2008

Behrens M: Bioprozessentwicklung zur Herstellung von natürlichem (+)-Nootkaton. Diplomarbeit. TU Dortmund, 2008

Zawar YD: Biocatalytic production of natural (+)-Nootkatone. Masterarbeit. TU Dortmund, 2008

Stöber R: Molekulare Charakterisierung einer neuartigen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. Bachelorarbeit. TU Dortmund, 2008

Schröder J: Heterologe Expression einer neuartigen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. Bachelorarbeit. TU Dortmund, 2008

Fazit:

Innerhalb des Projektes konnten wesentliche Ziele erreicht werden. Zum einen konnte ein kostengünstiger Fermentationsprozess entwickelt werden, mit dem Fermentationen bis in den 300-L-Maßstab problemlos möglich sind, wobei die Zerkleinerung der Vorkultur und die Ernte der Biomasse im industriellen Maßstab ohne Probleme technisch abzubilden sind. Zum anderen konnten zur Lyophilisation alternative Zellaufschlussverfahren (Hochdruck-Homogenisierung, UltraTurrax-Dispergierung) identifiziert werden, die eine ökologische und ökonomische Biotransformation erlauben. Mit der Identifikation des Zielenzym und der Herstellung eines spezifischen Antikörpers kann in Zukunft der optimale Erntezeitpunkt der Fermentation bestimmt werden. Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus hilft beim Verständnis des komplexen Biokatalysator-Systems. Limonen konnte als geeignetes biogenes Lösungsmittel für die Extraktion von Produkt und nicht umgesetztem Substrat identifiziert werden. Aufgrund der Probleme durch Emulsionsbildung muss jedoch ein System gefunden werden, dass die Applikation dieser Extraktion im industriellen Maßstab erlaubt. Die Arbeiten hierzu werden nach Projektende abgeschlossen werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Projektkennblatt.....	2
2	Zusammenfassung.....	11
3	Anlass und Zielsetzung des Projektes.....	13
4	Methoden	15
4.1	Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i>	15
4.1.1	Submerskultur im Schüttelkolben.....	15
4.1.2	RAMOS-Anlage.....	15
4.1.3	Submerskultur im Bioreaktor (bis 5-L-Maßstab).....	15
4.1.4	Submerskultur im Bioreaktor (300-L-Maßstab)	16
4.2	Gewinnung und Aktivierung des Biokatalysators.....	16
4.2.1	Lyophilisierung	16
4.2.2	Ultra-Turrax-Dispergierung.....	16
4.2.3	Hochdruck-Homogenisation	16
4.2.4	Weitere Aufschlussmethoden.....	16
4.3	Variation des Biotransformationssystems	17
4.3.1	Puffer und Emulgatoren	17
4.3.2	Cofaktorabhängigkeit	17
4.3.3	Dosierung von Substrat und Biokatalysator	17
4.3.4	<i>Scale-up</i> des Biotransformationsansatzes	17
4.4	Molekulare Enzymcharakterisierung und Antikörperherstellung.....	18
4.4.1	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)	18
4.4.2	SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen	21
4.4.3	SDS-PAGE unter nicht-denaturierenden Bedingungen.....	21
4.4.4	Färbung für Häm- und Metallenzyme (Hämfärbung).....	21
4.4.5	Peptidsequenzen	22
4.4.6	cDNA-Synthese und PCR-Screening.....	22
4.4.7	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten	23
4.5	Analytik.....	24
4.5.1	Standardanalytik flüchtiger Produkte.....	24

4.5.2	Analytik nicht flüchtiger Neben- und Zwischenprodukte	25
	NMR (nuclear magnetic resonance)-Spektroskopie	26
4.5.3	Chemische Verfahren zur Analyse von Valencenhydroperoxiden.....	27
4.5.4	Synthese von Referenzsubstanzen.....	28
4.6	Downstream Processing	29
4.6.1	Adsorptive <i>in situ</i> Abtrennung von nicht umgesetztem Valencen.....	29
4.6.1.1	Auswahl eines geeigneten Adsorbens	29
4.6.1.2	Adsorptionsversuche mit einer Modellmischung	29
4.6.1.3	Adsorptionsversuche aus einem realen Transformationsansatz..	30
4.6.2	Flüssig-Flüssig Extraktion mit Limonen	30
4.7	Ökoeffizienzanalyse	30
5	Ergebnisse	31
5.1	Kultivierung von <i>P. sapidus</i>	31
5.1.1	Submerskultur im Schüttelkolben.....	31
5.1.1.1	Optimierung des Fermentationsmediums	31
5.1.1.2	Einfluss von Antischaummitteln	33
5.1.1.3	RAMOS-Untersuchungen	34
5.1.2	Kultivierung im 5-L-Maßstab	35
5.1.3	Kultivierung im 300-L-Maßstab	35
5.2	Alternative Verfahren zur Aktivierung des Biokatalysators	37
5.2.1	Ultra-Turrax-Dispergierung.....	37
5.2.2	Hochdruckhomogenisation.....	37
5.2.3	Weitere Verfahren	39
5.2.4	Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Zellaufschluss	40
5.2.5	Variation des Biotransformationssystems	41
5.2.5.1	Puffer und Emulgatoren	41
5.2.5.2	Cofaktorabhängigkeit	43
5.2.5.3	Dosierung von Substrat und Biokatalysator	44
5.2.5.4	<i>Scale-up</i> der Biotransformation.....	46
5.3	Identifikation des Zielenzym und spezifischer Nachweis	49

5.3.1	Molekulare Charakterisierung	49
5.3.2	Herstellung eines spezifischen Antikörpers.....	54
5.3.3	SDS-PAGE/Westernblot: Untersuchungen zur Spezifität, Reproduzierbarkeit und Konzentrationsabhängigkeit des Antikörpers	55
5.4	Aufklärung des Reaktionsmechanismus	59
5.5	Downstream Processing	65
5.5.1	Extraktion von Valencen mit einem geeigneten Adsorbens	65
5.5.2	Flüssig-Flüssig Extraktion mit Limonen.....	67
5.5.2.1	Optimierung des Extraktionsverhältnisses	68
5.5.2.2	Emulsions- und Mulmschichtbildung.....	69
5.5.2.3	Anzustrebende Produktreinheit nach Limonenextraktion.....	69
5.6	Ökoeffizienzvergleich	71
6	Fazit.....	72
7	Ausblick.....	74
8	Literatur	76

2 Zusammenfassung

Wesentliche Ziele, die innerhalb der ersten Projekthälfte erreicht werden sollten, waren 1) ein System zur Produktion des Biokatalysators *Pleurotus sapidus* im industriellen Maßstab zu entwickeln, 2) zur Lyophilisation alternative Zellaufschlussverfahren zu finden und auf Effizienz zu überprüfen sowie 3) die Transformationsreaktion hinsichtlich reaktionstechnischer Parameter zu optimieren.

Das Hauptkulturmedium wurde hinsichtlich der Kosten und der Enzymausbeuten optimiert. Die Herstellungskosten für das Medium wurden durch Substitution von Glucosemonohydrat durch einen definierten Palatinoseabfallstrom konstanter Zusammensetzung sowie von Asparagin durch das anorganische Salz Ammoniumnitrat um den Faktor 5 gesenkt. Das Scale-up der fermentativen Produktion von *Pleurotus sapidus* vom Schüttelkolben, über einen 5-L-Bioreaktor bis in den 300-L-Technikumsmaßstab wurde erfolgreich gezeigt. Anfänglich auftretende Probleme mit ausgeprägter Schaumbildung während der Fermentation konnten durch geeignete Antischaummittel verhindert werden, ohne signifikante Einbußen an Biomasse und Aktivität in Kauf nehmen zu müssen. Da weiterhin gezeigt wurde, dass die Sauerstoffversorgung von *Pleurotus sapidus* während der Fermentation unkritisch ist, sind keine besonderen Anforderungen an Gasversorgung bzw. Rührertechnik bei der Übertragung des Prozesses auf den industriellen Maßstab zu erwarten. Die Fragmentierung des Mycels der Vorkultur, die im Labormaßstab mit einem Ultra-Turrax-Stab durchgeführt wurde, konnte problemlos mit einem Inline-Turrax in den Technikumsmaßstab übertragen werden. Zur Beurteilung der Biomasseseparation wurden die Firmen Flottweg, Peralisi und ARO Technologies hinzugezogen. Die Abtrennung ist mit einem Bandfilter oder einem Dekanter im Technikumsmaßstab ohne Probleme möglich.

Mit der Ultra-Turrax-Dispergierung und der Hochdruckhomogenisation wurden zwei zur Lyophilisation alternative, weniger energieintensive und kostengünstigere Aufschlussverfahren identifiziert, die in den industriellen Maßstab übertragen werden können. Mit beiden Verfahren wurde auf Basis von Biofeuchtmasse aktiver Biokatalysator generiert, der hinsichtlich Nootkatonbildung den Lyophilisaten sogar überlegen ist. Wesentliche Parameter (pH-Wert, Puffer, keine Cofaktorabhängigkeit, Substrat-Biokatalysator-Verhältnis) zur effizienten Biotransformation wurden bestimmt.

Durch eine fed-batch Substratdosierung innerhalb einer 24-stündigen Transformation wurde eine Konzentration an (+) Nootkaton von 886 mg L⁻¹ (13 mol%) erzielt.

Aus dem Überstand rehydratisierter Lyophilisate gelang es durch eine aktivitätsgeleitete dreistufige chromatographische Reinigung eine elektrophoretisch reine Bande zu isolieren und zu sequenzieren. Die erhaltene Sequenz wurde Homologievergleichen unterzogen und als Fragment einer Oxygenase identifiziert. Nachdem die kodierende Sequenz der cDNA ermittelt wurde, konnte anhand des daraus generierten 3-D-Strukturmodells eine geeignete Peptidsequenz zur Produktion polyklonaler Antikörper ausgewählt werden. Mit Hilfe dieses Antikörpers gelang es, die Oxygenase hoch reproduzierbar und konzentrationsabhängig spezifisch zu färben. Mit lyophilisiertem Myzel von *P. sapidus* konnte eine Korrelation zwischen der Bandenstärke im Westernblot und der Aktivität der Biomasse gezeigt werden.

Eine Beteiligung von P450-Aktivitäten zur Bildung der Nootkatole mit nachfolgender Oxidation zum Nootkaton konnte ausgeschlossen werden. Durch spezifische Färbung, Dünnschichtchromatographie und HPLC Retention zusammen mit UV- und APCI⁺-Spektren wurden isolierte Verbindungen als die postulierten Valencenhydroperoxide eindeutig nachgewiesen. Ein vorgeschlagener Bildungsmechanismus für (+)-Nootkaton und die beiden Nootkatole konnte somit bestätigt werden.

Für die Arbeiten zum Recycling von nicht umgesetztem Substrat und die effiziente Produktabtrennung wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Mit dem Zeolithen ZSM-5 150 gelang es zwar nicht umgesetztes Valencen direkt aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, Nootkaton konnte aufgrund seiner Molekülgröße auf diese Weise jedoch nicht entfernt werden. Mit dem biogenen Lösungsmittel Limonen wurden Flüssig-Flüssig-Extraktionen durchgeführt. Im Modellversuch ohne vorherige Biotransformation konnten zugesetztes Nootkaton und Valencen vollständig extrahiert werden. Bei biotransformierten Proben wurden bereits im kleinen Maßstab (5 - 10 mL) feststoffstabilisierte Emulsionen beobachtet, die die Phasentrennung nachteilig beeinflussten.

Eine effiziente Produktabtrennung im technischen Maßstab ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht gelungen.

Die Ökobilanz im Vergleich Chemosynthese zu enzymatischer Katalyse konnte noch nicht durchgeführt werden, da für die vollständige Bewertung des chemischen Verfahrens die detaillierte Bilanzierung der Abfallströme und des Energiebedarfs fehlt. Hinsichtlich der Ökoeffizienz der biotechnologischen Verfahren kann festgehalten werden, dass das Szenario Fermentation und Zellaufschluss mittels Homogenisation in allen bislang untersuchten Kategorien sowohl ökologisch und ökonomisch besser aufgestellt ist als das Szenario Fermentation und Zellaufschluss mit Lyophilisation. Hervorzuheben ist eine 35 %ige Einsparung im Bereich Energieverbrauch durch das Homogenisationsverfahren.

3 Anlass und Zielsetzung des Projektes

Der vorliegende Projektantrag beschreibt ein Verfahren der Weißen Biotechnologie, das die bestehenden Prozesse zur Gewinnung von Nootkaton ersetzt. Nootkaton findet wegen seines intensiven citrusartigen Geruchs breite Anwendung als Riech- und Duftstoff in der Kosmetik- und Arzneimittelindustrie und als Aromastoff für Lebensmittel. Lebensmittelindustrie und verwandte naturstoffverarbeitende Industriezweige produzieren große Volumina von Reststoffströmen, die als Substrate für Bioprozesse dienen können. Neben der angestrebten Senkung des Energie- und Rohstoffverbrauchs steht daher die Minderung des Reststoffaufkommens durch Schließung von Stoffkreisläufen und durch die Verwertung und Veredelung von einzelnen Reststofffraktionen zu vermarktbareren Produkten zunehmend im Mittelpunkt des Interesses.

Zur Chemosynthese von einer Tonne Nootkaton aus Valencen werden beim klassischen Dichromat-Verfahren ca. 50 Tonnen Tetrachlorkohlenstoff als Reaktionsmedium und Extraktionsmittel, 1,68 Tonnen *t*-Butanol, 2,27 Tonnen CrO₃, ca. 2 Tonnen Acetanhydrid, sowie Hilfsstoffe zur pH-Einstellung und Trocknung benötigt. Neuere Verfahren benutzen als Oxidationsmittel z.B. Acetyl-*t*-butylperoxid, Benzoylperoxid oder Oxon/OsO₄, die jedoch bei Verwendung im industriellen Maßstab ebenfalls Sicherheits- und Umweltprobleme (MAK-Wert OsO₄ 0,002 mg/m³!) sowie eine Fülle unerwünschter, aufwendig abzutrennender Nebenprodukte generieren. Die notwendigen Chemikalien werden aus Erdöl unter Verwendung gefährlicher Arbeitsstoffe und mit hohem Energieeinsatz hergestellt (z.B. Acetanhydrid aus Methylacetat und CO bei 220 °C/75 bar/Rh-Katalyse).

Je Tonne Nootkaton werden für die Temperierung des Reaktionsgemisches ca. 12 Mio kJ und für die destillative Trennung 34 Mio kJ (ohne Vakuumerzeugung) kalkuliert. Deshalb wird der Ersatz der herkömmlichen chemosynthetischen Verfahren zur Produktion von Nootkaton durch einen alternativen Bioprozess angestrebt. Zellen des Speisepilzes *Pleurotus sapidus* katalysieren die nebenproduktarme Oxidation des Sesquiterpenkohlenwasserstoffs Valencen (aus Orangenöl) zu (+) Nootkaton. Im Labormaßstab lieferte das Verfahren die derzeit besten Raum/Zeitausbeuten aller beschriebenen Bioprozesse zur Synthese natürlichen Nootkatons. Als Substrate zur Submerskultivierung des Speisepilzes *P. sapidus* dienen organische Reststoffströme wie Melasse und anorganische Salze wie NH_4NO_3 als Stickstoffquelle. Biotransformation und adsorptive Stofftrennung (DSP) erfolgen unter ressourcenschonenden Bedingungen (Umgebungstemperatur und -druck, neutraler pH-Wert, geschlossene Kreisläufe, keine Schwermetallsalze, keine problematischen Abströme). Der Bioprozess nutzt das harmloseste und preiswerteste Oxidationsmittel, den molekularen Sauerstoff der Luft, und benötigt eine vergleichsweise geringe Menge Lösungsmittel zur Desorption von Nootkaton vom zuvor beladenen Adsorbens.

4 Methoden

4.1 Kultivierung von *Pleurotus sapidus*

Die Kultivierung von *Pleurotus sapidus* erfolgte bei den Kooperationspartnern in Hannover, Dortmund/Gießen und bei N-Zyme BioTec mit unterschiedlichen Schwerpunkten, in unterschiedlichen Reaktortypen und Reaktorvolumina.

4.1.1 Submerskultur im Schüttelkolben

Die Kultivierung von *Pleurotus sapidus* DSMZ 8266 erfolgte zuerst in einem optimierten Standardnährmedium (SNL H) nach Sprecher 1959, nach Mediumsoptimierung in einem Melasse-Ammoniumnitrat-Medium (NL-MA). Von einer bewachsenen Agarplatte wurde ein ca. 1 cm² großes, mit Myzel bewachsenes Agarstück, steril ausgestochen und in 230 mL Medium / 500 mL Erlenmeyerkolben gegeben. Das Pilzmyzel wurde unter sterilen Bedingungen mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator (ca. 20 s bei niedriger Drehgeschwindigkeit) homogenisiert, anschließend für 4 – 5 Tage bei 24 °C und 150 rpm inkubiert. Die Vorkulturen wurden wiederum vor dem Inokulieren der Hauptkulturen homogenisiert. Die Kultivierung erfolgte im optimierten Medium (NL-MA). Hierfür wurden 20 mL Vorkultur in 230 mL NL-MA Medium / 500 mL Erlenmeyerkolben gegeben. Ebenso wurde der Einfluss verschiedener Antischaummittel (Polypropylenglykol P.2000 (Fluka), Silfar SE 4, Silfoam SE 9 (Wacker), Antifoam 1510US (Dow Corning) auf Wachstum und Biotransformationsaktivität untersucht.

4.1.2 RAMOS-Anlage

Hauptkulturen von *Pleurotus sapidus* wurden für 7 Tage in einer RAMOS-Anlage (Respiration Activity Monitoring System, RWTH Aachen) zur Charakterisierung der Sauerstoffaufnahme kultiviert.

4.1.3 Submerskultur im Bioreaktor (bis 5-L-Maßstab)

Fermentationen fanden mit 1 bis 5 Liter Bruttoreaktionsvolumen in Minifors- bzw. Labfors3-Laborfermentern (Infors) statt. Für die Fermentationen wurden zwei unterschiedliche Rührsysteme (2-stufiger Scheibenrührer, Umwurfsystem mit 2 Propellerrührern) verwendet.

Die Fermentationen erfolgten bei 24 °C für 96 – 120 h, z.T. pH-gesteuert. Die Aufzeichnung und Regelung der Fermentationsparameter fand mit der Software Iris (Infors) statt.

4.1.4 Submerskultur im Bioreaktor (300-L-Maßstab)

Pleurotus sapidus wurde für 4 Tage in 100 L Medium (NL-MA) in einem 300 L-Bioreaktor kultiviert (Bioengineering, Schweiz; 24°C, 150-250 rpm, 20 – 25 NL min⁻¹).

4.2 Gewinnung und Aktivierung des Biokatalysators

4.2.1 Lyophilisierung

Nach der Kulturführung wurde die Biofeuchtmasse durch Zentrifugation (10 min bei 3.313 x g und 4 °C) abgetrennt. Nach 2-maligem Waschen der Biofeuchtmasse mit vorgekühltem VE-Wasser wurde die Ausbeute an Biomasse durch Wägung ermittelt.

Die gewaschene Biofeuchtmasse wurde eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde zur Ermittlung des Lyophilisatgewichtes ausgewogen, mit einem Spatel zerkleinert und bei -70 °C gelagert.

4.2.2 Ultra-Turrax-Dispergierung

Um einen schnellen, schonenden und zugleich effektiven Zellaufschluss zu erzielen, wurde die Biofeuchtmasse mit einem Dispergierstab (ART moderne Labortechnik; Motor: Micra D-9, Dispergierwerkzeug: DS-8 / P für die Ansätze im 4 mL-Vial oder DS-20/PF MIR für Ansätze ab 100 mL) behandelt. Umdrehungsgeschwindigkeit und Dispergierzeit wurden variiert.

4.2.3 Hochdruck-Homogenisation

Pilzmyzel-Suspensionen in VE-Wasser wurden mittels Hochdruck-Homogenisation (LAB 60/60 TBS, Gaulin APV, Schweiz) aufgeschlossen. Neben dem Einfluss der Anzahl der Durchläufe (1 bis 3 Passagen) wurde das direkte Einhomogenisieren des Substrates während des Zellaufschlusses untersucht.

4.2.4 Weitere Aufschlussmethoden

Weiterhin wurde Biofeuchtmasse durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff, mit einer Rührwerkskugelmühle oder durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen.

4.3 Variation des Biotransformationssystems

4.3.1 Puffer und Emulgatoren

Zur Optimierung der Transformation von Valencen zu Nootkaton wurden unterschiedliche Puffer mit verschiedenen pH-Werten eingesetzt. Weiterhin wurden Triton® X 100, Lecithin aus Soja und Ei sowie Tween® 80 in unterschiedlichen Konzentrationen als Emulgatoren untersucht.

4.3.2 Cofaktorabhängigkeit

(+)-Valencen wurde mit Lyophilisaten für 12 und 24 h in Gegenwart äquimolarer NAD- oder NADP-Konzentrationen (5,25 mM) transformiert. Zusätzlich wurde der Einfluss der Cofaktoren NAD(P)H untersucht.

4.3.3 Dosierung von Substrat und Biokatalysator

Um auszuschließen, dass die Substratmenge der limitierende Faktor während der Transformation ist, wurde Valencen in unterschiedlichen Konzentrationen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten dem Biotransformationsansatz zudosiert (Batch, Fed-Batch). Parallel dazu wurde auch der Biokatalysator wiederholt zugegeben sowie die Schüttelfrequenz während der Biotransformation variiert.

4.3.4 Scale-up des Biotransformationsansatzes

Zur Beurteilung der Übertragbarkeit auf größere Volumina, wurde in einer ersten Maßstabsvergrößerung der Ansatz von 1,5 mL unter Beibehaltung des Verhältnisses von Biokatalysator zu Puffervolumen auf 10 mL im Erlenmeyerkolben und im zweiten Schritt auf 200 bis 250 mL Transformationspuffer in einem 500 mL-Bioreaktor ohne Begasung linear vergrößert.

4.4 Molekulare Enzymcharakterisierung und Antikörperherstellung

4.4.1 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

30 mL TRIS-HCl-Puffer (20 mM, pH 7,5) werden zu 1 g lyophilisiertem Myzel gegeben. Die Suspension wird in horizontaler Lage 1 Stunde bei 24°C und 150 rpm geschüttelt. Nach Zentrifugation (60 Minuten, 100.000 x g, 4°C) wird der Überstand zusätzlich membranfiltriert (0,45 µm Porengröße, 25 mm, PET, Carl Roth GmbH).

Die Protein-Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt. Die Proben wurden vor der Injektion erneut zentrifugiert (10 Minuten 16.060 x g, 4°C). Die Elution der Proteine wurde bei $\lambda = 280$ nm detektiert. Die proteinhaltenden Fraktionen wurden auf ihre Transformationsaktivität getestet.

Für die Anionenaustausch-Chromatographie (Tabelle 4.2) wurde eine Hi-Prep DEAE 16/10 FF Säule (20 mL, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet. Als Start-Puffer wurde 20 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 (Puffer A) verwendet. Die Proteine wurden mit einem 3-Stufen-Gradient (TRIS-HCl-Puffer mit 0,1 M NaCl (Puffer B)) eluiert: 7 Säulenvolumen 100% Puffer A, 6 Säulenvolumen 65 % Puffer A, 5 Säulenvolumen 0% Puffer A. Die Flussrate wurde auf 3 mL min⁻¹ eingestellt und das Eluat wurde in 2 mL Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, die Aktivität besaßen wurden gepoolt und anschließend über Ultrafiltration (Centricon Plus-70, 10.000 Da MWCO, Millipore, Billerica, MA, USA) mit 20 mM Na-Citrat, pH 3,0 umgepuffert. Das Retentat wurde für die Kationenaustausch-Chromatographie verwendet.

Die Kationenaustausch-Chromatographie (Tabelle 4.3) wurde mit einer HiTrap SP Sepharose FF Säule (1mL, Amersham, Pharmacia Biotech) durchgeführt. Natriumcitrat-Puffer (20 mM pH 3,0) diente als Start-Puffer. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten (15 Säulenvolumen 0-100% Natriumcitrat Puffer mit 0,1 M NaCl) eluiert. Die Flussrate betrug 1 mL min⁻¹ und das Eluat wurde in 2 mL Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen, die Aktivität besaßen wurden gepoolt und anschließend über Ultrafiltration (Amicon Ultra-15, 10.000 Da MWCO, Millipore) mit 200 mM TRIS-HCl-Puffer pH 7,5 umgepuffert. Das Retentat wurde für die Größenausschluß-Chromatographie (SEC) verwendet.

Für die SEC wurde (Tabelle 4.4) eine Superdex-200 10/300 GL – Säule mit einem Bettvolumen von 24 mL und einem optimalen Trennbereich von 10 bis 600 kDa eingesetzt. Der Elutionspuffer enthielt TRIS-HCl (200 mM pH 7,5) und die Flussrate betrug $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Das Fraktionsvolumen betrug 1 mL. Die Kalibration der Gelfiltrationssäule wurde mit Hilfe von Standardproteinen zweier Gelfiltrations-Kalibrationskits (High Molecular Weight und Low Molecular Weight, Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 4.1 FPLC mit UV-Detektor

FPLC-System	Biologic Duo Flow Chromatography System (Bio-Rad) mit Biologic Fraktionssammler Modell 2128 (Bio-Rad)
Datenaufnahme	Biologic Duo Flow Workstation (Bio-Rad), Version 3.00
Detektionswellenlänge	280 nm

Tabelle 4.2 Enzymreinigung mittels DEAE, Stufengradient

Säule	HiPrep 16/10 DEAE FF (Amersham Pharmacia Biotech)
Säulenvolumen (CV)	20 mL
Startpuffer (A)	20 mM TRIS-HCl, pH 7,5
Elutionspuffer (B)	20 mM TRIS-HCl + 0,2 M NaCl, pH 7,5
Spülpuffer (C)	20 mM TRIS-HCl + 2,0 M NaCl, pH 7,5
Probenschleife	5,0 mL
Flussrate	$5,0 \text{ mL min}^{-1}$
Elutionsprogramm	2 CV 100% Puffer A Probeninjektion: 2 x Probenvolumen (Puffer A) 7 CV 100% Puffer A 6 CV 35% Puffer B 5 CV 100% Puffer B 4 CV 100% Puffer C 5 CV 100% Puffer A
Fraktionsvolumen	2,0 mL

Tabelle 4.3 Enzymreinigung mittels SP FF

Säule	HiTrap SP Sepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech)
Säulenvolumen (CV)	1 mL
Startpuffer (A)	20 mM Natriumcitrat, pH 3,0
Elutionspuffer (B)	20 mM Natriumcitrat + 1,0 M NaCl, pH 3,0
Probenschleife	2,0 mL oder 5,0 mL
Flussrate	1,0 mL min ⁻¹
Elutionsprogramm	5 CV 100% Puffer A Probeninjektion: 2 x Probenvolumen (Puffer A) 10 CV 100% Puffer A Linearer Gradient von 100% Puffer A (0% Puffer B) auf 0% Puffer A (100% Puffer B) über 15 CV 5 CV 100% Puffer B 10 CV 100% Puffer A
Fraktionsvolumen	2,0 mL

Tabelle 4.4 Enzymreinigung mittels Superdex 200

Säule	Superdex 200 10/300 GL (Amersham Pharmacia Biotech)
Bettvolumen	ca. 24 mL
Trennbereich	10 - 600 kDa
Probenschleife	200 µL
Flussrate	0,5 mL min ⁻¹
Laufpuffer	200 mM TRIS-HCl, pH 7,5
Elutionsprogramm	Probeninjektion: 2 x Probenvolumen (Laufpuffer) 30 mL 100% Laufpuffer
Fraktionsgröße	1,0 mL

4.4.2 SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen

Die Proteine wurden in 12%igen Trenngelen getrennt (modifiziert nach Laemmli, 1970) und mittels Coomassie-Färbung oder Silberfärbung (Blum et al., 1987) visualisiert.

4.4.3 SDS-PAGE unter nicht-denaturierenden Bedingungen

Die SDS-PAGE unter nicht denaturierenden Bedingungen erfolgte analog 4.4.2, jedoch wurde die Zusammensetzung des Auftragspuffers (Tabelle 4.5) modifiziert.

Tabelle 4.5 Zusammensetzung des Auftragspuffers

TRIS-HCl, pH 6,8	0,1 M
SDS	20 g L ⁻¹
Bromphenolblau	2 g L ⁻¹
Glycerol	200 g L ⁻¹
Der Puffer wurde in Aliquots bei -20°C gelagert	

4.4.4 Färbung für Häm- und Metallenzyme (Hämfärbung)

Die Hämfärbung (modifiziert nach Thomas *et al.* 1976 und Henne *et al.* 2001) wurde nur nach SDS-PAGE unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Für die Hämfärbung wurden folgende Lösungen verwendet (Tabelle 4.6):

Tabelle 4.6 Zusammensetzung der Lösungen für die Hämfärbung

Lösung I	6,3 mM methanolische TMBZ-Lösung
Lösung II	0,25 M Natriumacetat-Puffer, pH 5,0
Lösung III (Färbelösung)	Lösung I/Lösung II (3/7 v/v)
Lösung IV (Lagerlösung)	Lösung II/Isopropanol (7/3 v/v)

Lösung I und III wurden jeweils kurz vor der Verwendung hergestellt.

SDS-Gele wurden für 45 min - 1 h in Lösung III im Dunkeln inkubiert, anschließend H₂O₂ (30%ig) bis zur Endkonzentration von 30 mM zugeben und für 1 min inkubiert. Die Gele wurden dreimal je 20 s in E-Pure-Wasser gewaschen.

4.4.5 Peptidsequenzen

Nach dreistufiger chromatographischer Reinigung des separierten Überstandes von *Pleurotus sapidus* wurde nach Inkubation mit (+)-Valencen mittels Gaschromatographie überprüft, ob die gereinigten Fraktionen Aktivität aufwiesen. Die aktiven Fraktionen 15 und 16 der abschließenden Gelfiltration wurden auf einem SDS-Gel unter denaturierenden Bedingungen getrennt und mit Coomassie® R gefärbt. Die für die gesuchte Transformationsaktivität verantwortliche Bande, mit berechnetem Molekulargewicht von 66 kDa, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und nach Trypsinverdau einer *de novo* Sequenzierung mittels "Electro-spray-tandem-Massenspektrometrie" (ESI-MS-MS) zugeführt (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7 Ermittelte Peptidsequenzen (Einbuchstabencode) nach ESI-MS-MS-Analyse der über 3 Stufen gereinigten Enzyme; MW = Molekulargewicht nach SDS-PAGE, fettgedruckt = sichere Identifizierung

MW [kDa]	66
Peptidsequenzen	<p>GFPVDQLNSPK (66-1)</p> <p>DLNDMWTTLGAK (66-2)</p> <p>YTESDLMAALPLNAK (66-3)</p> <p>TNPLDLSVNQANDWPWR (66-4)</p>

Ausgehend von einem Vergleich der Peptidsequenzen 66-1 und 66-3 mit der Sequenz einer Lipxygenase aus *Aspergillus fumigatus* (XP_746844.1; Abbildung 5.25) wurden degenerierte Primer abgeleitet und im PCR-Screening eingesetzt.

4.4.6 cDNA-Synthese und PCR-Screening

Für die Klonierung der Oxygenase-kodierenden cDNA-Sequenzen wurde cDNA aus *P. sapidus* synthetisiert und mittels Polymerase-Kettenreaktion gescreent. Das Myzel von *P. sapidus* wurde am 4. Kulturtag geerntet. Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels denaturierender Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid überprüft. Für die Synthese der cDNA wurde der SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech-Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Der Erststrang wurde mittels SuperScript™ II RNase H⁻ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert. PCR Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) produziert. Für die PCR wurden ca. 20 ng cDNA als Template in 50 µL-Ansätzen mit 1x CoralLoad Puffer (Qiagen), 0,2 mM dNTPs, 0,4 µM Primer und 1,25 U HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen) verwendet. Die Amplifizierung wurde mit einem PCR Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die folgenden Primer wurden für die Gesamtsequenz der cDNA verwendet: forward (5'>AAA CCT GAT GAG GAG CTG TTT<3'); reverse (5'>ACA GGA TAC GGT GAT GAA TG<3').

4.4.7 Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TA Cloning Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR[®]2.1 kloniert. Die Sequenzierung erfolgte mit M13 reverse und forward Primern und wurde von MWG Operon durchgeführt. Die erwartete Fragmentgröße im PCR-Screening bei Verwendung der degenerierten Primer gegeneinander betrug ca. 429 bp (entspricht 143 Aminosäuren). Die entsprechende Bande wurde aus dem Agarosegel isoliert, in den Vektor pCR2.1-TOPO zwischenkloniert und anschließend sequenziert. Durch *Primer Walking* wurde die kodierende Sequenz der cDNA mit einer Länge von 1191 bp beziehungsweise 396 Aminosäuren ermittelt.

4.5 Analytik

4.5.1 Standardanalytik flüchtiger Produkte

Für die Biokonversion von Valencen zu Nootkaton wurden folgende Standardbedingungen gewählt:

Tabelle 4.8 Standardmethode (Schnelltest) zur Bestimmung der Nootkatonbildung

	25 mg Lyophilisat / 4-mL-Glasvial
+	1 g Glasperlen (0,25 – 0,50 mm Durchmesser)
+	1,5 mL 20 mM (TRIS-HCl) Puffer pH 7,5
+	1,4 µL Valencen 70%ig von Döhler
Mischen	30 s Vortex
Transformation	in horizontaler Lage 4 h, 24 °C, 150 rpm
nach Ende der Transformation + interner Standard	100 µL Thymol in Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v); Thymolkonzentration: 750 mg L ⁻¹ – 2.000 mg L ⁻¹
+Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v)	2 mL
Extraktion	in horizontaler Lage 10 min, 24 °C, 150 rpm
Phasentrennung	10 min, 4 °C, 3.313 x g

Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, und das Zielprodukt mittels GC-FID mit polarer Trennsäule bestimmt. Zur Quantifizierung der Nootkatonkonzentration diente ein interner Standard.

Tabelle 4.9 GC-FID Analytik bei Extraktion mit Pentan /Diethylether (1:1,12 v/v)

KAS-Parameter	splitless (0,5 min), 60°C (0 min), 12 °C s ⁻¹ – 240 min (3 min)
Trennsäule	Varian WCOT Fused Silica CP Wax 52 B, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke
Detektor	FID, 250 °C Gase: H ₂ : 40 mL min ⁻¹ , Luft: 450 mL min ⁻¹ , N ₂ : 45 mL min ⁻¹
Trärgas	H ₂ , Vordruck: 58,4 kPa, Fluss: 1,5 mL min ⁻¹ (konstant)
Temperaturprogramm	40 °C (2min), 5 °C min ⁻¹ – 150 °C (0 min), 3 °C min ⁻¹ – 222 °C (0 min), 10 °C min ⁻¹ – 240 °C (10 min)

Tabelle 4.10 GC-FID Analytik bei Extraktion mit Limonen

Injektor:	Split/Splitless, Splitverhältnis: 15:1 entspricht 17,6 ml/min
Injektortemperatur:	260 °C
Trägergas:	He, Vordruck: 48 kPa entspricht 1,17 ml/min (constant pressure)
Trennsäule	HP-5, 30 m × 0,32 mm ID, 0,25 µm Film
Temperaturprogramm	80 °C / 3 min // 5 °C/min / 215 °C / 0 min // 40 °C /min / 320 °C / 5 min
Detektor:	FID, 340 °C, 30 ml/min H ₂ , 400 ml/min Luft, 25 ml/min Make-up N ₂

4.5.2 Analytik nicht flüchtiger Neben- und Zwischenprodukte

Zur Analytik möglicher nicht flüchtiger Neben- und Zwischenprodukte wurden Extrakte der Valencentransformation mittels Dünnschicht-Chromatographie (EtAc/Hexan(1:5)) sowie HPLC-DAD und LC-MS untersucht. Hierzu wurden für die DC Pentan/Diethylether-Extrakte aufgetragen. Zur unspezifischen Anfärbung der DC-Platten diente Anisaldehyd, zum spezifischen Hydroperoxidnachweis wurde ein Färbereagens nach Huber und Fröhle¹ verwendet. Zur Analyse mittels Flüssigchromatographie wurden Pentan/Diethylether-Extrakte zunächst mit N₂ abgedampft und anschließend in Methanol/Wasser (90:10) aufgenommen.

Tabelle 4.11 HPLC-DAD Analytik

Pumpe:	Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump
Degasser:	Jasco DG-980-50 3-Line Degasser
Flussrate:	1 mL min ⁻¹
Injektorventil:	Rheodyne RH 7725i mit 20 µL Probenschleife
Trennsäule	Europher-100; C18; 5 µm; 250 x 4 mm ID
Fließmittel:	Methanol/Wasser isokratisch 90:10
DAD:	Jasco MD-910 Multiwavelength Detector (λ = 190 – 480 nm)
Datenaufnahme:	Dell Dimension 166a mit Borwin-PDA V1.0

¹ Huber W, Fröhle E (1972): Ein neues Sprühreagens zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Peroxiden, *Chromatographia*, 5(4), 256–257.

Tabelle 4.12 LC-MS Analytik

System:	Shimadzu, LCMS-QP8000α
Degasser:	Shimadzu DGU-12A
Flussrate:	1 mL min ⁻¹
Injektorventil:	Rheodyne RH 7725i mit 20 µL Probenschleife
Trennsäule	Eurospher-100; C18; 5 µm; 250 x 4 mm ID
Fließmittel:	Methanol/Wasser isokratisch 90:10
UV-Detector:	Shimadzu SPD-10AvP, 210 nm
Massenspektrometer:	Shimadzu LCMS-QP8000α

NMR (nuclear magnetic resonance)-Spektroskopie

¹H and ¹³C NMR-Spektren wurden mit einem BRUKER Advance DRX-500 (¹H bei 500 MHz, ¹³C bei 125 MHz) aufgenommen. Die Proben wurden dazu in CDCl₃ gelöst.

4.5.3 Chemische Verfahren zur Analyse von Valencenhydroperoxiden

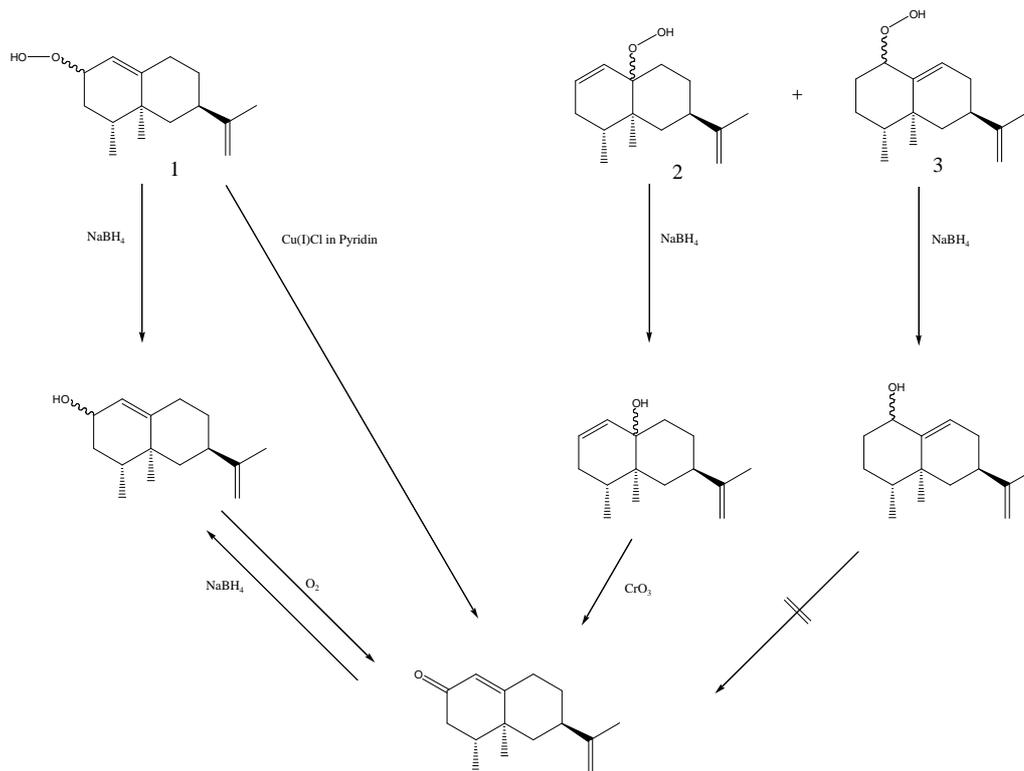


Abbildung 4.1 Reduktion von Valencenhydroperoxiden nach Schulte-Elte²

Zur Identifizierung von Hydroperoxiden wurden Pentan/Diethylether-Extrakte aus einer Umsetzung von Valencen mit *P. sapidus* (24 °C; 300 rpm; 1,4 µL Val70; 1,5 mL TrisHCl (20 mM; pH 7,5); 25 mg Lyophilisat; 16 h) entweder direkt oder nach dünnschichtchromatographischer Trennung vereinigt und mit N₂ abgedampft.

Zur Reduktion der Hydroperoxide [2,2',3,3'] zu den entsprechenden Alkoholen wurden die abgedampften Proben in 1 mL MeOH gelöst und für 1 h bei 0 °C mit 30 mg NaBH₄ behandelt. Ein Ansatz ohne Behandlung mit 30 mg NaBH₄ wurde zur Kontrolle mitgeführt.

Zur Überführung der Hydroperoxide zum Nootkaton wurden die abgedampften Proben in 1 mL Pyridin gelöst und für 1 h bei 0 °C mit 10 mg Cu(I)Cl behandelt. Anschließend wurde für 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Auch in diesem Fall wurde ein Ansatz ohne Behandlung mit CuCl zur Kontrolle mitgeführt. Die Ansätze wurden mit Pentan/Diethylether extrahiert und mittels GC-MS analysiert sowie nach erneutem Einengen und Lösen in MeOH/Wasser (90:10) mittels HLCP-DAD untersucht.

² Schulte-Elte, Karl H.; Fracheboud, Michel G.; Ohloff, Günther. (Firmenich). Ger. Offen. (1971), DE 2035901

4.5.4 Synthese von Referenzsubstanzen

Da keine spektralen Daten zu den tertiären Valencenalkoholen vorlagen, wurden diese durch eine zweistufige Synthese dargestellt. Als Edukt diente Nootkaton ex Grapefruit.

In der ersten Stufe kann ein enantiomerenreines Epoxid (6-Isopropenyl-4,4a-dimethyl-hexahydro-1-oxa-cyclopropa[d]naphthalen-2-one) dargestellt werden, somit wird als Endprodukt ausschließlich der β -Valencenalkohol 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-ol erhalten.

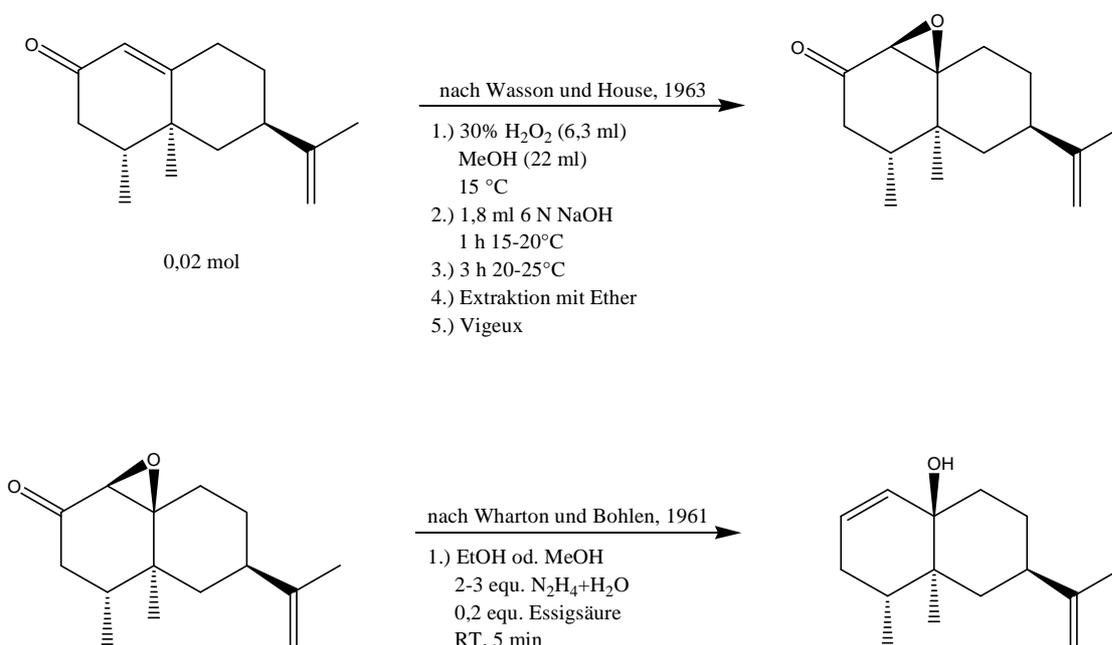


Abbildung 4.2 Synthesestrategie nach Wasson und House³ sowie nach Wharton und Bohlen⁴

Spektrale Daten:

6-Isopropenyl-4,4a-dimethyl-hexahydro-1-oxa-cyclopropa[d]naphthalen-2-one,

KI (ZB-WAX): 2308;

MS [m/z(%): 234, M⁺(5), 219(12), 163(40), 162(36), 121(54), 119(41), 109(43), 107(100), 95(62), 93(74), 91(40), 81(44), 79(41), 69(69), 67(57), 55(55), 41(57).

³ Wasson RL, House HO (1963): Isoprone oxide. Organic Synthesis, 4, 522.

⁴ Wharton P, Bohlen D (1961): Hydrazine reduction of α,β -Epoxy ketones to allylic alcohols. J. Org. Chem. 26 (9), 3615-3616.

¹³C NMR(CDCl₃):

d: 14.3 (CH₃-CH), 14.8 (CH₃-C), 20.6 (C-CH₃), 28.9 (CH-CH₂-CH₂), 30.0 (C_{Epoxyd}-CH₂-CH₂), 32.2 (CH₂-CH₂-C), 36.4 (C-CH₂-CH), 39.9 (CH₂-CH-CH₂), 40.5 (C-CH₂-CO), 41.7 (C-C-CH₂), 62.3 (CH₂-C_{Epoxyd}-HC_{Epoxyd}), 68.4 (CO-HC_{Epoxyd}-C_{Epoxyd}), 109.2 (CH₂=C), 148.7 (H₂C@C-C), 205.6 (C-C=O).

2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-ol, **KI**
(ZB-WAX): 2054;

MS [m/z(%): 220, M⁺(19), 205(11), 202(46), 161(63), 159(54), 131(55), 121(58), 119(69), 109(71), 107(69), 105(73), 95(100), 93(58), 91(61), 81(57), 69(88), 55(87), 41(81).

¹³C NMR(CDCl₃):

d: 14.0 (CH₃-CH), 14.4 (CH₃-C), 20.7 (C-CH₃), 25.6 (CH₂-CH₂-CH), 31.5 (C-CH₂-CH), 32.5 (HOC-CH₂-CH₂), 32.7 (CH-CH₂-CH), 35.1 (H₂C-CH-C), 38.9 (H₂C-CH-CH₂), 39.6 (CH-C-CH₂), 70.9 (HC-COH-CH₂), 108.5 (CH₂=C), 130.1 (CH=CH-COH), 133.5 (H₂C-CH=CH), 150.6 (H₂C=C-C).

4.6 Downstream Processing

4.6.1 Adsorptive *in situ* Abtrennung von nicht umgesetztem Valencen

4.6.1.1 Auswahl eines geeigneten Adsorbens

Aufgrund der geringen Polaritätsunterschiede zwischen dem Edukt (+)-Valencen und den oxidierten Produkten α,β -Nootkatol und Nootkaton wurde vorrangig eine Trennung aufgrund der Molekülgröße/-geometrie in Betracht gezogen, wie sie mit natürlichen und synthetischen Zeolithen und Silicalithen erzielt werden könnte.

4.6.1.2 Adsorptionsversuche mit einer Modellmischung

1,4 mL wässrige Suspension von jeweils 1000 mg L⁻¹ Valencen und Nootkaton wurden unterschiedlichen Mengen des vorkonditionierten (Waschen und Ausglühen bei 400 °C) Zeolithen ZSM-5 150 für 60 min in Kontakt gebracht und die Konzentration an nicht adsorbiertem Valencen und Nootkaton bestimmt. Dazu wurde der Zeolith abzentrifugiert, der Überstand mit Pentan/Diethylether extrahiert und die Stoffmengen gaschromatographisch quantifiziert.

4.6.1.3 Adsorptionsversuche aus einem realen Transformationsansatz

Ein Transformationsansatz mit 10 mL Volumen wurde nach 16 h in aliquotiert und dann mit unterschiedlichen Mengen des Zeolithen für 60 min in Kontakt gebracht. Anschließend wurde nach Entfernen des Adsorbens durch Zentrifugation die Restkonzentrationen an Valencen und Nootkaton bestimmt (siehe Abschnitt 4.5.1).

4.6.2 Flüssig-Flüssig Extraktion mit Limonen

Für die Extraktion mit Limonen wurden die Transformationsansätze mit Limonen versetzt (die untersuchten Extraktionsverhältnisse werden in Abschnitt 5.5.2.1 beschrieben). Die Extraktion erfolgte in horizontaler Lage 30 Minuten, bei Raumtemperatur und 50 rpm auf einem Wippschüttler. Zur Beurteilung der Phasentrennung wurden die Proben 30 Minuten in senkrechter Position beobachtet. Trat nach 30 Minuten keine ausreichende Phasentrennung ein, wurden die Proben 10 Minuten bei 4 °C und 500 x g zentrifugiert.

4.7 Ökoeffizienzanalyse

Betrachtungen zum Ökoeffizienzvergleich des biotechnologischen Verfahrens (in den Varianten Lyophilisation und Homogenisation zur Aktivierung des Pilzmyzels) mit einem chemosynthetischen Verfahren wurden in Kooperation mit der Fa. Ifu Hamburg GmbH durchgeführt. Mit der Software Sabento wurde entsprechend des Projektfortschrittes die Ökoeffizienz-Analyse nur bis zum Aufschluss der Biomasse bilanziert. Die Systemgrenzen der ökologischen Bewertung beschränken sich auf den Herstellprozess, wobei die Sicherheit und Gesundheit als oberste Wirkkategorien im Vordergrund stehen. Eine abschließende Ökoeffizienz-Analyse nach BASF-Methode (cradle-to-grave) kann erst durchgeführt werden, wenn die nötigen Daten aus dem Downstream-Processing vorliegen.

5 Ergebnisse

5.1 Kultivierung von *P. sapidus*

5.1.1 Submerskultur im Schüttelkolben

Mit einer Vorkultur (SNL-H) von *Pleurotus sapidus* wurde eine Hauptkultur (SNL-H) inokuliert. Im 24-stündigen Abstand wurde der Glucosegehalt in den Kulturüberständen bestimmt und die Biomasse gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Lyophilisat zur Transformation von (+)-Valencen eingesetzt. Die Transformation von (+)-Valencen mit den Lyophilisaten zeigte, dass Biomassebildung und Transformationsaktivität proportional zueinander verliefen (Abbildung 4.1). Ebenfalls nach dem vierten Kulturtag wurden die höchsten Gehalte an (+)-Nootkatol nachgewiesen ($56 \text{ mg L}^{-1} \text{ 4 h}^{-1}$). Zu diesem Zeitpunkt waren noch circa 50% der zugesetzten Glucose im Medium nachweisbar.

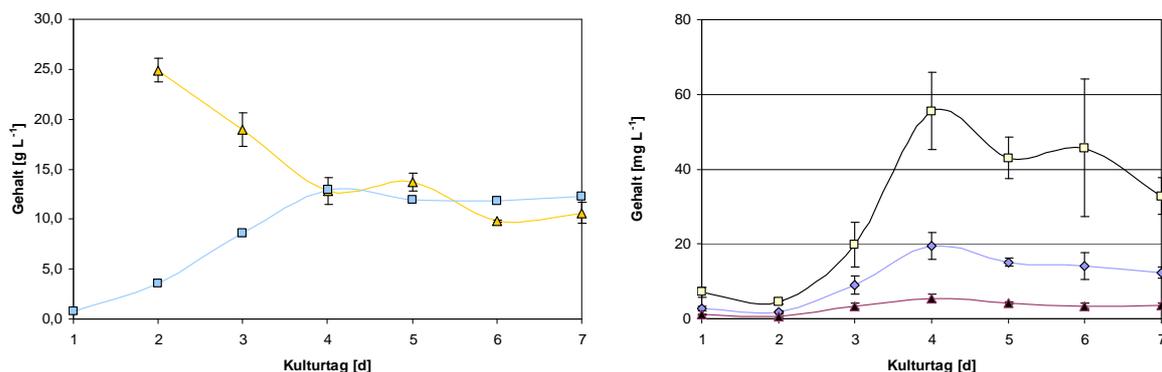


Abbildung 5.1 links: Wachstumskinetik und Glucosegehalt der Hauptkultur in SNL-H-Medium in Abhängigkeit von der Kulturdauer; $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ Glucose $\text{---}\blacksquare\text{---}$ Lyophilisat.

rechts: Gehalte an α -, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol in Abhängigkeit von der Kulturdauer; Transformation von $1,4 \mu\text{L}$ (+)-Valencen mit 25 mg Lyophilisat in $1,5 \text{ mL}$ 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen ($0,25 - 0,50 \text{ mm}$) bei 150 U min^{-1} , $24 \text{ }^\circ\text{C}$ für 4 h ;
 $\text{---}\blacklozenge\text{---}$ α -Nootkatol $\text{---}\blacktriangle\text{---}$ β -Nootkatol $\text{---}\blacksquare\text{---}$ (+)-Nootkatol.

5.1.1.1 Optimierung des Fermentationsmediums

Das Hauptkulturmedium wurde hinsichtlich der Kosten und der Enzymausbeuten optimiert (Abbildung 5.2). Glucosemonohydrat wurde durch einen Palatinoseabfallstrom mit konstanter chemischer Zusammensetzung ersetzt. Asparagin als Stickstoffquelle konnte vollständig durch das weitaus günstigere anorganische Salz Ammoniumnitrat substituiert werden. Die Rezeptur des optimierten Fermentationsmediums ist in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Herstellungskosten für das Medium wurden so um den Faktor 5 gesenkt.

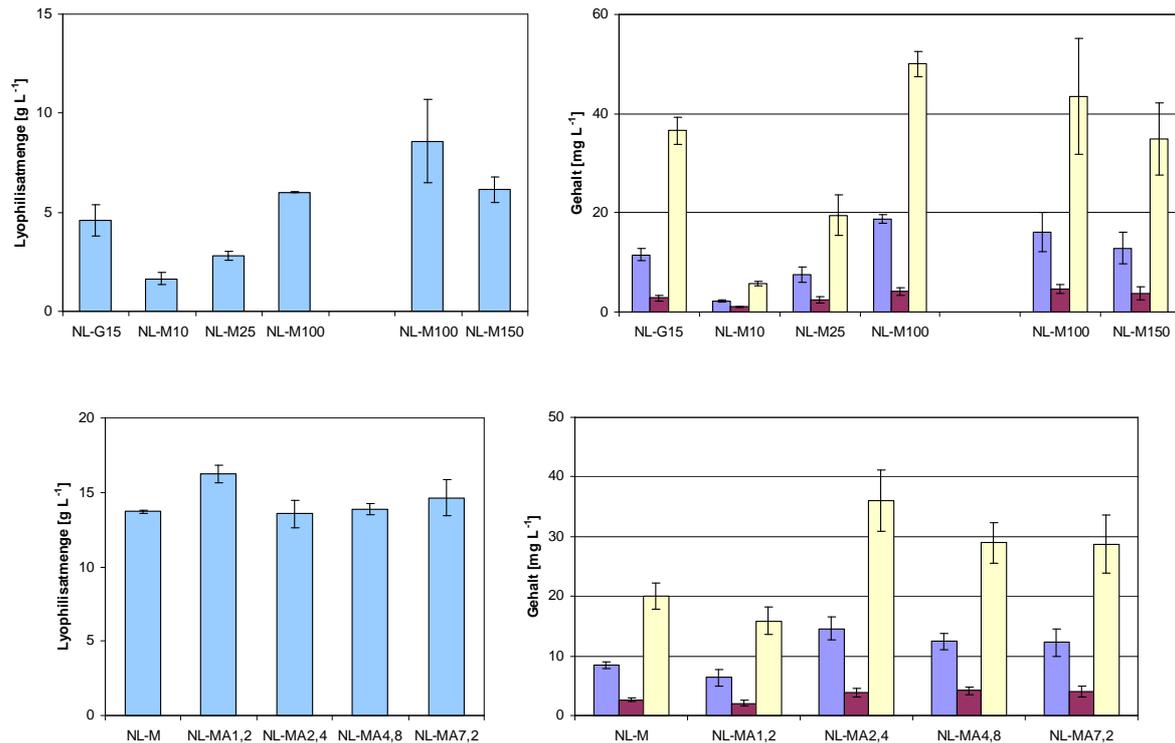


Abb. 2

Abbildung 5.2 links oben: Einfluss des Melassegehaltes auf das Wachstum von *Pleurotus sapidus*; NL-G₁₅ = Nährlösung mit 15 g L⁻¹ Glucose, NL-M_{xx} = Nährlösung mit xx mL L⁻¹ Melasse.
 rechts oben: Produktausbeuten in Abhängigkeit vom Melassegehalt des Mediums; Transformation von 1,4 μL (+)-Valencen mit 25 mg Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen (0,25 – 0,50 mm) bei 150 U min⁻¹, 24 °C für 4 h; NL-G₁₅ = Nährlösung mit 15 g L⁻¹ Glucose, NL-M_{xx} = Nährlösung mit xx mL L⁻¹ Melasse; ■ α-Nootkatol ■ β-Nootkatol □ (+)-Nootkaton.
 links unten: Lyophilisatmenge nach Gefriertrocknung der Hauptkulturen beim Einsatz unterschiedlicher Ammoniumnitratkonzentrationen als Ersatz für L-Asparagin im Medium; NL-M = Nährlösung mit 100 mL L⁻¹ Melasse, NL-MA_{x,x} = Nährlösung mit x,x g L⁻¹ Ammoniumnitrat.
 rechts unten: Produktausbeuten in Abhängigkeit vom Ammoniumnitratgehalt; Transformation von 1,4 μL (+)-Valencen mit 25 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen (0,25 – 0,50 mm) bei 150 U min⁻¹, 24 °C für 4 h; NL-M = Nährlösung mit 100 mL L⁻¹ Melasse, NL-MA_{x,x} = Nährlösung mit x,x g L⁻¹ Ammoniumnitrat;
 ■ α-Nootkatol ■ β-Nootkatol □ (+)-Nootkaton.

Tabelle 5.1 Zusammensetzung des optimierten NL-MA Mediums

Substanz	Dosierung
Palatinoseabfallstrom der Firma Südzucker AG Mannheim / Ochsenfurt	100 mL L ⁻¹
Ammoniumnitrat	2,4 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung	1,0 mL L ⁻¹
der pH-Wert wurde auf pH 6,0 eingestellt	

5.1.1.2 Einfluss von Antischaummitteln

PSA-Hauptkulturen (NL-MA) wurden unterschiedliche Polypropylenglykolkonzentrationen (PPG) (0,0 – 0,1% (v/v)) zugesetzt und deren Einfluss auf das Wachstum und Aktivität beobachtet. Das Wachstum wurde durch den Zusatz von PPG nur gering beeinflusst (Abnahme von ca. 12%). Hingegen wurde die Aktivität bei einem Zusatz von 0,005% und 0,025% PPG um ca. 30% gesteigert (Abbildung 5.3). Ab einer PPG-Konzentration von 0,1% wurde eine Abnahme der Aktivität (-20%) beobachtet. Eine vergleichbare Reduktion der Biomasse von 13% (SE 4 und SE 9) bzw. 20% (AF 1510) wurde auch in Gegenwart der auf Silikonöl basierenden Antischaummittel beobachtet. Die Aktivität des Biokatalysators in Gegenwart der Silikonöle betrug im Vergleich zur Kultivierung ohne Antischaummittel nur 25 – 30%.

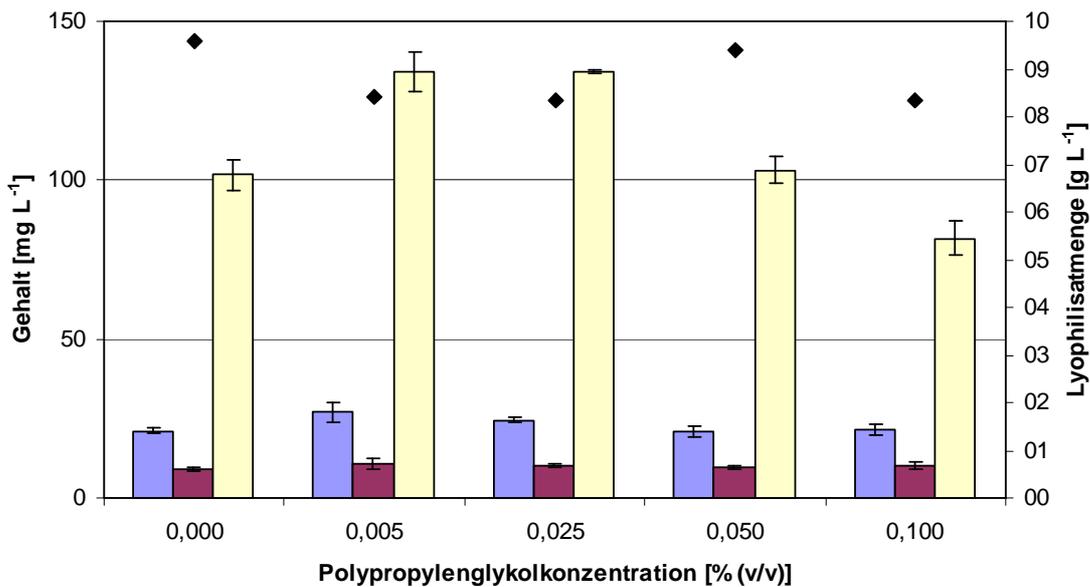


Abbildung 5.3 Einfluss der Polypropylenglykolkonzentration auf das Wachstum und die Aktivität; Transformation von 2 μL Valencen mit 25 mg Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS pH 7,5, 1 g Glasperlen (0,25 – 0,50 mm) bei 150 U min^{-1} , 24 $^{\circ}\text{C}$ für 4 h; \square α -Nootkatol \blacksquare β -Nootkatol \square (+)-Nootkaton \blacklozenge Lyophilisat

5.1.1.3 RAMOS-Untersuchungen

In Kooperation mit dem Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der RWTH Aachen wurden Hauptkulturen von *Pleurotus sapidus* für 7 Tage in einer RAMOS-Anlage kultiviert (Abbildung 5.4 links). Bei Variation des Medienvolumens (40 – 100 mL) bei konstanten Inokulum von 10% (v/v) und gleicher Kulturkolbengröße wurden identische Verläufe der Sauerstoffaufnahme beobachtet (Maximum nach ca. 3 Tagen; Abbildung 5.4 rechts). Demnach trat eine Sauerstofflimitierung bei der Anzucht in Kulturkolben nicht ein.

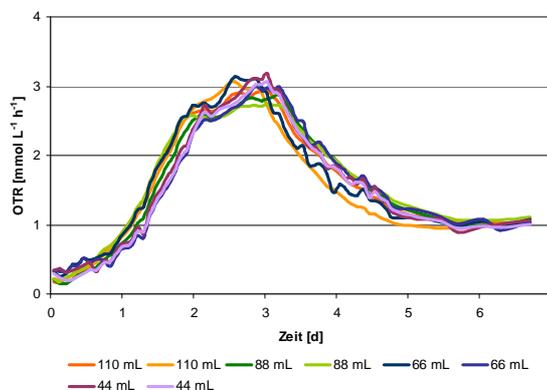


Abbildung 5.4 links: RAMOS-Anlage (Respiration Activity Monitoring System); Quelle: Prof. Büchs, RWTH Aachen. rechts: Einfluss des Kulturvolumens bei gleicher Kolbengröße (220 mL) auf die Sauerstoffaufnahme (OTR) von *Pleurotus sapidus* in NL-MA-Medium (gemessen mit einer RAMOS-Anlage)

5.1.2 Kultivierung im 5-L-Maßstab

In Fermentationen im 5-L-Maßstab wurde der Einfluss der beiden Rührersysteme Scheibenrührer und Propellerrührer mit Innenleitrohr (Umwurfsystem) bezüglich der generierbaren Menge an Biomasse und deren Aktivität untersucht. Bei Fermentationen ohne pH-Kontrolle wurde durch den Einsatz des Umwurfsystems die durchschnittliche Biofeuchtmasse auf 170 g L^{-1} im Gegensatz zu 120 g L^{-1} bei Kultivierung mit 2-stufigem Scheibenrührer gesteigert. Die Aktivität der erzeugten Biomasse war in beiden Fällen vergleichbar. Durch Konstanthalten des pH-Wertes auf pH 6 wurde die Menge der gebildeten Biomasse bei Kultivierung mit 2-stufigem Scheibenrührer zum Teil verdoppelt und mit bis zu 280 g L^{-1} sehr hohe Biomassegehalte erreicht. Die Aktivität der so generierten Biomasse war jedoch geringer. Der Sauerstoffpartialdruck sank im Laufe der Fermentationen nicht unter 50%, so dass die Ergebnisse aus der RAMOS-Anlage bestätigt werden konnten und eine Sauerstofflimitierung des Organismus trotz geringer Begasungsraten von weniger als 0,3 vvm nicht zu erwarten ist.

Tabelle 5.2 Vergleich der Kulturparameter der 4 verschiedenen Fermentationstypen (SR = Scheibenrührer, PR = Propellerrührer, BFM = Biofeuchtmasse, BTM = Biotrockenmasse)

	SR	SR, pH 6	PR	PR, pH 6
$V_{R,L}$ [mL]	4000	3000	4600	4900
Inokulum [%]	4,6	6,7	4,3	4,2
Luft [vvm]	0,25	0,33	0,2	0,2
Dauer [h]	95,2	93,4	96	127
BFM_{Start} [g L^{-1}]	52,3	27,8	24,4	26,2
BFM_{Ende} [g L^{-1}]	117	280	171	144
BTM_{Ende} [g L^{-1}]	4,2	8,6	7,8	7,4

5.1.3 Kultivierung im 300-L-Maßstab

Pleurotus sapidus wurde für 4 Tage in 100 L Medium (NL-MA) in einem 300-L-Bioreaktor kultiviert ($24 \text{ }^\circ\text{C}$, 150 – 250 rpm, 20 – 25 NL min^{-1}). Das Wachstum (135 g L^{-1} Biofeuchtmasse) und die Aktivität des Lyophilisats ($62 \text{ mg L}^{-1} 4 \text{ h}^{-1}$ Nootkaton) nach dem vierten Tag waren vergleichbar mit einer Kultur, welche parallel in Schüttelkolben gezüchtet wurde (164 g L^{-1} Biofeuchtmasse, $80 \text{ mg L}^{-1} 4 \text{ h}^{-1}$ Nootkaton, Abbildung 5.5).

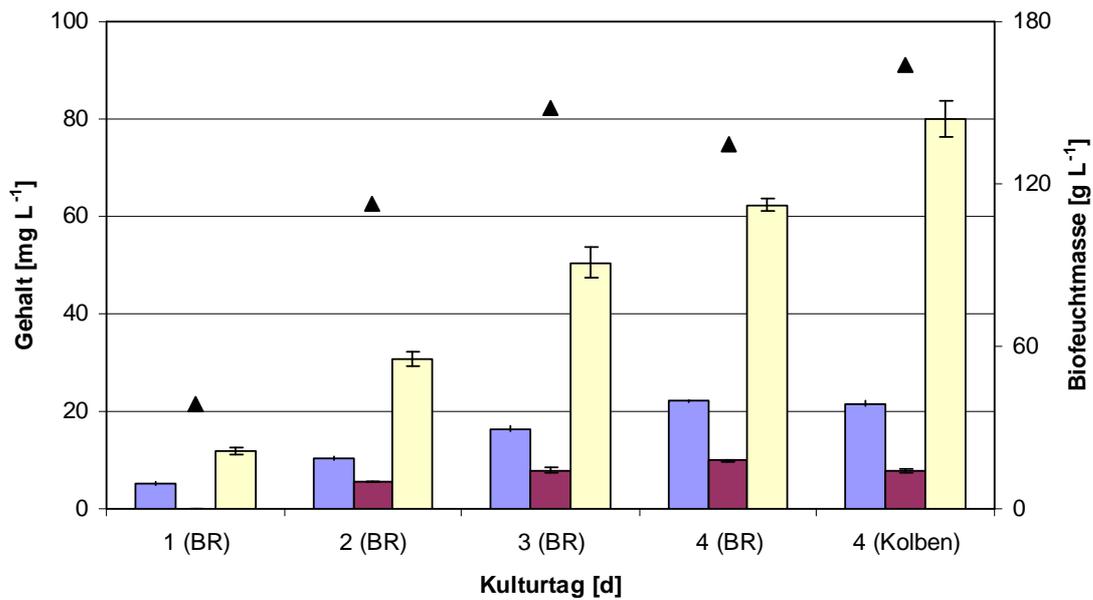


Abbildung 5.5 Wachstumskinetik und Ausbeuten an α -Nootkatol, β -Nootkatol und (+)-Nootkatol in Abhängigkeit von der Kulturdauer bei der Anzucht von PSA in 100 L Medium (NL-MA) in einem 300-L-Bioreaktor (BR) unter Zusatz von 0,005% (v/v) PPG und einem Inokulumvolumen von 9,2%; Transformation von 2 μ l Valencen mit 25 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS pH 7,5, 1 g Glasperlen (0,25 – 0,50 mm) bei 150 U min⁻¹, 24 °C für 4 h;
■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkatol ▲ Biofeuchtmasse

Der Zusatz von 0,005 % (v/v) PPG zur Bioreaktorkultur unterband die vorher im selben Reaktor beobachtete Schaumbildung vollständig (Abbildung 5.6).



Abbildung 5.6 Aufsicht auf 100 L Kulturbrühe bei aktiver Begasung (20 – 25 NL min⁻¹) des Bioreaktors nach 4 Tagen Kulturdauer

5.2 Alternative Verfahren zur Aktivierung des Biokatalysators

5.2.1 Ultra-Turrax-Dispergierung

Die Biofeuchtmasse, die bei 21.000 rpm 1 min dispergiert wurde, lieferte dem Lyophilisat vergleichbare Nootkatonausbeuten (siehe Abbildung 5.7). Höhere Scherkräfte und längerer mechanischer Aufschluss erhöhten die Biotransformationsaktivität bis zu 50%. Durch die Zugabe von Valencen 70 vor der Dispergierung wurde der Nootkatongehalt um den Faktor 2 gesteigert.

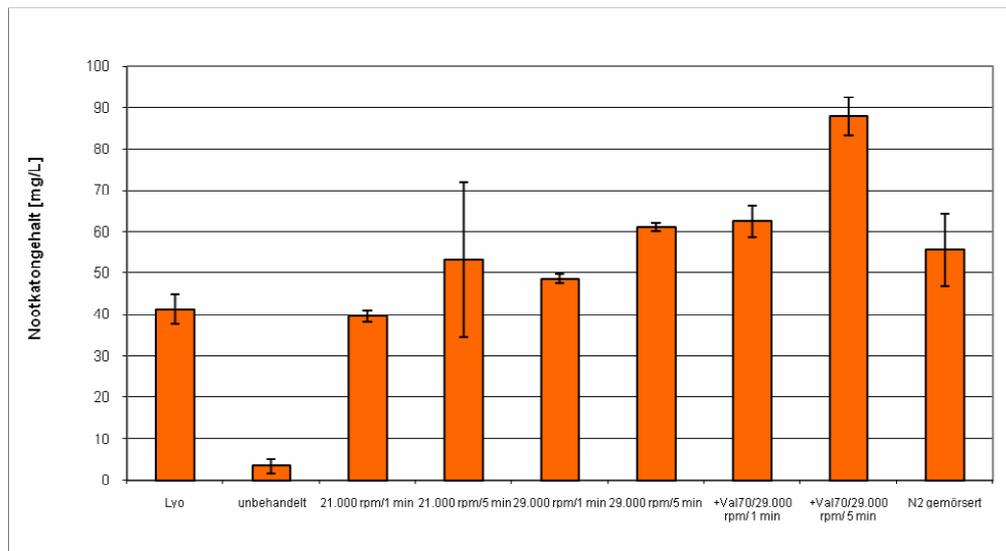


Abbildung 5.7 Transformation von Valencen 70 mit dispergierter Biofeuchtmasse

5.2.2 Hochdruckhomogenisation

Bei einem Homogenisationsdruck von 150/30 bar nahm die Aktivität der aufgeschlossenen Biomasse mit steigender Passagenzahl zu. Hierbei konnte nach 3 Passagen die Aktivität des Lyophilisates um 40% übertroffen werden. Bei einem Homogenisationsdruck von 300/60 bar wurde das Optimum an Aktivität bereits nach 2 Passagen erreicht (Abbildung 5.8).

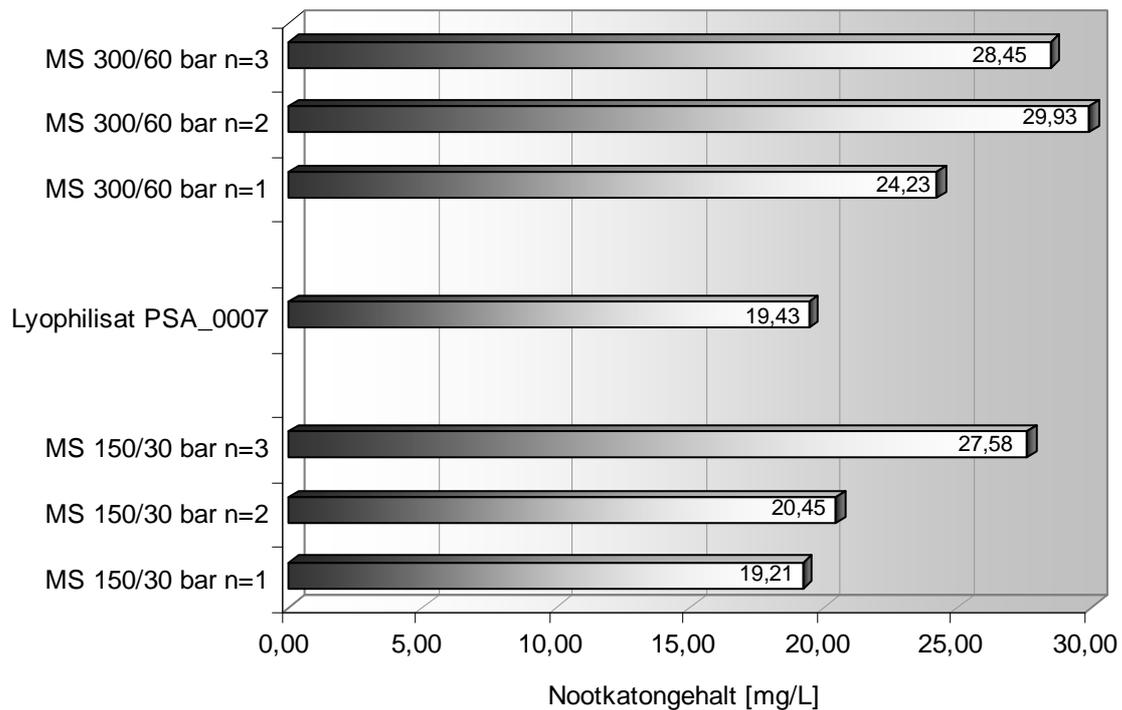


Abbildung 5.8 Vergleich der Transformationsaktivität von aufgeschlossener Biofeuchtmasse (MS) nach Homogenisation bei zwei verschiedenen Homogenisationsdrücken.

Neben der durch Hochdruckhomogenisation aufgeschlossenen Biomasse wurde zellfreier Überstand (nach Zentrifugation bei 4.000 rpm) zur Biotransformation eingesetzt. Die Aktivität des zellfreien Überstandes nahm mit steigender Passagenzahl zu und lag deutlich über der Aktivität der aufgeschlossenen Biomasse. Im Vergleich zu Biotransformationen mit Lyophilisat wurde die generierte Menge an Nootkaton mit Überstand nach 3 Passagen um den Faktor 3 gesteigert (Abbildung 5.9).

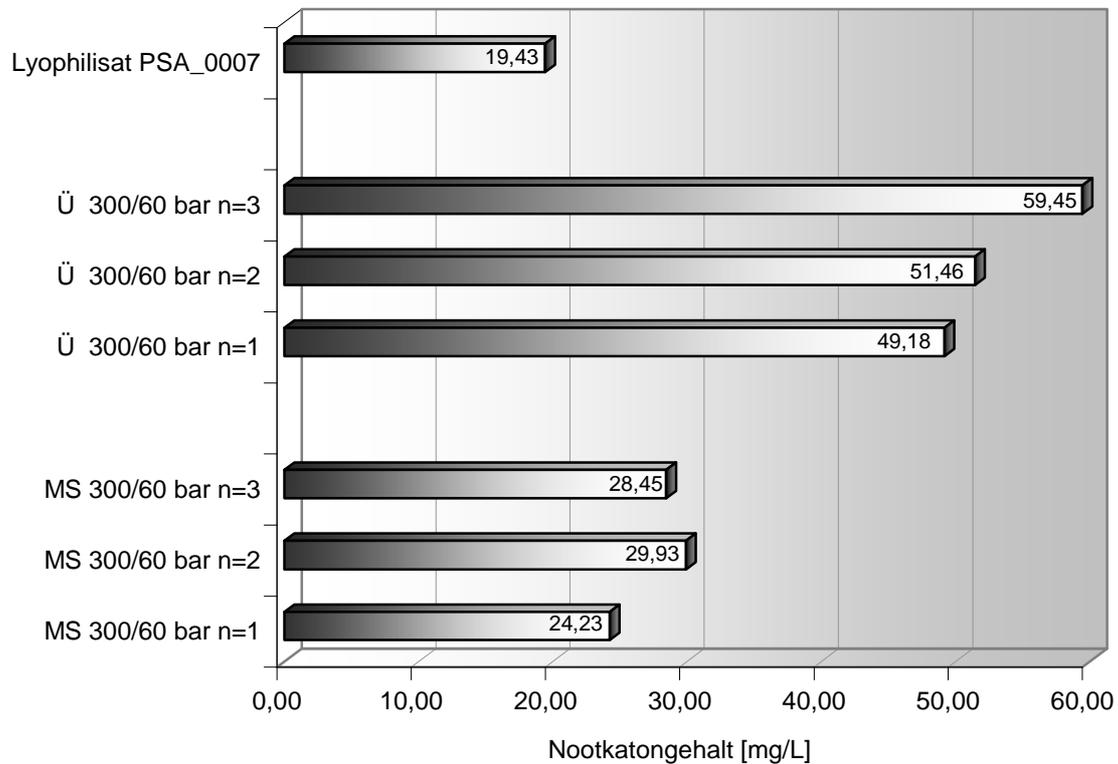


Abbildung 5.9 Vergleich der Transformationsaktivität von Biofeuchtmasse (MS) und zellfreiem Überstand (Ü) nach Homogenisation bei 300/60 bar in Abhängigkeit der Passagenzahl.

5.2.3 Weitere Verfahren

Erste Versuche zum Zellaufschluss mit einer Rührwerkskugelmühle haben gezeigt, dass die so aufgeschlossene Biofeuchtmasse deutliche Aktivität zur Nootkatonbildung aufweist. Ultraschallbehandlung wurde ebenfalls als effektive Methode zum Zellaufschluss bestätigt. Die Aktivität der Biofeuchtmasse war um 45% gegenüber der des Lyophilisates erhöht. Auf Grund der breiten Verwendung der Hochdruckhomogenisation im industriellen Maßstab wurde auf vertiefte Untersuchungen von Ultraschallbehandlung und Vermahlung verzichtet.

5.2.4 Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Zellaufschluss

Die Morphologie aufgeschlossener, katalytisch aktiver Zellen von *P. sapidus* unterscheidet sich zum Teil deutlich (Abbildung 5.10). Biofeuchtmasse nach einer Ultra-Turrax-Dispergierung zeigte nur einen geringen Aufschlussgrad. Die Zellmorphologie nach einem Kugelmühlenaufschluss ähnelte der nach Lyophilisierung.

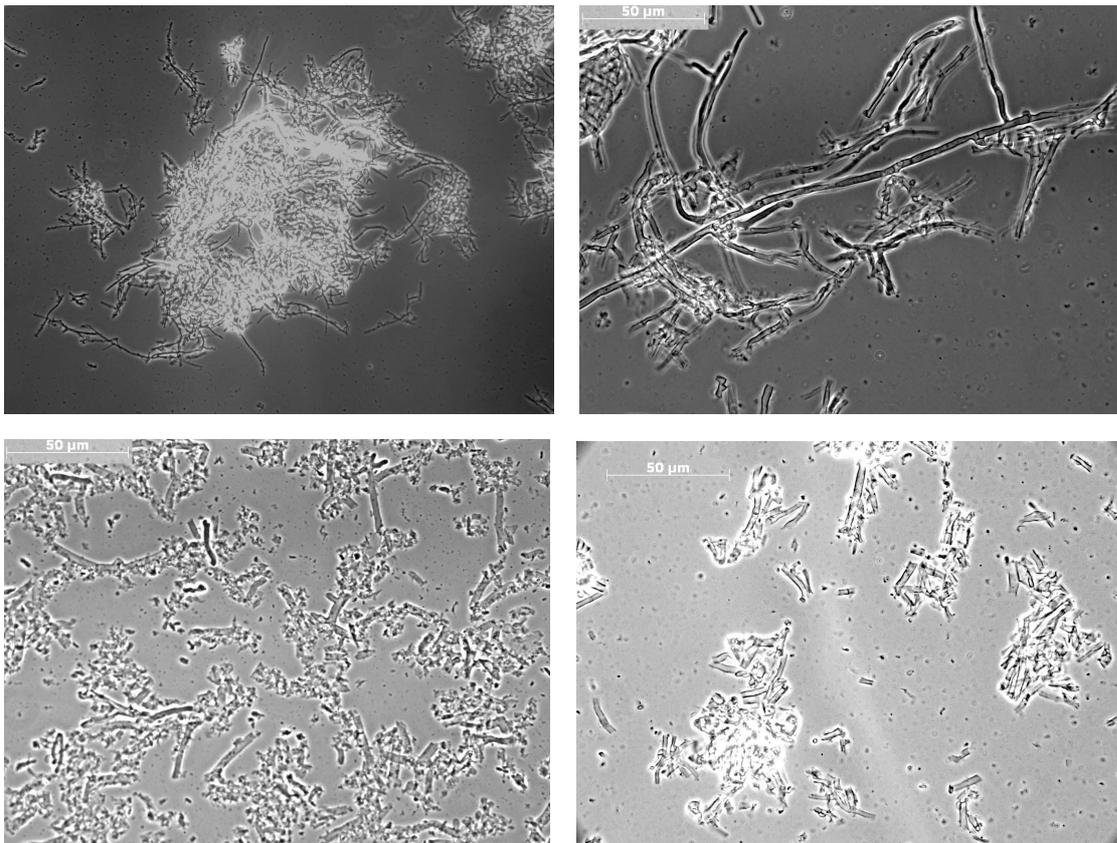


Abbildung 5.10 Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie nach Dispergierung mit Ultra Turrax (links oben: Vergrößerung 200x; rechts oben: Vergrößerung 630x), nach Zellaufschluss mit der Kugelmühle (links unten: Vergrößerung 630x) und nach Lyophilisierung (rechts unten: Vergrößerung 630x)

5.2.5 Variation des Biotransformationssystems

Die Produktbildungskinetik mit Lyophilisat wurde über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Nach ca. 9 h wurden maximale Ausbeuten an (+)-Nootkaton erreicht (Abbildung 5.11).

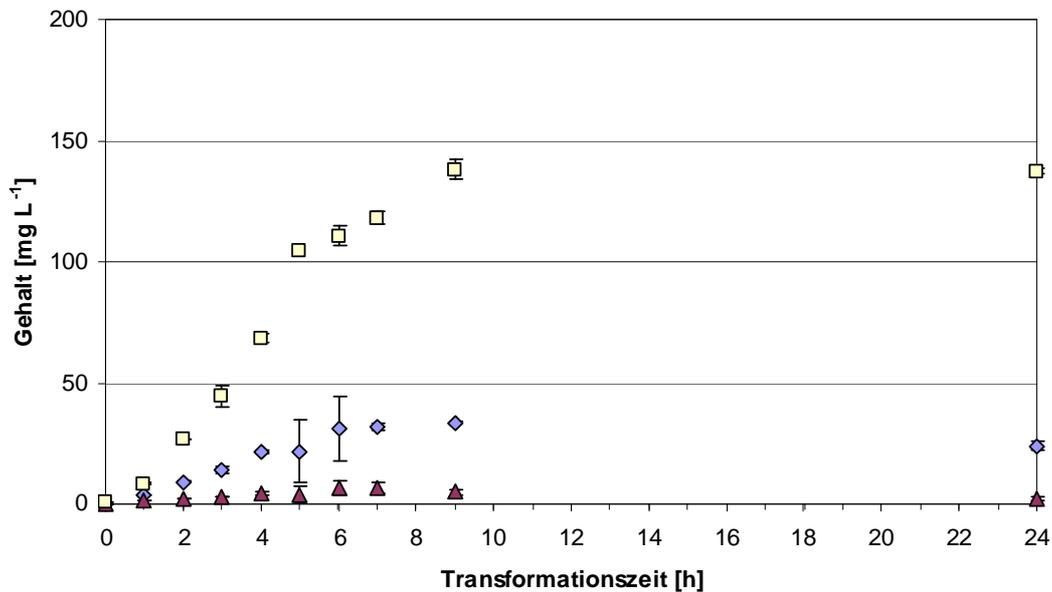


Abbildung 5.11 Ausbeuten an (+)-Nootkaton in Abhängigkeit von der Transformationsdauer; Transformation von 1,4 μL (+)-Valencen mit 25 mg Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS pH 7,5 unter Zusatz von 1 g Glasperlen (0,25 – 0,50 mm) bei 150 U min^{-1} , $24 \text{ }^\circ\text{C}$ für 1 - 24 h;
 —◇— α -Nootkatol —▲— β -Nootkatol —□— (+)-Nootkaton

5.2.5.1 Puffer und Emulgatoren

Zur Optimierung der Transformation von Valencen zu Nootkaton wurden unterschiedliche Puffer mit verschiedenen pH-Werten eingesetzt (Abbildung 5.12). Maximale Nootkatonausbeuten wurden bei einem pH-Wert im Transformationsansatz von pH 9 erzielt. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit VE-Wasser erzielt. Da das Transformationsergebnis in Leitungswasser deutlich schlechter ist, ist zu vermuten, dass die Enzymreaktion durch bestimmte Salze gehemmt wird. Bekannt ist, dass Natriumchlorid sich negativ auf die Nootkatonausbeute auswirkt. Die unterschiedlichen Puffer hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Ergebnis.

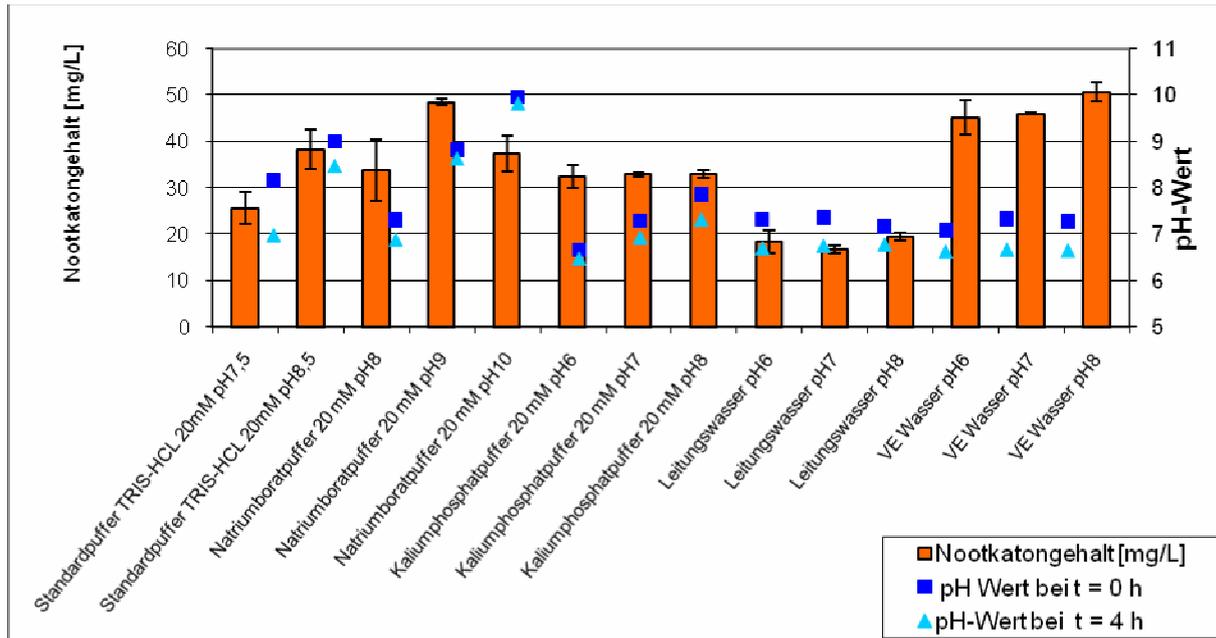


Abbildung 5.12 Transformation von Valencen 70 in unterschiedlichen Puffern

Da durch die Dispergierung des Valencens zusammen mit der Biofeuchtmasse die Enzymaktivität deutlich gesteigert wurde, sollte geprüft werden, ob durch den Einsatz von Emulgatoren eine weitere Erhöhung möglich ist. Der Zusatz dieser Emulgatoren hatte keinen Einfluss auf die Nootkatonausbeute (Abbildung 5.13, Abbildung 5.14). Da Emulgatoren die Aufarbeitung des Zielproduktes erschweren würden, kann das erhaltene Ergebnis positiv interpretiert werden.

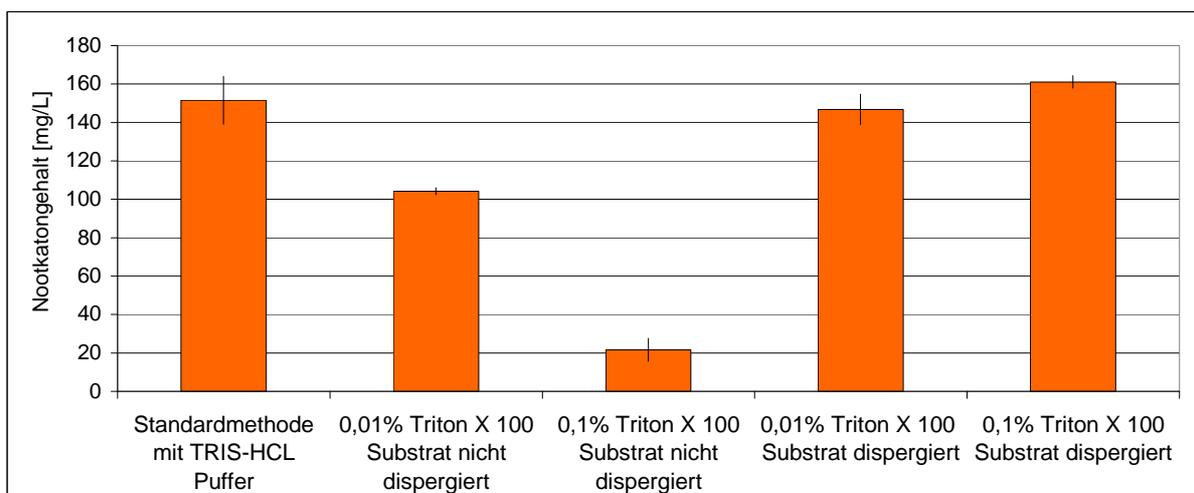


Abbildung 5.13 Transformation von Valencen 70 unter Zusatz von Triton® X-100

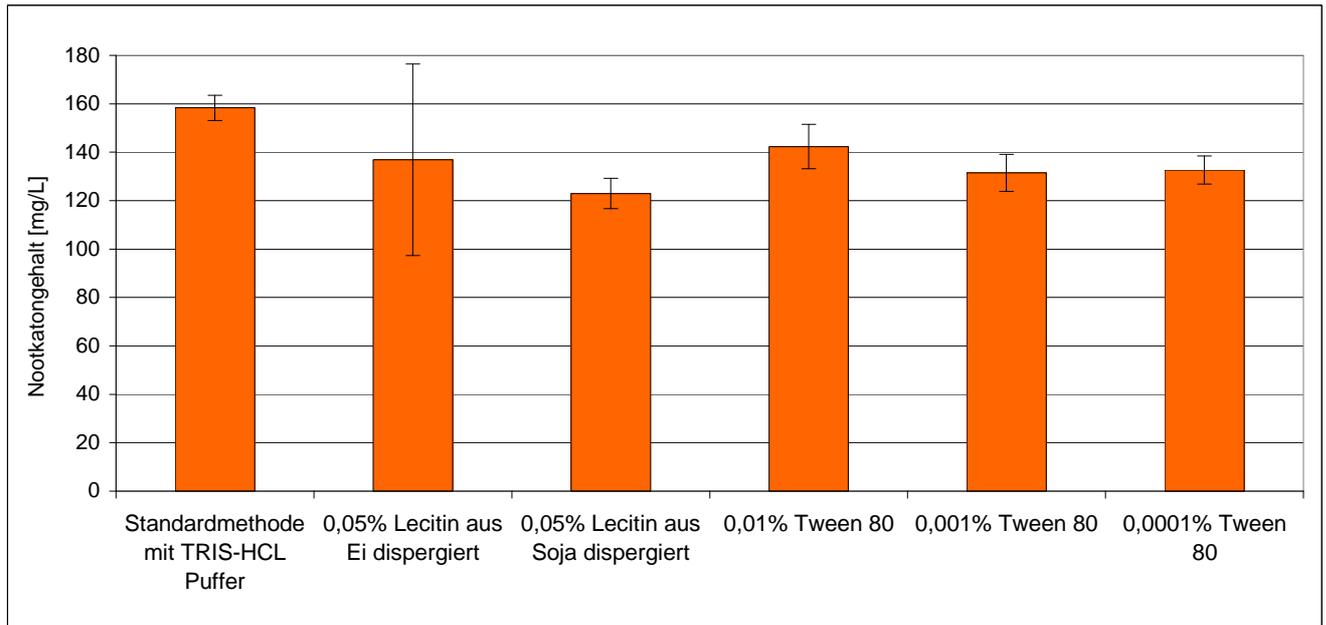


Abbildung 5.14 Transformation von Valencen 70 unter Zusatz von Lecithin und Tween® 80

5.2.5.2 Cofaktorabhängigkeit

(+)-Valencen wurde mit Lyophilisaten für 12 und 24 h in Gegenwart äquimolarer NAD- oder NADP-Konzentrationen (5,25 mM) transformiert bzw. erst nach 12 h zugesetzt. Die Zugabe von NAD(P) führte zu keiner Erhöhung der Transformationsaktivität (Abbildung 5.15).

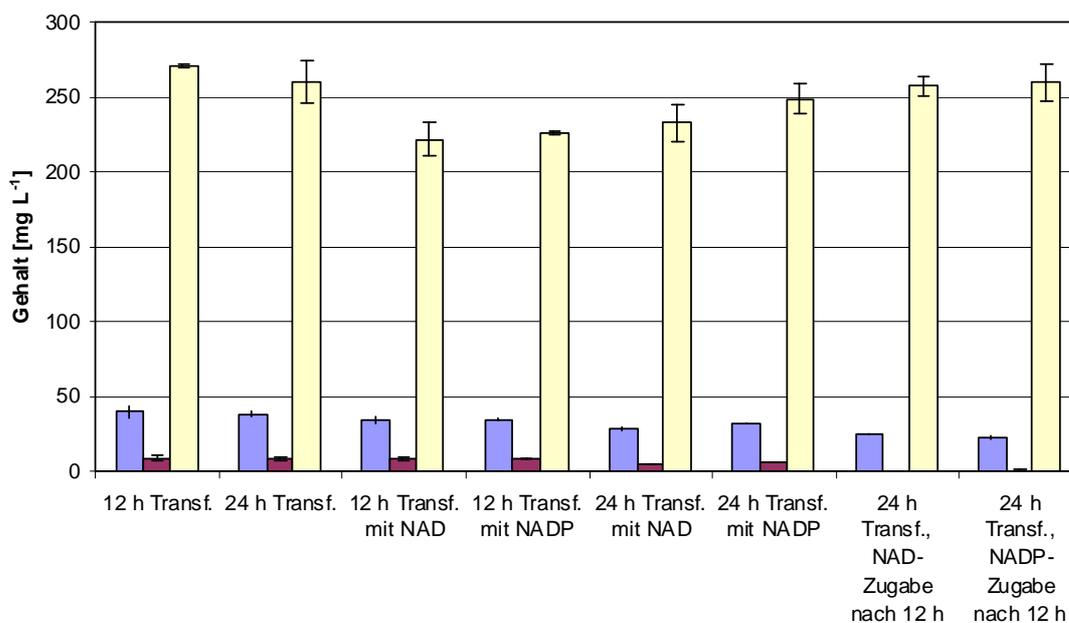


Abbildung 5.15 Einfluss von Cofaktoren auf die Produktausbeuten; Transformation von 2,5 μL (+)-Valencen mit 50 mg Lyophilisat mit und ohne Zusatz von NAD(P) (5,25 mM) in 1,5 mL 50 mM TRIS pH 7,5 bei 150 U min^{-1} , $24 \text{ }^\circ\text{C}$ für 12 oder 24 h; ■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Analoge Experimente mit einer 1 mM Cofaktorkonzentration führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Cofaktoren NAD(P)H untersucht. Bei der Zugabe von NADH (1 mM) zu Beginn der Transformation (Gesamttransformationsdauer 12 und 24 h) wurde eine Abnahme der Gehalte an (+)-Nootkaton von 30 und 20% beobachtet. In Gegenwart von NADPH zu Beginn der Transformation wurde die Aktivität nahezu vollständig inhibiert.

5.2.5.3 Dosierung von Substrat und Biokatalysator

Einmalige Dosierung

Zur Biotransformation mit Hilfe von Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* wurden Substratvolumina von 1 bis 10 μL eingesetzt. Die höchste Nootkatonkonzentration wurde mit 4 μL ($322 \text{ mg L}^{-1} \text{ 24 h}^{-1}$, 18 mol%) Valencen beobachtet (Abbildung 5.16). Das Maximum der Nootkatonausbeute ($150 \text{ mg L}^{-1} \text{ 24 h}^{-1}$, 33 mol%) wurde bei einer Dosierung von 1 μL (+)-Valencen bestimmt.

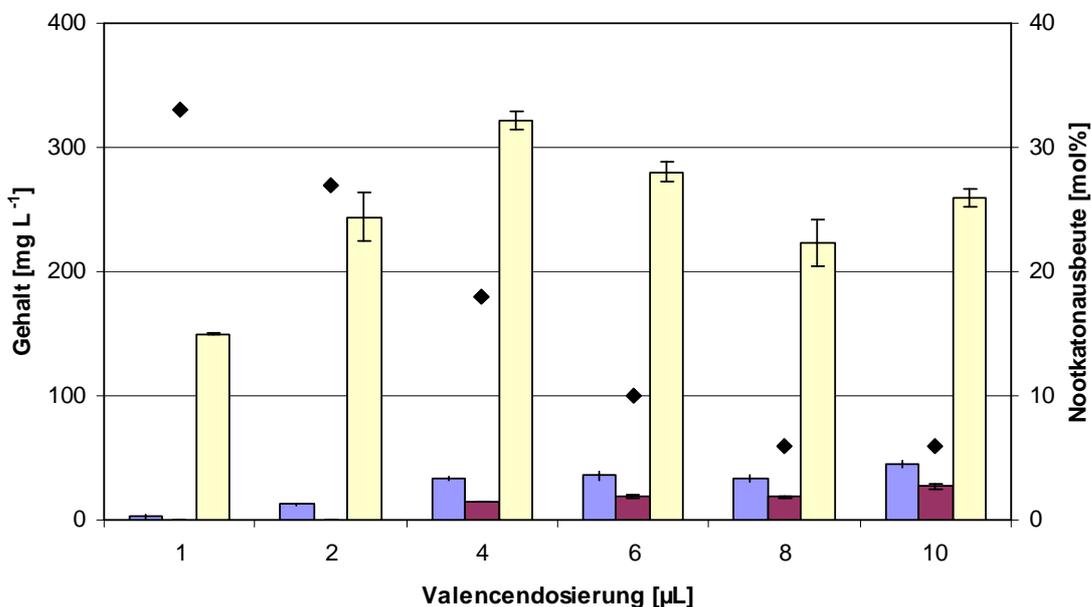


Abbildung 5.16 Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Substratdosierung; Transformation von (+)-Valencen mit 50 mg Lyophilisat in 1,5 mL 20 mM TRIS pH 7,5 bei 300 U min^{-1} , $24 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 h; ■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton ◆ molare Ausbeute

Zweimalige Dosierung

Die höchste Produktkonzentration und molare Ausbeute wurde bei einer Zweischrittdosierung von 25 + 25 mg Lyophilisat beobachtet ($721 \text{ mg L}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$). Hier betrug die Steigerung im Vergleich zu einer *Batch*-Transformation (50 mg Lyophilisat) erneut ca. 200% (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Vergleich der Ausbeuten an (+)-Nootkaton in Abhängigkeit von der Dosierungsstrategie (Lyo. = Lyophilisat, Transf. = Transformationsdauer)

	Gehalt [mg L^{-1}]	Molare Ausbeuten [%]	Produktivität [$(\text{mg L}^{-1}) (\text{mg Lyo.})^{-1} \text{ h}^{-1}$]
[50 mg Lyo., 5 μL , 0 h], 12 h Transf.	354	15	0,6
[50 mg Lyo., 5 μL , 0 h], 24 h Transf.	315	14	0,3
	238	10	0,2
[75 mg Lyo., 5 μL , 0 h], 24 h Transf.	198	9	0,1
[(25 mg Lyo., 2,5 μL , 0 h) + (25 mg Lyo., 2,5 μL , 12 h)], 24 h Transf.	587	26	0,5
[(50 mg Lyo., 5 μL , 0 h) + (25 mg Lyo., 12 h)], 24 h Transf.	586	26	0,3
	598	26	0,3
[(25 mg Lyo. + 2,5 μL , 0 h) + [(25 mg Lyo. + 2,5 μL , 12 h)], 24 h Transf.	455	20	0,3
[(25 mg Lyo. + 5,0 μL , 0 h) + [(25 mg Lyo., 12 h)], 24 h Transf.	721	31	0,6
[(50 mg Lyo. + 2,5 μL , 0 h) + [(2,5 μL , 12 h)], 24 h Transf.	416	18	0,3

Fed-batch Dosierung

Durch eine *fed-batch* Substratdosierung wurde die Konzentration an (+)-Nootkaton im Vergleich zur Zweischrittdosierung erneut gesteigert. Die Zugabe von 5 μL (+)-Valencen zu Beginn der 24-stündigen Transformation und erneute Substratdosierung nach 4, 8, 12, 16 und 20 h ergab einen Gehalt von 886 mg L^{-1} (13 mol%) (+)-Nootkaton (Abbildung 5.17).

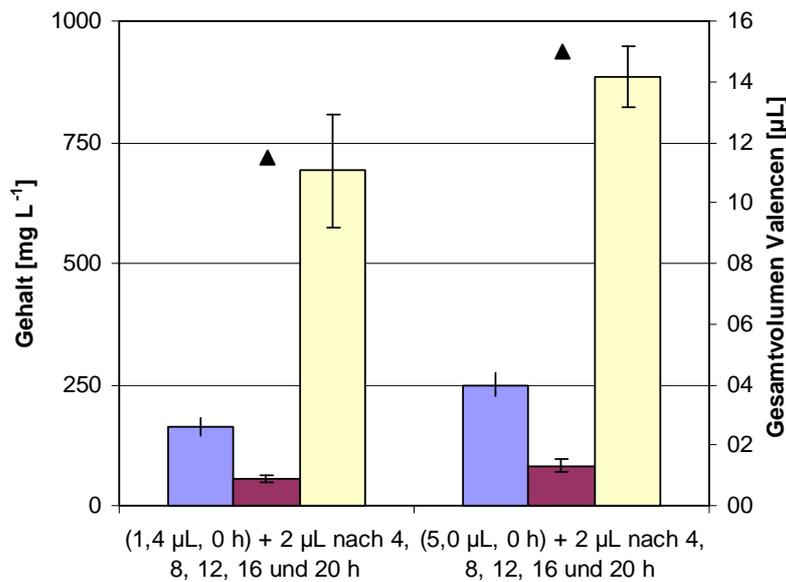


Abbildung 5.17 Produktausbeuten in Abhängigkeit von der Substratdosierung; Transformation von (+)-Valencen mit 50 mg Lyophilisat in 1,5 mL 50 mM TRIS pH 7,5 bei 300 U min⁻¹, 24 °C für 24 h;
 ■ α-Nootkatol ■ β-Nootkatol ■ (+)-Nootkatol ▲ (+)-Valencen

5.2.5.4 Scale-up der Biotransformation

Lyophilisate

Der Maßstab der Biotransformation von (+)-Valencen mit Lyophilisat wurde von 1,5 mL auf 250 mL Transformationspuffer linear vergrößert. Dazu wurde die Reaktion in einem 500-mL-Bioreaktor ohne Begasung durchgeführt. Die Transformation in 250 mL Puffer führte zu vergleichbaren Ausbeuten und war problemlos möglich (Abbildung 5.18).

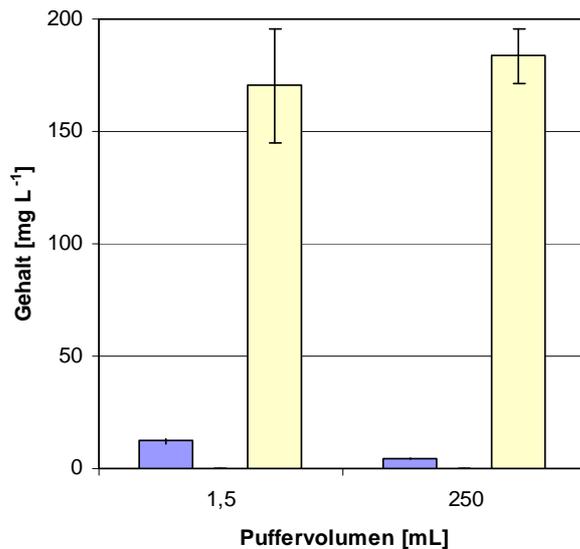


Abbildung 5.18 Produktausbeuten in Abhängigkeit vom Puffervolumen; Transformation von 1,4 μ L (+)-Valencen mit 25 mg Lyophilisat in 1,5 mL Puffer bei 150 U min⁻¹ sowie 233,3 μ L Valencen mit 4166,7 mg Lyophilisat in 250 mL Puffer bei 500 U min⁻¹; 50 mM TRIS pH 7,5, 24 °C für 24 h; ■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Dispergierte Biofeuchtmasse

In einem Folgeversuch erfolgte unter optimierten Dispergierungsbedingungen die Transformation mit einmaliger Substratzugabe in einem 150-mL-Reaktionsansatz (Abbildung 5.19).

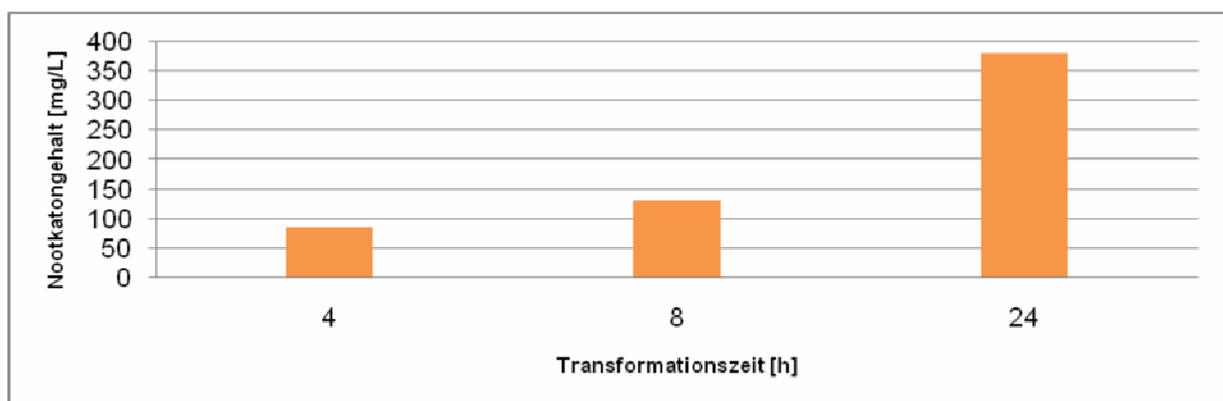


Abbildung 5.19 Transformation von Valencen 70 mit Biofeuchtmasse im 150-mL-Ansatz

Auch mit homogenisierter Biofeuchtmasse war ein *Scale-up* des Biotransformationsansatzes auf 200 mL ohne Aktivitätseinbußen problemlos möglich (Abbildung 5.20).

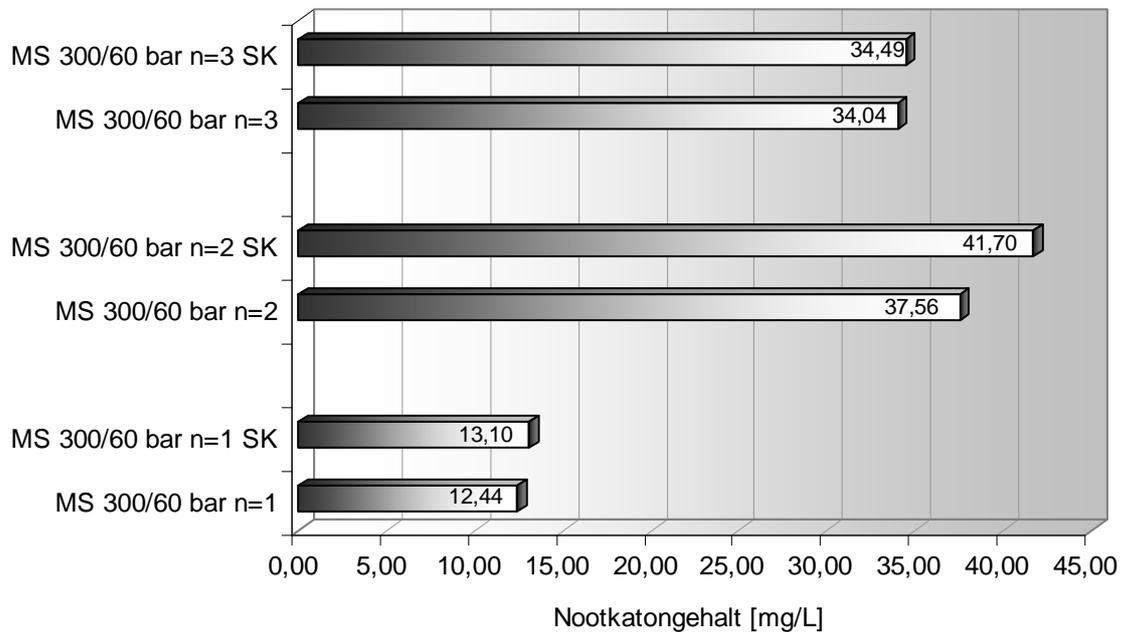


Abbildung 5.20 Scale-up der Biotransformation mit homogenisiertem Pilzmyzel (bis zu 3 Passagen, Homogenisation mit Valencen $500 \mu\text{L L}^{-1}$), SK = 200-mL-Schüttelkulturansatz

5.3 Identifikation des Zielenzyms und spezifischer Nachweis

5.3.1 Molekulare Charakterisierung

Der Überstand von rehydratisiertem Lyophilisat (*P. sapidus*) wurde mit Ionenaustausch-Chromatographie mit einem schwachen Anionenaustauscher, gefolgt von einem zweiten Ionenaustausch-Chromatographie-Schritt mit einem starken Kationenaustauscher gereinigt. Fraktionen mit Aktivität wurden vereint und durch Gelfiltration an einer Superdex-200-Säule getrennt. Nach Kalibrierung der verwendeten Trennsäule entsprach das Peakmaximum (30 min, Abbildung 5.21) einem Molekulargewicht von 54 kDa.

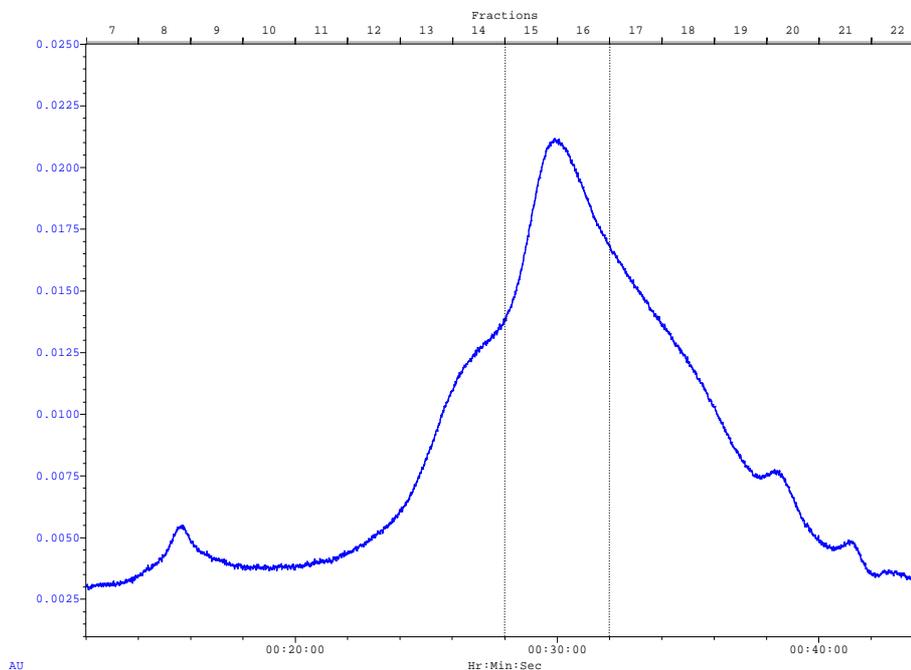


Abbildung 5.21 FPLC-Chromatogrammausschnitt der dritten Stufe der 3-Stufenreinigung von separiertem Überstand an einer Superdex-200-Säule; Laufpuffer: 200 mM TRIS-HCl, pH 7,5, Flussrate: 0,5 mL min⁻¹, Probenvolumen: 200 µL, Fraktionsgröße: 1,0 mL; — UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm)

Nach dem letzten Reinigungsschritt wurden die Protein enthaltenden Fraktionen (08, 09 und 12 - 22) auf Enzymaktivität getestet. Signifikante Konzentrationen an Transformationsprodukten konnten nur unter Verwendung der Fraktionen 15 und 16 detektiert werden. (Abbildung 5.22)

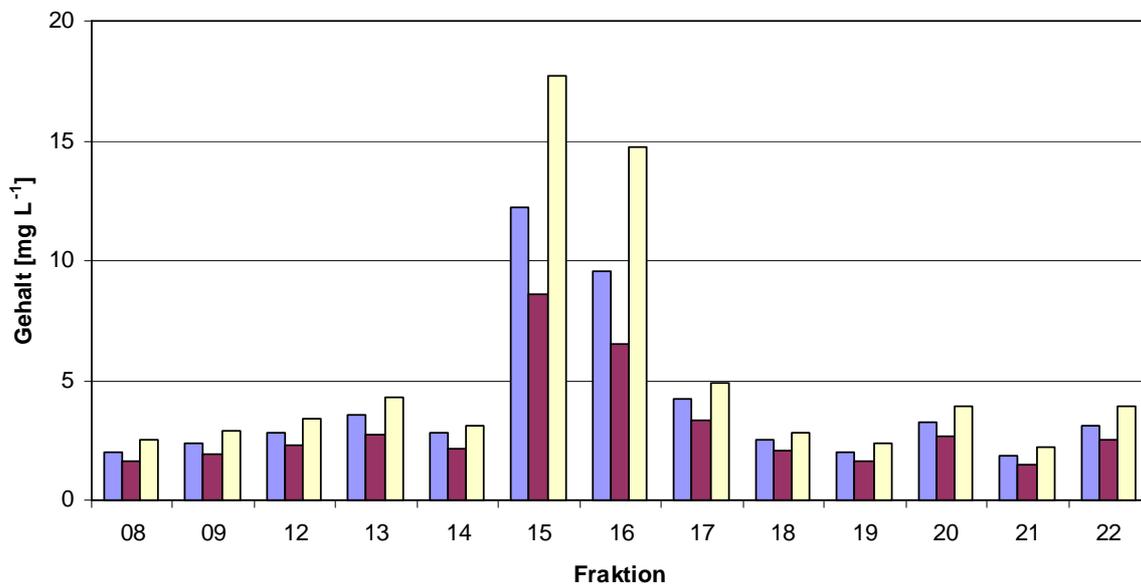


Abbildung 5.22 Produktausbeuten nach Transformation mit FPLC-Fraktionen der 3. Reinigungsstufe; Transformation von 1 μL (+)-Valencen in einem Volumen von 1,5 mL für 20 Stunden; Puffer: 20 mM TRIS-HCl, pH 7,5; ■ α -Nootkatol ■ β -Nootkatol ■ (+)-Nootkaton

Für die SDS-Analysen wurden die Fraktionen 12 bis 19 mit E-Pure-Wasser umgepuffert und auf 80 μL konzentriert. Diese Konzentrate wurden zur denaturierenden SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung (Abbildung 5.23), zur nicht-denaturierenden SDS-PAGE mit anschließender spezifischer Färbung für Häm-/Metalloenzyme (Abbildung 5.24) und für die Sequenzierung ausgewählter Proteinbanden nach denaturierenden SDS-PAGE und anschließender Färbung mittels Coomassie eingesetzt.

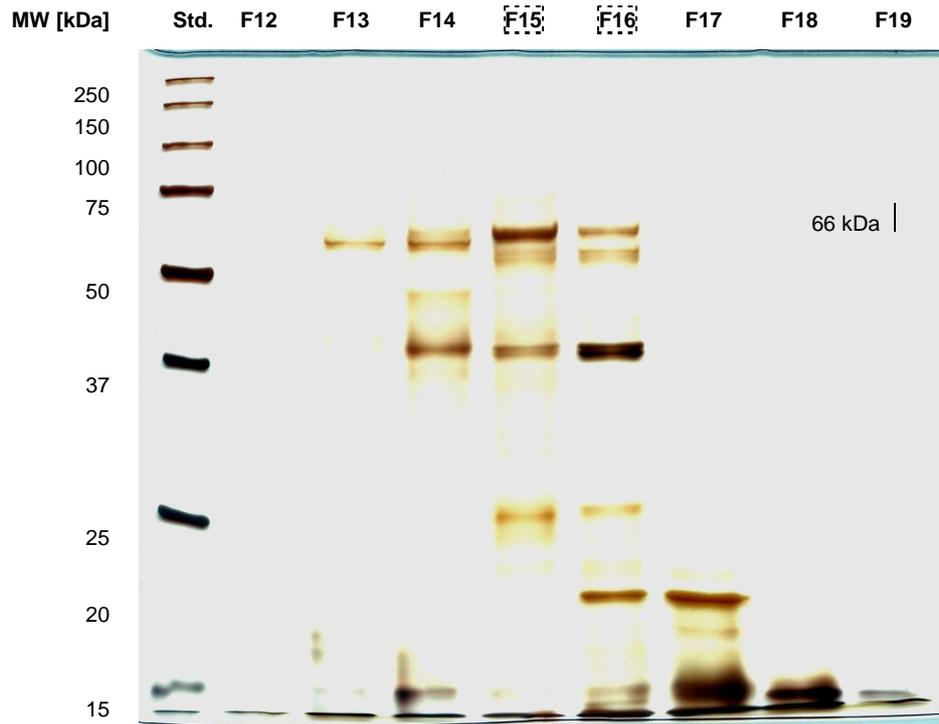


Abbildung 5.23 Gel (12%ig) der SDS-PAGE nach 3-stufiger Proteinreinigung mittels FPLC mit anschließender Silberfärbung; MW = Molekulargewicht, Std. = Standard (1 μ L), Fxx = Fraktion Nr. xx (je 15 μ L), Fxx = aktive Fraktionen

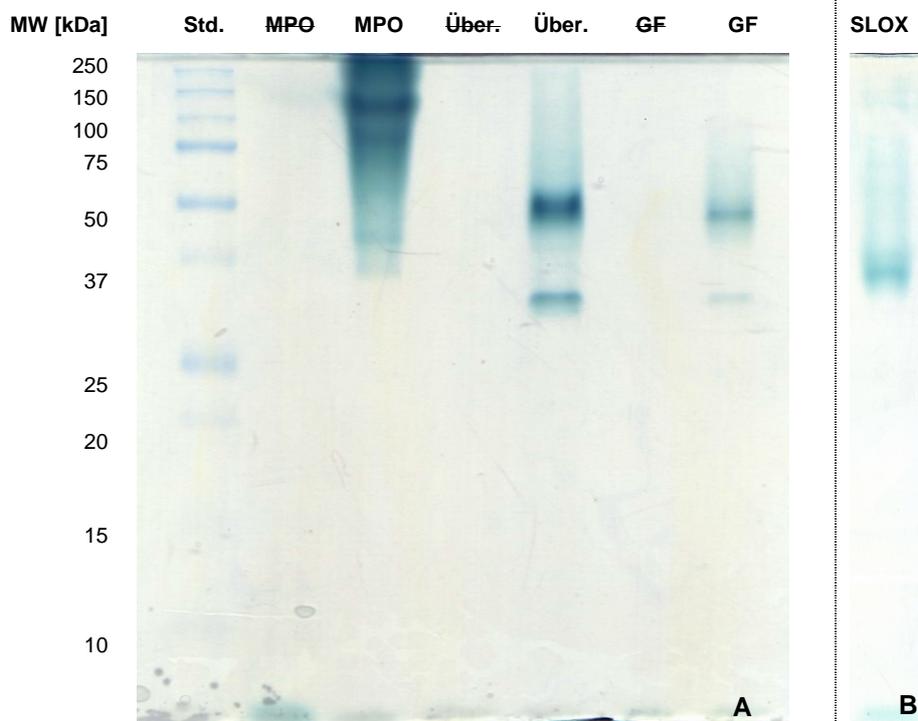


Abbildung 5.24 **A**: Gel (12%ig) der SDS-PAGE nach 3-stufiger Proteinreinigung mittels FPLC mit spezifischer Färbung für Häm-/Metallenzyme (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin); MW = Molekulargewicht des Standards, Std. = Standard (4 μ L), MPO = Meerrettich-Peroxidase (15 μ L, 345 mU), Über. = separierter Überstand (15 μ L), GF = vereinte aktive Fraktionen aus der 3. Reinigungsstufe (Gelfiltration, 15 μ L), XXX = entsprechende Probe vor SDS-PAGE 5 min auf 95°C erhitzt; **B**: Gel (12%ig) der SDS-PAGE mit anschließender Färbung für Häm-/Metallenzyme; SLOX = Lipoxygenase aus Sojabohnen (20 μ L, 85 mU)

Verglichen wurde separiertes Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* mit der über drei chromatographische Stufen gereinigten Enzymprobe. Als Positivkontrollen dienten das hämhaltige Enzym Meerrettich-Peroxidase und eine Lipoxygenase aus Sojabohnen (Abbildung 5.24B). Anhand der spezifischen Färbung wurden zwei Proteine als Metallenzyme identifiziert, die ebenfalls nach der chromatographischen Reinigung über drei Stufen nachgewiesen werden konnten. Ein Erhitzen der Proben vor der Applikation führte jeweils zum Verlust der Aktivität.

Ausgehend von einem Vergleich der Peptidsequenzen 66-1 und 66-3 (siehe Tabelle 4.7) die nach Trypsinverdau einer *de novo* Sequenzierung mittels "Electro-spray-tandem-Massenspektrometrie" (ESI-MS-MS) ermittelt wurden, mit der Sequenz einer Lipoxygenase aus *Aspergillus fumigatus* (XP_746844.1; Abbildung 5.25) wurden degenerierte Primer abgeleitet und im PCR-Screening eingesetzt.

<i>A. fumigatus</i>	TSVTIYNRELIKRKDLRAGGEKQDQKHKVTDEAHDWAWRYAKTCVQCSDWLRHEVTVHLT	420
<i>P. sapidus</i>	-----	
<i>A. fumigatus</i>	NTHMIEEAIIVASHRQLDPDHPVMLLLYPHWQKTLALNAAARNTLVPHVIVDLIGFQASE	480
<i>P. sapidus</i>	-----	
<i>A. fumigatus</i>	GFAFIRHAYENFDFKGRYVPTDLRQ RGFPPEELDSPKFHNYAYARCINSMWHKIRSYVD	540
<i>P. sapidus</i>	----- -GFPVDQLNSPK- -----	11
	Peptid 66-1 *** :*:***	
<i>A. fumigatus</i>	MLALAYPGTDADHKVRNDQCIQAWSDEMRSDDGARLPSFPTISTFEELVDCVTMCIHIAS	600
<i>P. sapidus</i>	-----	
<i>A. fumigatus</i>	PQHTAVNYLQNYQSFVVKPPCLYTEPPTSLSL LYTEKELVEALPMNHPREWLLASH	660
<i>P. sapidus</i>	----- -YTESDLMAALPLN- -----	24
	Peptid 66-3 ***.:*:***:	
<i>A. fumigatus</i>	IPYLLSFKPGNKESLIVYAASKFRVYHNKPTEKDQAIAAATGKFNTALAESQEEFKRYGQ	720
<i>P. sapidus</i>	-----	
<i>A. fumigatus</i>	ATDDWETVEYEVLSPEWNAVSILI	744
<i>P. sapidus</i>	-----	

Abbildung 5.25 Alignment der Peptidsequenzen 66-1 und 66-3 aus *P. sapidus* mit der Sequenz einer Lipoxygenase aus *A. fumigatus* (XP_746844.1) mittels ClustalW (Thompson et al. 1994)

Durch Primer Walking wurde die kodierende Sequenz der cDNA mit einer Länge von 1191 bp beziehungsweise 396 Aminosäuren ermittelt. Die erhaltene Sequenz wurde erneut Homologievergleichen unterzogen und als Fragment einer Oxygenase identifiziert. (Abbildung 5.26). Die übersetzte Proteinsequenz zeigte eine Homologie von ~ 50% zu einer Oxygenase aus dem Basidiomyceten *Laccaria bicolor*.

Sequenz 1: cDNA-Sequenz

ATGCGGTACGGCTGTGCGGCGGTTGCATTATTCTACCTTACAGCAATGGGAAAAGCTGCACCCTTTGGCCATCATC
 CCCGACTACAAAGGCAGCATGGCCGCTTCGGTACCATCTTCAACAAACGTACCAATCCATTAGACATATCCGTG
 AATCAGGCTAACGACTGGCCATGGCGCTACGCCAAGACATGCGTCCTTTCTTCGGATTGGGCCCTCCACGAGATG
 ATCATCCATCTTAACAACACCCATCTTGTGGAAGAAGCAGTCATCGTGGCGGCACAGCGCAAACCTGTCCCCTTCA
 CACATCGTGTTCGGCTTTTGGAAACCACATTGGGTTGTACATTTGTCCCTCAATGCACTTGCAGCGCAGCGTCCTT
 ATCCCCGAAGTCATCGTTCCTATAGCTGGCTTCAGTGTCTCCTCATATCTTCCAATTCATCCGCGAATCATTACC
 AACTTCGACTGGAAGAGCCTCTACGTCCAGCGGACTTGGAGTCACGTGGTTTCCCCGTCGACCAACTCAACTCG
 CCGAAATTCACAACACTACGCCTATGCCAGGGATATCAACGATATGTGGACAACCTTGAAGAAGTTTGTATCGTCC
 GTTCTGCAGGATGCCCAATATTACCCGGATGATGCCTCGGTAGCTGGAGATACGCAAATTCAGGCCTGGTGTGAT
 GAGATGCGGTGCGGGATGGGTGCCGGGATGACAACTTCCAGAGTCGATCACAACAGTGGACGATCTGGTCAAC
 ATGGTCACAATGTGCATCCACATCGCTGCGCCTCAGCACACCCCGTCAACTACCTTCAGCAATACTATCAGACC
 TTCGTCTCCAACAAGCCATCAGCATTATTCTCGCCACTCCCGACCTCGATTGCTCAACTTCAGAAAACACCCGAA
 AGCGACCTGATGGCAGCTCTCCCTCTCAATGCCAAACGCCAGTGGTTACTCATGGCACAGATCCCGTATTTGCTT
 TCCATGCAAGTCCAAGAAGACGAAAATATCGTGACCTATGCTGCTAATGCATCAACTGATAAAGATCCCATCATC
 GCGAGCGCTGGTAGGCAGTTAGCTGCCGATTTGAAGAAACTCGCTGCGGTATTTTGGTGAATAGCGCTCAGTTA
 GATGATCAGAACACCCCATACGATGTCTCTGGCACCCGAGCAACTCGCAAATGCGATTGTAATTT**TGA**

Sequenz 2: Aminosäuresequenz

MRYGCAAAVALFYLTAMGKLHPLAIIIPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNQANDWPWRYAKTCVLSSDWALHEM
 I IHLNTHLVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVVTLSLNLARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESEFT
 NFDWKSLYVPADLESRGFPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKFKVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQAWCD
 EMRSGMGAGMTNFPESITTVDDLVMVMTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQTFVSNKPSALFSPLPSTIAQLQKYTE
 SDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQVQEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLVNSAQL
 DDQNTPYDVLAPQLANAIVI

Abbildung 5.26 cDNA- und Aminosäuresequenz einer Oxygenase aus *P. sapidus*, Start- und Stopcodon sind fett markiert

Basierend auf der Kristallstruktur der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen (PDB # 1YGE (13)) wurde ein dreidimensionales Proteinstruktur-Homologiemodell der Oxygenase von *P.sapidus* mit Swiss-Model berechnet (Abbildung 5.27). Die Oxygenase besteht aus zwei β -Sheets und zwölf α -Helices.

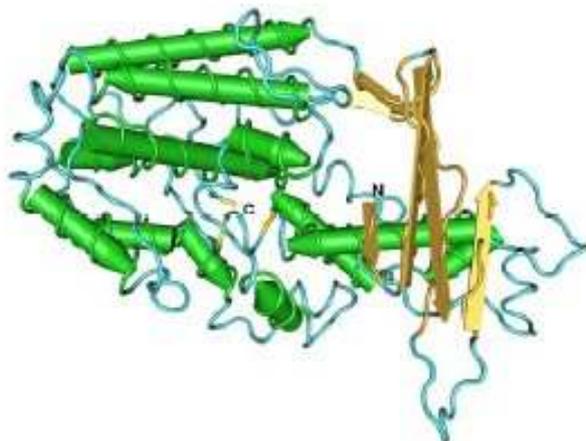


Abbildung 5.27 Dreidimensionales Proteinstruktur-Homologiemodell der Oxygenase aus *P. sapidus* basierend auf der Kristallstruktur der Lipoxygenase-1 aus Sojabohnen, berechnet mit Swiss Model

5.3.2 Herstellung eines spezifischen Antikörpers

Ausgehend von der ermittelten Aminosäuresequenz des Zielenzym und des daraus generierten 3-D-Strukturmodells wurde eine geeignete Peptidsequenz zur Produktion polyklonaler Antikörper ausgewählt. Die Peptidsynthese und die Immunisierung erfolgten durch die Firma BioGenes GmbH, Berlin. Die Titerbestimmungen der erhaltenen Seren mittels ELISA zeigten bis zu einer Verdünnung der Seren von 1:200.000 einen signifikanten Unterschied zu den Präimmunseren (Abbildung 5.28).

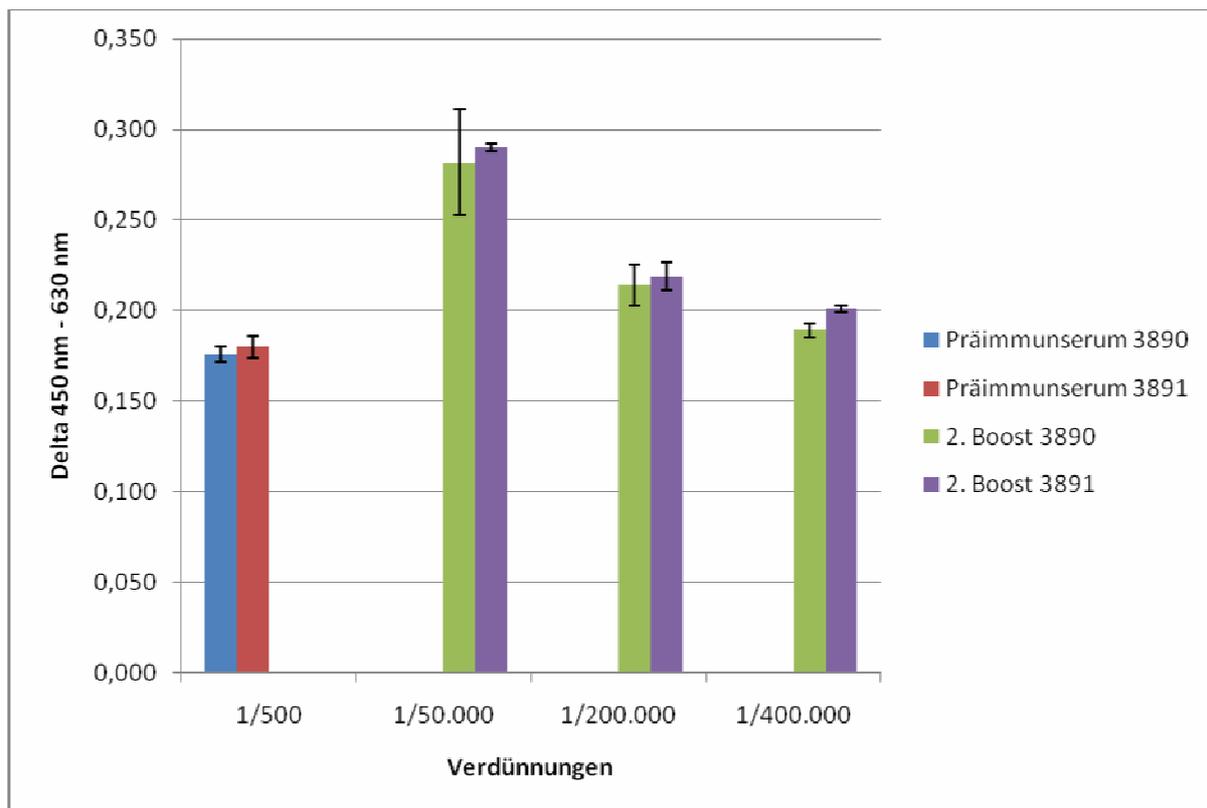


Abbildung 5.28 Titerbestimmung des polyklonalen Antikörpers nach der 2. Immunisierung mittels ELISA

5.3.3 SDS-PAGE/Westernblot: Untersuchungen zur Spezifität, Reproduzierbarkeit und Konzentrationsabhängigkeit des Antikörpers

Zum Nachweis der Oxygenase in Lyophilisaten von *Pleurotus sapidus* mittels SDS-PAGE und Westernblot wurden zwei verschiedene Visualisierungstechniken verwendet. Die freien Stellen der Westernblot-Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit 5% Milchpulver in TBS-T (Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung mit 0,1% Tween) geblockt und anschließend mit dem Antiserum (gelöst in 5% Milchpulver in TBS-T; Verdünnungsfaktor 10.000) für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach einem Waschschriff wurden eine Membran (Verdünnungsfaktor 1:10.000) für 1 h mit einem alkalischen Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für 10 min unter Lichtausschluss und Schütteln mit einem Farbreagenz (Mischung aus 4-Nitroblautetrazoliumchlorid-Lösung und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat-Dinatriumsalz-Lösung) angefärbt (Abbildung 5.29).

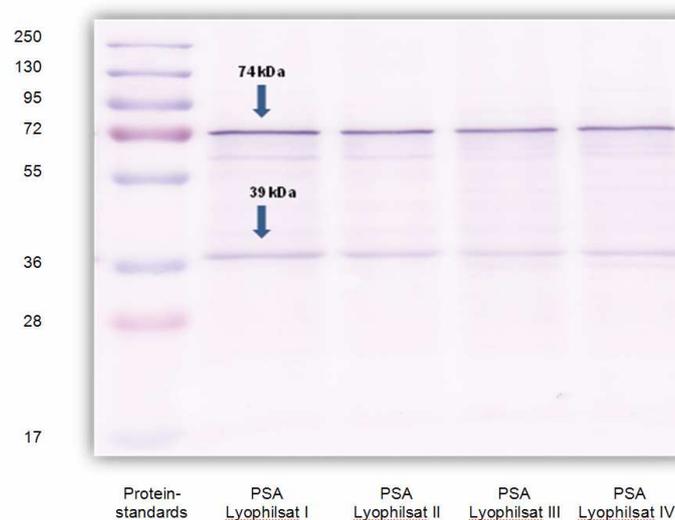


Abbildung 5.29 Westernblot von vier separat hergestellten, rehydratisierten PSA-Lyophilisaten

Alternativ zur Farbreaktion wurden die Banden mittels Chemilumineszenzreaktion auf einem Fotofilm entwickelt. Die Membranen wurden für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit einem Peroxidase-konjugierten (HRP) Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wurde ein Chemilumineszenz-HRP-Substrat zugegeben und die Proteinbanden auf einem Fotofilm entwickelt (Abbildung 5.30).

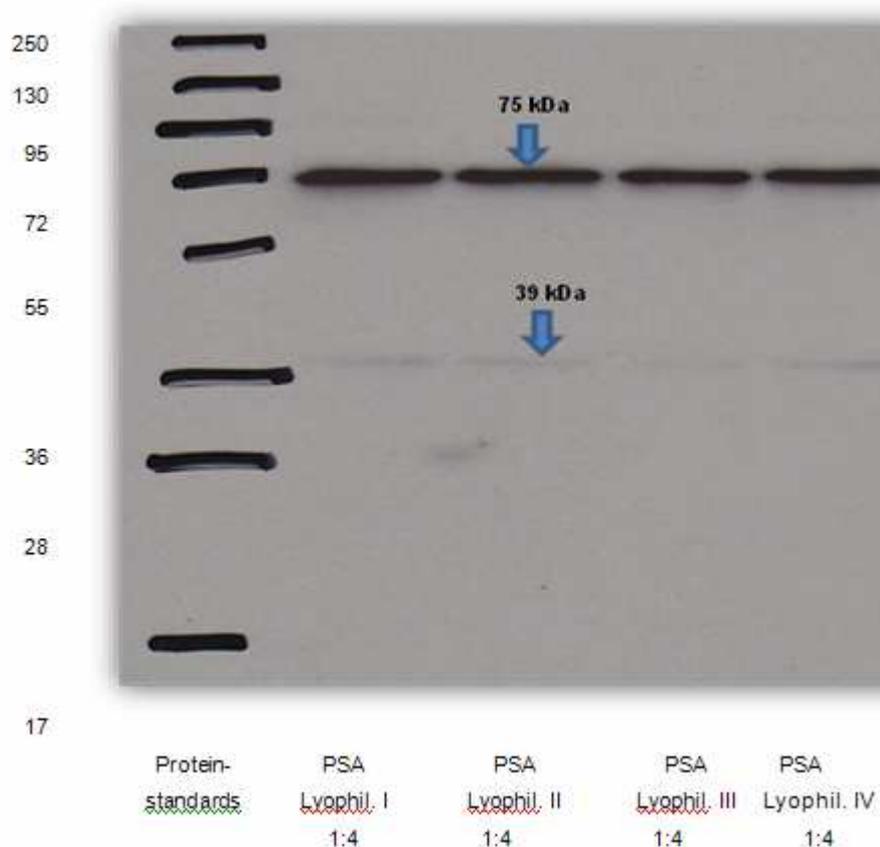


Abbildung 5.30 Westernblot von vier separat hergestellten, rehydratisierten PSA-Lyophilisaten (Chemilumineszfärbung)

Beide Entwicklungsverfahren erwiesen sich als gut geeignet. Die parallel hergestellten Lyophilisate zeigten spezifische und hoch reproduzierbare Färbungen. Die Größe des detektierten Enzyms stimmt gut mit den Resultaten der Proteinreinigung überein.

Zusätzlich wurde mittels Westernblot und anschließender Chemilumineszenzfärbung überprüft, ob eine Konzentrationsabhängigkeit von der eingesetzten Menge an Lyophilisat besteht. Dazu wurde Überstand von rehydratisiertem PSA-Lyophilisat mittels Ultrafiltration (MWCO 10 kDa) konzentriert und anschließend unterschiedliche Verdünnungen auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 5.31)

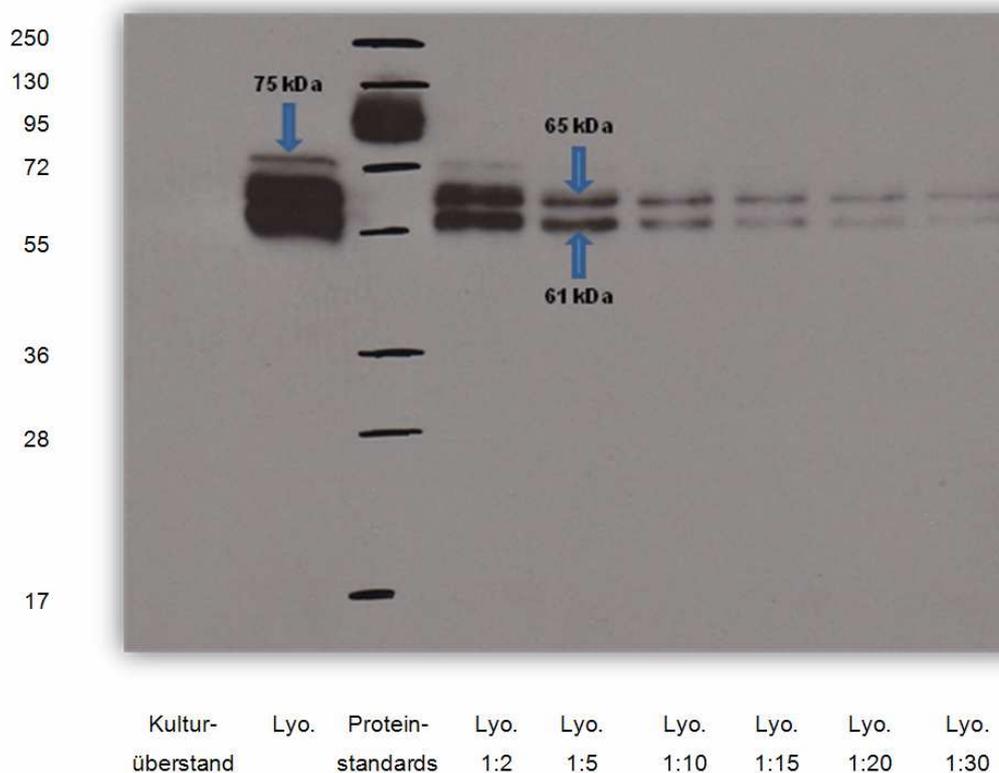


Abbildung 5.31 Westernblot von unterschiedlich stark konzentriertem, rehydratisiertem PSA-Lyophilisat (Lyo.) und PSA-Kulturüberstand als Blindprobe; Chemilumineszenzfärbung

Die Abnahme der Bandenintensität korrelierte gut mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor. Im Kulturüberstand war das Zielenzym nicht nachweisbar. Dies bestätigt erneut die intrazelluläre Lokalisierung des Zielenzym und die Resultate der gaschromatographischen Untersuchungen. Im Vergleich zu den vorher gezeigten Westernblots (Abbildung 5.29, Abbildung 5.30) fiel auf, dass die originäre Bande bei ~ 75 kDa durch die Ultrafiltration in zwei Banden geringeren Molekulargewichts zerfällt.

Da die spezifische Färbung mittels Antikörper hoch reproduzierbar und konzentrationsabhängig war, wurde untersucht, ob die Aktivität der Biomasse über den Kulturverlauf mit der Bandenstärke im Westernblot korrelierte. Dazu wurde PSA über 6 Tage submers kultiviert, täglich Biomasse geerntet und lyophilisiert.

Das Lyophilisat wurde einerseits zur Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton eingesetzt (Abbildung 5.32) und andererseits mittels SDS-PAGE/Westernblot analysiert (

Abbildung 5.33).

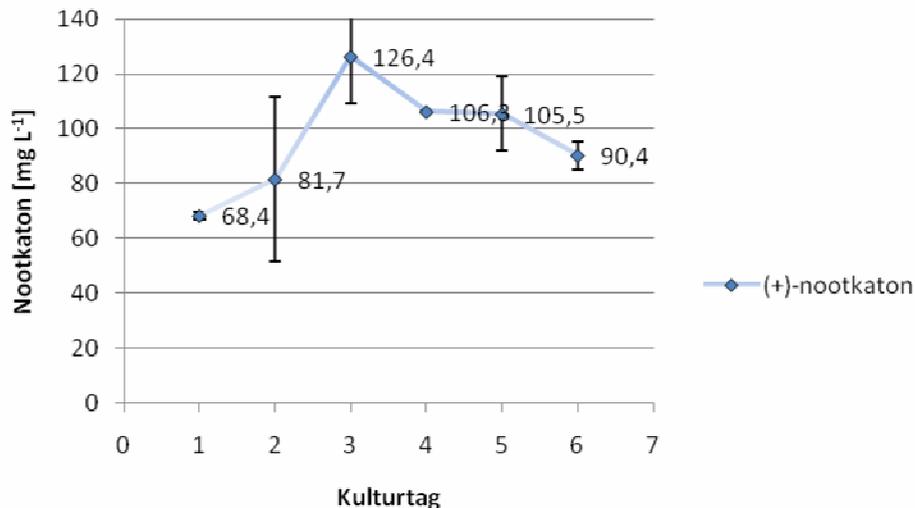


Abbildung 5.32 Nootkatonbildung nach Biotransformation von 1 μ L (+)-Valencen mit 50 mg PSA-Lyophilisat in 1,5 mL 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) für 24 h bei 24 $^{\circ}$ C und 150 U min⁻¹

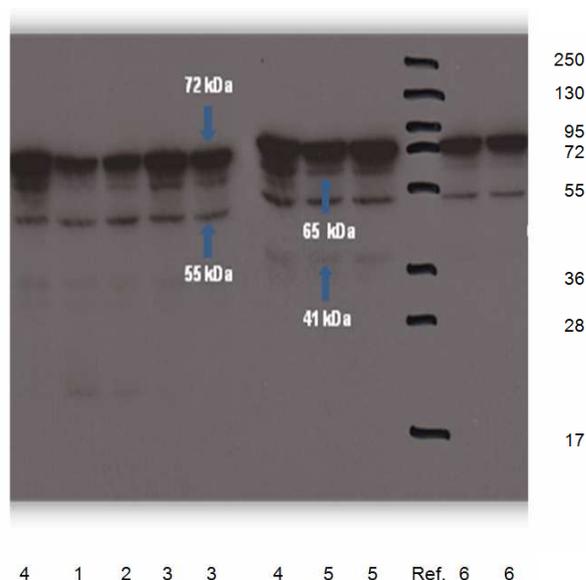


Abbildung 5.33 Westernblot von PSA-Lyophilisat, geerntet an unterschiedlichen Kulturtagen; Chemilumineszenzfärbung

Nach SDS-PAGE/Westernblot war eine leichte Degradation der Proteine zu erkennen. Die Dicke der Hauptproteinbanden korrelierte mit der bestimmten

Transformationsaktivität. In beiden Untersuchungen wurde die höchste Enzymaktivität am 4. Tag ermittelt.

In weiteren Versuchen sollten diese Erkenntnisse in die Etablierung eines Schnelltests (evtl. auf der Basis eines ELISA) zur Bestimmung des Kulturtages höchster Enzymaktivität münden können.

5.4 Aufklärung des Reaktionsmechanismus

Nach 16 h Inkubation der rehydratisierten Lyophilisate von *P. sapidus* mit (+)-Valencen [1] konnten gaschromatographisch als Hauptprodukte die beiden Nootkatole und Nootkaton identifiziert werden. Die Oxidation erfolgte mit hoher Regioselektivität spezifisch an C7, also einer der beiden allylischen Positionen im Ringsystem von (+)-Valencen (Abbildung 5.37).

Eine Beteiligung von P450-Aktivitäten zur Bildung der Nootkatole mit nachfolgender Oxidation zum Nootkaton erschien daher durchaus plausibel, konnte aber durch eine aktivitätsgeleitete dreistufige chromatographische Reinigung (siehe Abschnitt 4.4) der (+)-Valencen transformierenden Aktivität ausgeschlossen werden. Die Fraktionen wiesen keine merkliche Absorption zwischen 300 und 800 nm auf, was die Abwesenheit von Hämgruppen belegt. Eine elektrophoretisch reine Bande wurde ausgeschnitten, sequenziert und ausgewertet. Die beste Homologie wurde zu einer Lipoxygenase gefunden. Die zu erwarteten Hydroperoxide konnten in den Lösungsmittelextrakten mittels HRGC-MS nicht nachgewiesen werden.

Der gleiche Extrakt wurde daher zusätzlich mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Färbung mit Anisaldehyd oder einem Peroxid-spezifischen Reagenz (Huber und Fröhlke, 1972) analysiert. Es konnten neben den Nootkatolen und Nootkaton zusätzliche Spots detektiert werden. Die Huber-Färbung ergab jedoch nur eine diskrete Band bei $R_f=0,71$. Kontrollansätze mit hitzeinaktiviertem Lyophilisat blieben ohne Huber-Färbung (Abbildung 5.34).



Abbildung 5.34 Extrakte aus der Valencenbiotransformation. Als Laufmittel diente EtAc/Hexan(1:5). Gefärbt wurde mit einem Sprühreagenz zum Nachweis von Peroxiden (siehe Methoden).

Der Spot mit dem vermuteten Hydroperoxid war ausreichend von den anderen Substanzen getrennt und konnte daher von einer parallel entwickelten ungefärbten DC-Platte ausgekratzt, eluiert und somit isoliert werden. Die erneute HRGC-MS dieser Substanz ergab wieder die beiden Nootkatole und Nootkaton in annähernd demselben Verhältnis wie es auch im Standard-Biotransformationsansatz erzielt wurde (Abbildung 5.35). Dies legt den Schluss nahe, dass sich die vermuteten Hydroperoxide des (+)-Valencens nach Injektion in den Gaschromatographen zersetzen. Die Reduktion bzw. Oxidation der isolierten Substanzen, die vor Derivatisierung definitiv frei von Nootkatolen und Nootkaton waren, ergab im Falle der Reduktion die beiden Nootkatole, während bei der Umsetzung mit Cu(I) ausschließlich Nootkaton als Reaktionsprodukt entstand (Abbildung 5.35).

Das HPLC-Chromatogramm sowohl des konzentrierten Lösungsmittelextraktes der Biotransformation als auch des isolierten DC-Spots wies einen Peak [3] auf, dessen RI deutlich von denen der beiden nicht getrennten Nootkatole [4,4'], und dem des Nootkatons [5] abwich (Abbildung 5.36 A, B). Dieser Peak zeigte im UV-Spektrum des DAD ein Absorptionsmaximum bei 207 nm, das gut mit dem Literaturspektrum der diastereomeren (+)-Valencenhydroperoxide übereinstimmt. (Huang et al., 2001).

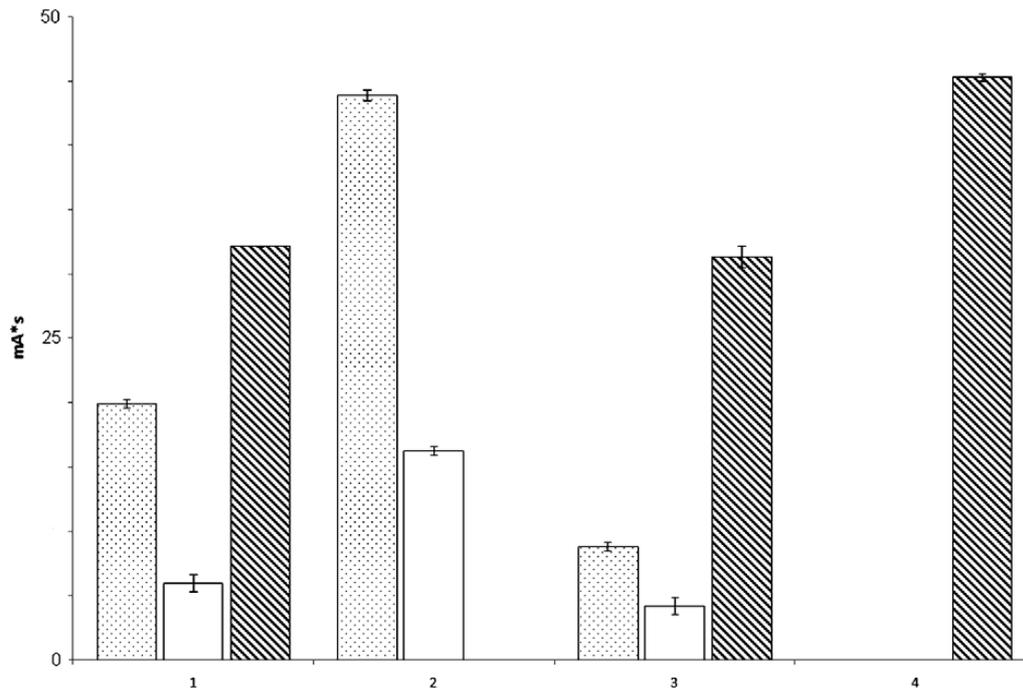


Abbildung 5.35 GC-FID Analyse der gereinigten Hydroperoxide (DC). Kontrollen: gereinigte Hydroperoxide ohne NaBH_4 (1) oder CuCl (3); (2) Huber Spot behandelt mit NaBH_4 ; (4) Huber Spot behandelt mit CuCl . α -Nootkatol [4'] (punktiert), β -Nootkatol [4] (weiß), Nootkaton [5] (schraffiert). Die relative Konzentration ist in mA^*s angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen vom jeweiligen Mittelwert der Doppelbestimmung.

Das APCI^+ -Spektrum der isolierten Substanz wies ein wenig ausgeprägtes protoniertes Molekülion (MH^+) bei m/z 237 auf, was sowohl mit dem Molgewicht für Valencenhydroperoxide als auch für Valencendiepoxide vereinbar ist (

Tabelle 5.4). Letztere können jedoch ausgeschlossen werden, da Epoxide kaum eine positive Huber-Reaktion zeigen. Die intensivsten Ionen wurden bei m/z 219 (Base Peak, BP) und m/z 203 (50% vom BP) gefunden und erklären sich durch die Abspaltung von Wasser ($\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}$) und Wasserstoffperoxid ($\text{MH}^+ - \text{H}_2\text{O}_2$) aus dem protonierten Molekülion.

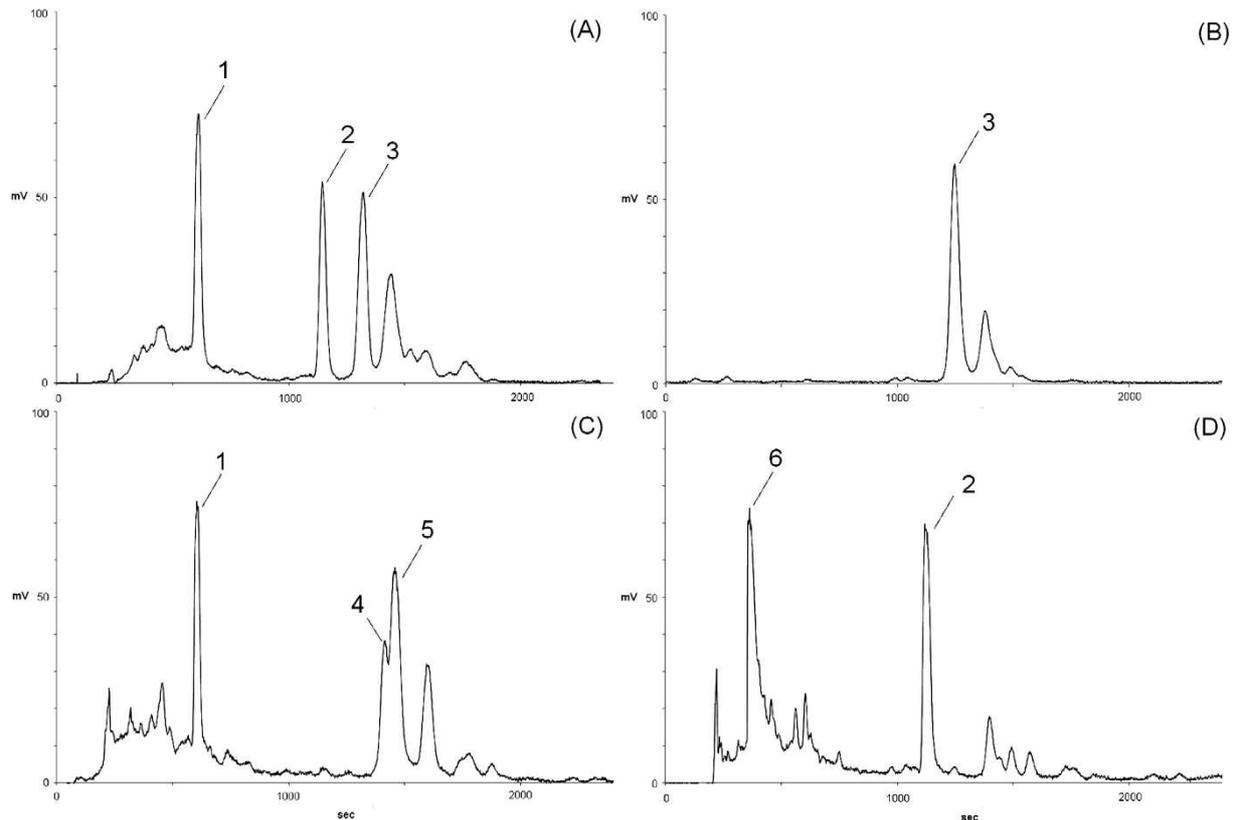


Abbildung 5.36 HPLC-DAD Chromatogramme (210 nm) von Biotransformationsextrakten: (A), isolierter DC-Spot mit Hydroperoxidaktivität (B), Biotransformationsextrakt gelöst in MeOH nach Umsetzung mit NaBH₄ (C), Biotransformationsextrakt gelöst in Pyridin nach Umsetzung mit CuCl (D). Peakzuordnung: (1) Thymol (Interner Standard); (2) Nootkaton [5]; (3) Sekundäre Hydroperoxide [3,3']; (4) α -Nootkatol [4']; (5) β -Nootkatol [4]; und 6 Pyridin (Lösungsmittel).

(+)-Nootkaton [5] und die beiden Nootkatole [4,4'] zeigten unter gleichen Ionisierungsbedingungen ebenfalls intensive Ionen bei m/z 203 und 219 (

Tabelle 5.4). Daher kann die Bildung dieser Ionen durch thermische Zersetzung der (+)-Valencenhydroperoxiden zu Nootkatol und Nootkaton noch vor der Ionisierung in der APCI-Quelle nicht ausgeschlossen werden. Die Detektion von (+)-Nootkaton [5] und α,β -Nootkatol [4,4'] in der HPLC zeigte ferner an, dass diese bereits zu erheblichen Teilen während der Biotransformation in Gegenwart aktiver Biomasse aus den Valencenhydroperoxiden [3,3'] gebildet wurden.

Tabelle 5.4 APCI+-Spektren der Hauptbiotransformationsprodukte von (+)-Valencen

Verbindung	[APCI ⁺ -Ionen], m/z	[%] des Basispeaks
α,β -Nootkatol [4,4']	[MH ⁺], 221	< 1
	[MH ⁺ + MeOH-H ₂], 251	5
	[MH ⁺ + MeOH-H ₂ O], 235	5
	[MH ⁺ -H ₂], 219	7
	[MH ⁺ -H ₂ O], 203	100
Nootkaton [5]	[MH ⁺], 219	100
	[MH ⁺ -H ₂], 217	30
	[MH ⁺ + MeOH], 251	37
Valencenhydroperoxide [3, 3']	[MH ⁺], 237	1
	[MH ⁺ -H ₂], 235	1
	[MH ⁺ + MeOH-H ₂ O], 251	25
	[MH ⁺ -H ₂ O], 219	100
	[MH ⁺ -H ₂ -H ₂ O], 217	25
	[MH ⁺ -H ₂ O ₂], 203	50

Den möglichen Reaktionsmechanismus der (+)-Valencendioxygenase zeigt Abbildung 5.37. Hier wird die mögliche Bildung tertiärer (+)-Valencenhydroperoxide [2,2'] postuliert. Bei der Lipoxygenase katalysierten Oxidation ungesättigter Fettsäuren ist die treibende Kraft für die Umlagerung der isolierten Doppelbindungen die Stabilisierung des primären diallylischen Radikals durch Konjugation. Im Falle der (+)-Valencendioxygenase kann lediglich das allylische Radikal an C7 zum tertiären Radikal stabilisiert werden, während das Radikal an C1 dies nicht vermag.

Tertiäre Hydroperoxide unterliegen jedoch einer schnellen Umlagerungsreaktion zu den korrespondierenden sekundären Hydroperoxiden (Schenk Umlagerung), so dass diese nicht nachweisbar waren.

Weder für die tertiären Hydroperoxide noch für die korrespondierenden Alkohole liegen spektrale Daten vor. Aus diesem Grund wurde der tertiäre β -Alkohol 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-ol synthetisiert. Mit Hilfe dieser Referenzsubstanz wurde gezielt nach dem tertiären Alkohol in Biotransformationsansätzen nach Reduktion mit NaBH₄ gesucht und dieser dann mittels GC-MS nachgewiesen. Er machte als Minorbestandteil ca. 4% der Peakfläche des β -Nootkatols [4] aus. Der entsprechende α -Alkohol konnte aufgrund der fehlenden Referenzsubstanz nicht identifiziert werden. Dennoch legt der Nachweis des β -Alkohols zumindest die temporäre Bildung von tertiären (+)-Valencenhydroperoxiden neben den nachgewiesenen sekundären Hydroperoxiden nahe.

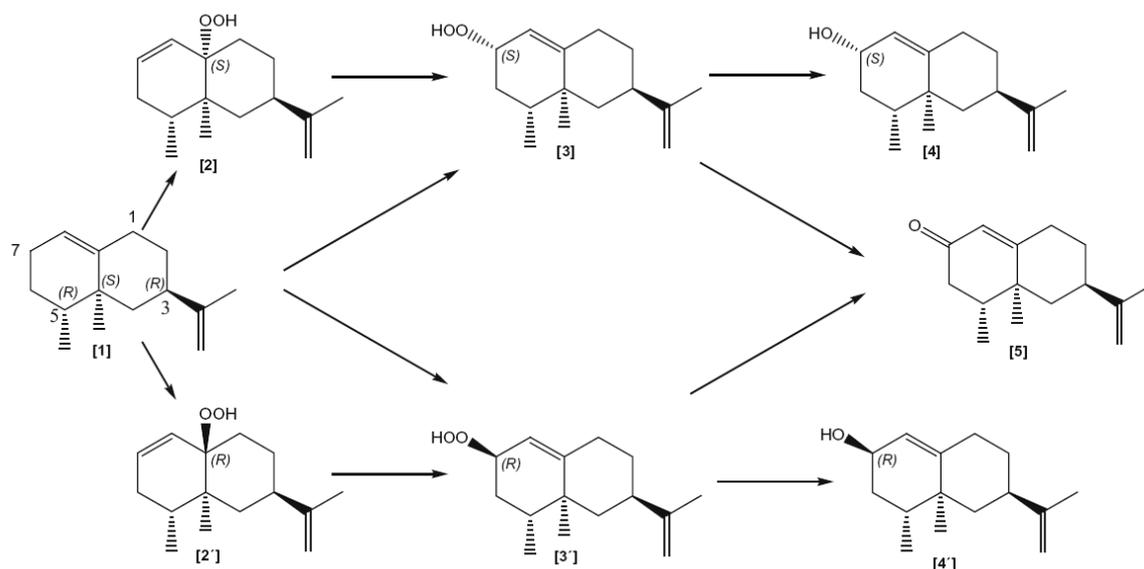


Abbildung 5.37 Reaktionsmechanismus und Produkte der neuen (+)-Valencendioxygenase aus *P. sapidus*. [1]: (+)-Valencen. [2]: 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(R)-yl-hydroperoxid. [2']: 2(R)-Isopropenyl-8(R),8a(S)-dimethyl-1,3,4,7,8,8a-hexahydro-2H-naphthalen-4a(S)-yl-hydroperoxid. [3]: 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-2(S)-yl-hydroperoxid. [3']: 6(R)-Isopropenyl-4(R),4a(S)-dimethyl-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-naphthalen-2(R)-yl-hydroperoxid. [4]: β -Nootkatol. [4']: α -Nootkatol. [5]: (+)-Nootkaton.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass durch die spezifische Färbung, die DC und HPLC Retention zusammen mit den UV- und APCI⁺-Spektren die isolierten Verbindungen als die postulierten Valencenhydroperoxide [3,3'] eindeutig nachgewiesen sind. Von den ebenfalls postulierten tertiären Hydroperoxiden konnte das β -Isomer [2] über den Nachweis des *tert.* β -Alkohols indirekt bestätigt werden. Somit kann der in Abbildung 5.37 vorgeschlagene Bildungsmechanismus für (+)-Nootkaton und die beiden Nootkatole als bestätigt angesehen werden.

5.5 Downstream Processing

5.5.1 Extraktion von Valencen mit einem geeigneten Adsorbens

Insbesondere bei der Fed-Batch-Dosierung von (+)-Valencen, die bislang zu den höchsten Produktkonzentrationen ($> 1000 \text{ mg L}^{-1}$) geführt hat, verbleiben größere Mengen (+)-Valencen im Reaktionsansatz. Neben der Möglichkeit einer kosten- und energieintensiven destillativen Rückgewinnung wurde alternativ eine adsorptive Rückgewinnung des nicht umgesetzten Valencens in Betracht gezogen. Aus Erfahrungen mit ähnlichen Trennproblemen bei Substanzgemischen ähnlicher Polarität wurden gebräuchliche Adsorbentien auf Polystyrol- und Methylacrylatbasis nicht in Betracht gezogen. Spezifische Wechselwirkungen können jedoch mit funktionalisierten Harzen bei Adsorption aus organischer Phase erzielt werden. In einem zweistufigen Trennprozess kann so zuerst die Gesamtmenge an Edukt und Produkt mit Hilfe eines unspezifischen Polystyrolharzes aus dem wässrigen Transformationsansatz gewonnen, anschließend mit einem unpolaren Lösungsmittel wie z.B. Hexan desorbiert und anschließend das polarere Nootkaton mit Hilfe eines spezifischen Harzes (z.B. sulfoniertes Polystyrol) vom Valencen getrennt. Die erforderliche Verwendung und sichere Handhabung größerer Mengen unpolarer Lösungsmittel mit hohem Dampfdruck wurde vom Industriepartner jedoch als schlecht vereinbar mit einem rentablen und sicheren industriellen Prozess erachtet. Daher wurde auf Adsorbentien fokussiert, die neben einer starken unspezifischen hydrophoben Interaktion zusätzlich über die Molekülgröße und Molekülgeometrie diskriminieren. So gelang bereits eine ähnliche Trennung für das Zweikomponentensystem Limonen/Carvon mit dem Zeolithen ZSM-5-1000.

Auf Grund der einschlägigen Vorarbeiten konnte mit dem Zeolithen ZSM-5 150 gezielt ein Adsorbens für die Trennung von Valencen und Nootkaton ausgewählt werden. Abbildung 5.38 zeigt die Gemischtadsorptionsisothermen von (+)-Valencen und Nootkaton, die in gleicher Konzentration in einer Modelnmischung vorgelegt wurden. Die eingesetzten Mengen wurden an die realen Konzentrationen beider Komponenten in den durchgeführten Biotransformationen angelehnt.

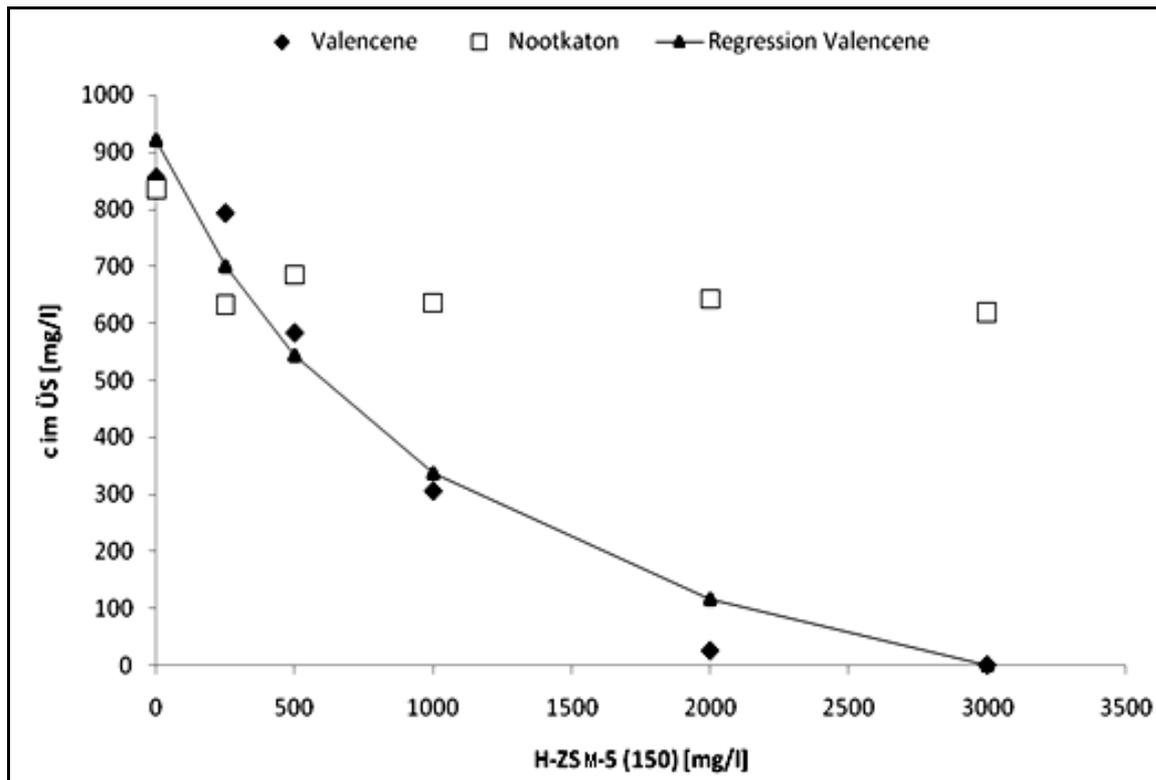


Abbildung 5.38 Gemischtadsorption von Valencen 70 und Nootkaton an ZSM-5 150

Beim Einsatz ungefähr der dreifachen Menge an Adsorbens zu Adsorbat kann Valencen bereits im Batch-Verfahren nahezu vollständig aus der Lösung entfernt werden. In weit geringerem Maße erfolgt auch eine Adsorption von Nootkaton an äußere Schichten des feinkörnigen Zeolithen, jedoch scheint ein tiefes Eindringen in die Poren nicht zu erfolgen.

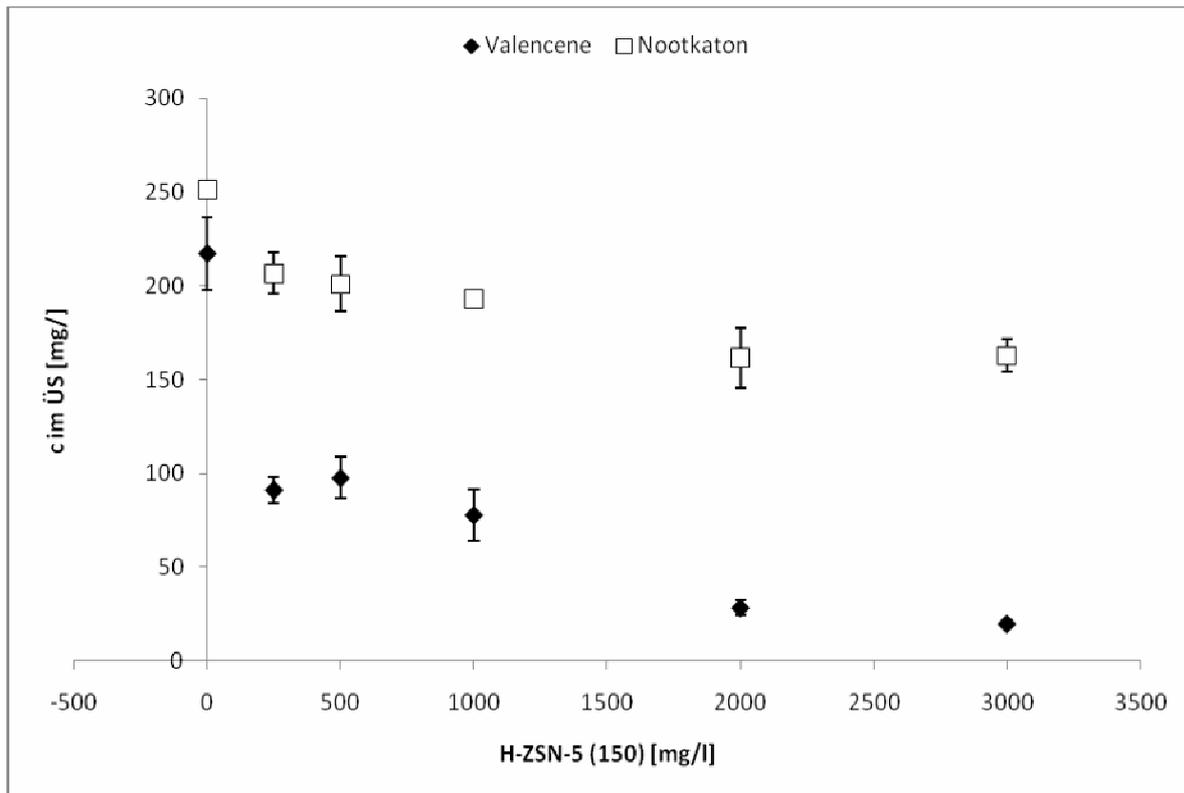


Abbildung 5.39 Gemischtadsorption von Valencen und Nootkaton an ZSM-5 150 in einem Biotransformationsansatz

Dieses Ergebnis konnte auch in einer Transformationslösung in Gegenwart aktiver Biomasse bestätigt werden (Abbildung 5.39). Aus der Kulturbrühe heraus müssen jedoch größere Mengen Adsorbens zur vollständigen Abtrennung des Valencens eingesetzt werden. Dies ist damit zu erklären, dass die lipophilen Teile der Pilzzellwände ebenfalls stark adsorbierende Eigenschaften für beide Komponenten aufweisen und 60 min Kontaktzeit zur Gleichgewichtseinstellung nicht ausreichend sind. Festzuhalten bleibt, dass eine adsorptive Rückgewinnung von nicht umgesetzten Valencen direkt aus dem Transformationsansatz möglich ist.

5.5.2 Flüssig-Flüssig Extraktion mit Limonen

Alternativ zur *in-situ* Abtrennung nicht umgesetzten Valencens wurde die Flüssig-Flüssig-Extraktion des Reaktionsansatzes nach Biotransformation untersucht. Da die Trenntechnologie für das Gemisch Limonen, Valencen und Nootkaton für den Industriepartner Döhler bekannt ist, wurde Limonen als biogenes Extraktionsmittel ausgewählt.

Für erste Extraktionsversuche wurden zu 2 mL einer geturraxten (10 Minuten, Stufe 5) Biomassesuspension (10% Biofeuchtmasse) Valencen- bzw. Nootkaton-Stammlösungen zugegeben. Die Konzentrationen wurden an die in den bisher durchgeführten Biotransformationen angelehnt. Nach 10 Minuten Inkubation wurden die Proben mit 2 mL Limonen extrahiert. Sowohl Nootkaton als auch Valencen konnten so vollständig extrahiert werden.

5.5.2.1 Optimierung des Extraktionsverhältnisses

Um Extraktionsmittel einzusparen und für die weitere Aufarbeitung eine mit Nootkaton und Valencen angereicherte Limonenphase zu erhalten, wurde getestet bis zu welchem Reaktionsansatz-Limonen-Verhältnis sich Nootkaton und Valencen extrahieren lassen. Wieder wurden zu 10 mL einer geturraxten Biomassesuspension (10 % Biofeuchtmasse) Nootkaton- und Valencen-Stammlösungen gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation wurden für das 5:1 Verhältnis 2 mL Limonen und für das 10:1 Verhältnis 1 mL Limonen zugegeben. Mit beiden Extraktionsverhältnissen konnten sowohl Nootkaton als auch Valencen vollständig extrahiert werden. (siehe Abbildung 5.40 und Abbildung 5.41)

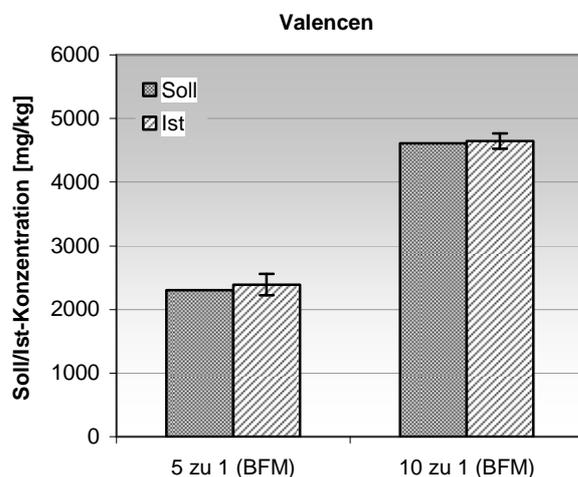


Abbildung 5.40 Extraktion Valencen aus 10 mL Biomassesuspension mit 2 bzw. 1 mL Limonen

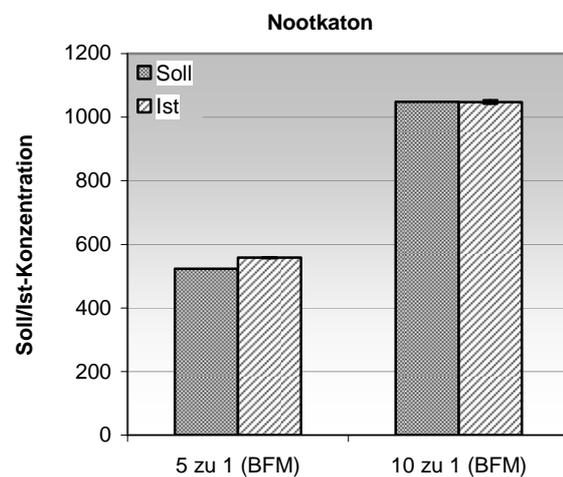


Abbildung 5.41 Extraktion Nootkaton aus 10 mL Biomassesuspension mit 2 bzw. 1 mL Limonen

5.5.2.2 Emulsions- und Mulmschichtbildung

Bereits bei der Optimierung des Extraktionsverhältnisses zeigten sich Probleme bei der Phasentrennung zwischen Biomassesuspension und Limonen. Nach 16 Stunden Biotransformation und anschließendem Hitzeschritt (80°C, 60 Minuten) war aufgrund von Emulsionsbildung weder im Erdfeld noch nach Zentrifugation bei 500 x g eine saubere Phasentrennung möglich. Nahezu die komplette Limonenphase bestand aus einem feinen, weißen Schaum.



Abbildung 5.42 Extraktion von 10 mL hochdruckhomogenisierter Biofeuchtmasse nach 16 h Biotransformation und 60 Minuten Inkubation bei 80°C mit 1 mL Limonen, ohne Zentrifugation



Abbildung 5.43 Extraktion von 10 mL hochdruckhomogenisierter Biofeuchtmasse nach 16 h Biotransformation, 60 Minuten Inkubation bei 80°C, anschließende Zugabe von 1 mL Limonen und Zentrifugation (10 Minuten, 500 x g)

Nach Zentrifugation ließ sich der Schaum zu einer zusätzlichen dritten Phase (Mulmschicht) komprimieren. Die GC-Analytik der klaren Limonenphase ergab eine rechnerische Bilanzlücke zwischen gebildetem Nootkaton und nicht umgesetztem, extrahiertem Valencen. Es konnte bisher nicht geklärt werden, ob die Bilanzlücke auf in der Mulmschicht verbliebenes Nootkaton und Valencen zurückzuführen ist. Für die Umsetzung in den Technikumsmaßstab muss die Mulmschicht auf ein Minimum reduziert und die Phasentrennung optimiert werden.

5.5.2.3 Anzustrebende Produktreinheit nach Limonenextraktion

Aufgrund der Probleme bei der Phasentrennung nach Extraktion mit Limonen gelang es bisher nicht Transformationsansätze größer als 5 mL zu extrahieren und diese aufzuarbeiten. Daher konnte kein sensorischer Vergleich mit dem bei der Firma Döhler eingesetzten Nootkaton vorgenommen werden. Um dennoch eine Aussage über mögliche unerwünschte Nebenprodukte und die anzustrebende Produktreinheit treffen zu können, wurden das Peakspektrum des bei Döhler verwendeten Nootkatons mit dem des durch Biotransformation generierten Nootkatons verglichen (siehe Abbildung 5.45 und Abbildung 5.44).

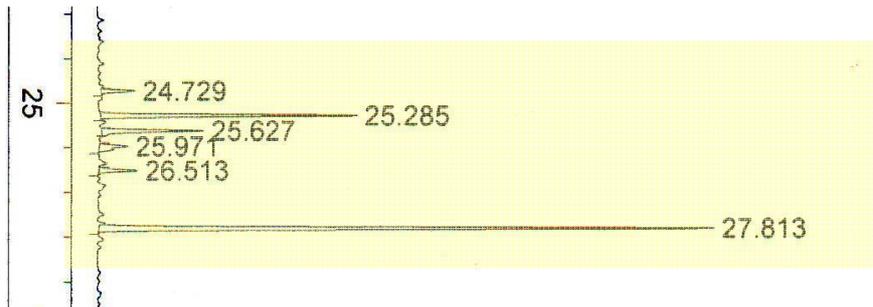


Abbildung 5.44 Peakspektrum nach Gaschromatographie des bei Döhler verwendeten Nootkatons, extrahiert mit Limonen, Nootkaton $t_R = 27,813$ min



Abbildung 5.45 Peakspektrum nach Gaschromatographie von durch Biotransformation gebildetem Nootkaton und Nebenprodukten, extrahiert mit Limonen, Nootkaton $t_R = 27,655$ min

Im Wesentlichen sind die Spektren beider Proben sehr ähnlich. Während das bei Döhler verwendete Nootkaton bei einer Retentionszeit von 25,971 Minuten einen Peak aufweist, der nach Biotransformation nicht vorhanden ist, treten nach Biotransformation im Bereich 24 Minuten mehrere Peaks auf, die im Döhler-Nootkaton nicht vorhanden sind.

Da das Gemisch Limonen, Nootkaton und Valencen nach Extraktion noch weiter aufgearbeitet werden muss (Trennung von Nootkaton und Valencen an Kieselgel, eventuell Molekulardestillation zur Abtrennung von Verunreinigungen), kann noch keine Aussage über die letztendliche Produktreinheit getroffen werden.

5.6 Ökoeffizienzvergleich

Die Chemosynthese wurde entsprechend der im Projektantrag beschriebenen Verfahren betrachtet. Die biotechnologischen Szenarien unterscheiden sich allein im Aufschluss der Biomasse. Szenario 1: Einsatz Lyophilisation; Szenario 2: Einsatz Hochdruckhomogenisator. Im Folgenden werden die gemeinsamen Prozessvorbereitungen, die Biomasseproduktion sowie jeweils einzeln die Aufarbeitungsschritte beschrieben.

Für die Chemosynthese von Nootkaton wurde eine Umweltbewertungszahl (UBZ) von 726 berechnet, während für beide biotechnologischen Szenarien die UBZ bei 3 lag. Je kleiner die UBZ ist, desto geringer sind die potentiellen Umweltwirkungen. Es muss berücksichtigt werden, dass die bisherigen Betrachtungen nur Zwischenstände darstellen. So wurde die Chemosynthese noch nicht näher auf weitere Energiebedarfe sowie Abfallströme untersucht. Die BT-Szenarien bilanzieren vorerst die Herstellung des aktivierten Biokatalysators. Basierend auf den vorliegenden Daten ist der Energieindex der Chemosynthese mit ca. 48.000 kJ kg⁻¹ um den Faktor 5 höher als das biotechnologische Verfahren mit Homogenisation. Abbildung 5.46 zeigt die allgemeinen Kennzahlen der biotechnologischen Verfahren, die dem besseren Verständnis von Stoff- und Energieströmen in den Prozessen dienen soll. Im Vergleich der beiden biotechnologischen Verfahren ist auffällig, dass bis auf den Energiebedarf, alle Massenströme vergleichbar sind. Leicht höhere Input- und Outputströme werden durch die Gefriertrocknung verursacht. Das verdunstete Wasser wird dem Prozess wieder vor der Biotransformationsreaktion zugeführt. Der um fast 35% höhere Energieverbrauch wird in Szenario BT-Lyophilisierung durch die Gefriertrocknung verursacht.

Allgemeine Kennzahlen		
Produktstrom	=	6274 kg / Jahr
Inputstrom	=	192772 kg / Jahr
Abfallstrom	=	187320 kg / Jahr
Energiestrom	=	74142115 kJ / Jahr
Inputindex	=	31 kg / kg
Abfallindex	=	30 kg / kg
Energieindex	=	11816 kJ / kg
Szenario BT - Lyophilisierung		

Allgemeine Kennzahlen		
Produktstrom	=	6274 kg / Jahr
Inputstrom	=	189305 kg / Jahr
Abfallstrom	=	183854 kg / Jahr
Energiestrom	=	55001747 kJ / Jahr
Inputindex	=	30 kg / kg
Abfallindex	=	29 kg / kg
Energieindex	=	8766 kJ / kg
Szenario BT - Homogenisierung		

Abbildung 5.46 Allgemeine Kennzahlen zur ökologischen Bewertung der biotechnologischen Verfahren

6 Fazit

Dem Projektantrag lag ein Lösungskonzept aus fünf Arbeitspaketen zugrunde, die zeitlich überlappend innerhalb des akademisch-industriellen Verbundes bearbeitet werden sollten. Während die erste Projekthälfte im Wesentlichen auf die Entwicklung eines ökonomischen Produktions- und Transformationssystem abzielte, soll innerhalb des zweiten Projektabschnittes die Biotransformationsreaktion und das Downstream-Processing unter ökologischen und ökonomischen Aspekten untersucht und optimiert werden.

Das in Arbeitspaket A zu entwickelnde Produktionssystem für *Pleurotus sapidus* wurde bis in den halbertechnischen Maßstab erfolgreich umgesetzt. Neben einem kosteneffizienten Fermentationsmedium wurden wesentliche Prozessgrößen (Schaumbildung, pO_2 , pH) bestimmt, so dass eine industrielle Produktion im 2 – 5 m³-Maßstab möglich erscheint.

In Arbeitspaket B, welches die Vorbereitung des gewonnenen Pilzmyzels für die Transformation umfasst, wurde in Abweichung zum Projektplan auf die Untersuchung zur Lyophilisation alternativer Trocknungsverfahren (z.B. Vakuumbandtrocknung) verzichtet, da frühzeitig gezeigt wurde, dass mit aufgeschlossener Biofeuchtmasse Biotransformationsraten erzielt werden können, die denen von Lyophilisaten überlegen sind. Da sehr gute Ergebnisse mit Ultra-Turrax-Dispergierung und Hochdruckhomogenisierung erzielt wurden, sollte im zweiten Projektabschnitt unter Berücksichtigung ökonomischer und ökologischer Kenngrößen, die beste Methode identifiziert und optimiert werden. Wesentliche physikalische und chemische Schlüsselparameter wurden bestimmt. Die Maßstabsvergrößerung vom Mikro- in den 250-mL-Maßstab war nicht nur mit lyophilisierter Biomasse, sondern auch mit dispergierter und homogenisierter Biofeuchtmasse problemlos möglich. Mittels Fed-Batch Dosierungsstrategien von Valencen wurden Nootkatonkonzentrationen bis 880 mg L⁻¹ erzielt, jedoch war diese Ausbeute noch nicht zufriedenstellend.

Unter Berücksichtigung der beim Statusseminar erteilten Gutachteraufgaben wurden weiterhin auf Untersuchungen zur Charakterisierung der Enzymaktivität und der Enzymlokalisierung fokussiert.

Es gelang die kodierende Sequenz der cDNA des Zielenzym zu ermitteln und zu sequenzieren. Es handelt sich um eine neuartige Oxygenase mit einer Homologie von ~ 50% zu einer Oxygenase aus dem Basidiomyceten *Laccaria bicolor*.

Auf Grundlage einer geeigneten Peptidsequenz wurde ein spezifischer Antikörper hergestellt. Mit lyophilisiertem Myzel von *P. sapidus* konnte eine Korrelation zwischen der Bandenstärke im Westernblot und der Aktivität der Biomasse gezeigt werden. Im Kulturüberstand von *P. sapidus* nach Submerskultivierung konnte die Oxygenase nicht nachgewiesen werden.

Eine Beteiligung von P450-Aktivitäten zur Bildung der Nootkatole mit nachfolgender Oxidation zum Nootkaton konnte ausgeschlossen werden. Ein vorgeschlagener Bildungsmechanismus für (+)-Nootkaton und die beiden Nootkatole über Valencenhydroperoxide als Intermediate wurde bestätigt.

Der Schwerpunkt der downstream-Arbeiten wurde auf das Recycling von nicht umgesetztem Substrat sowie die effiziente Produktabtrennung für die industrielle Applikation gelegt. Nicht umgesetztes Valencen konnte mit dem Zeolithen ZSM-5 150 direkt aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Nootkaton verblieb aufgrund seiner Molekülgröße im Reaktionsansatz. Alternativ wurden mit dem biogenen Lösungsmittel Limonen Flüssig-Flüssig-Extraktionen durchgeführt. Im Modellversuch konnten Nootkaton und Valencen vollständig extrahiert werden. Bei biotransformierten Proben wurden bereits im kleinen Maßstab feststoffstabilisierte Emulsionen beobachtet, die die Phasentrennung nachteilig beeinflussten. Eine effiziente Produktabtrennung im Technikumsmaßstab war in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich.

Aufgrund fehlender Daten zu Produktausbeute und Substratrecycling konnte bisher keine vollständige Ökoeffizienzanalyse durchgeführt werden. Die dramatisch bessere Umweltbewertungszahl und der deutlich geringere Energieindex der beiden biotechnologischen Varianten zeigen jedoch, dass die erwarteten Vorteile hinsichtlich der ökologischen Kompatibilität in diesem Vorhaben auf paradigmatische Weise nachgewiesen worden sind.

7 Ausblick

Dem Projekt wird von allen Projektpartnern weiterhin großes Potenzial eingeräumt. Ohne fundierte Daten zu Produktausbeute und Substrat-Recycling kann jedoch keine rechnerisch präzise Aussage über die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens getroffen werden.

Die Produktion von Biomasse sowie die Herstellung eines aktiven Biokatalysators sind bis in den Technikumsmaßstab reproduzierbar möglich. Die Parameter der Biotransformation sind bis in einen Maßstab von 200 mL optimiert wurden, und liefern eine Basis für die Extraktion des Zielproduktes Nootkaton.

Die Fokussierung der weiteren Aktivitäten muss im Bereich Verknüpfung der verschiedenen Operation Units (Fermentation, Myzelaufschluss, Biotransformation, DSP) sowie der Überführung von Biotransformation und DSP in den technischen Maßstab liegen.

Optimierung und Scale-Up von Biotransformation und Downstream Processing waren bisher im Wesentlichen limitiert durch eine starke Emulsions- und Mulmschichtbildung zwischen wässriger Pilzmycel- und organischer Extraktionsmittelphase. Da mit den zur Verfügung stehenden Separationsverfahren keine befriedigende Phasentrennung möglich war, konnten Zielprodukt und unverbrauchtes Substrat nicht zufriedenstellend extrahiert werden. In der Konsequenz fehlen damit fundierte Daten zur Nootkatonbildung, Ausbeute und Substratverbrauch als wesentliche Basis einer Wirtschaftlichkeitsberechnung.

Die anvisierten operativen Tätigkeiten beinhalten Strategien zur Vermeidung bzw. Reduktion der feststoffstabilisierten Mulmschicht (z.B. durch enzymatische Hydrolyse des Pilzmycels, Untersuchungen zum Einfluss des pH-Werts auf die Extraktion) sowie die Anwendung von kontinuierlichen Flüssig-Flüssig-Extraktions- und Separationsverfahren. (z.B. Zentrifugalextraktor der Firma CINC).

Dies berücksichtigend sollen in der Phase der Verlängerung externe Kompetenzen und Know-how-Träger auf dem Gebiet der Extraktions-, Separations- und Waschprozesse eingebunden werden. Konkret wird eine Kooperation mit Prof. Kopf von der HS Mannheim und die verstärkte Einbindung von kommerziellen Apparatebauern angestrebt.

Ist es unter Verwendung von Biomasse nicht möglich, die Mulmschichtbildung zu verhindern oder zu minimieren, kann als zusätzliche Möglichkeit der Einsatz von zellfreiem Überstand nach Hochdruckhomogenisation in Betracht gezogen werden, da Laboruntersuchungen Nootkaton bildende-Aktivität (gegenüber dem Pilzmycel reduziert, aber signifikant vorhanden) im zellfreien Überstand zeigten.

Damit wäre es möglich, eine Membran unterstützte Extraktion oder sogar Biotransformation durchzuführen, um den Kontakt zwischen Biokatalysator und Extraktionsmittel zu vermeiden. Im Optimalfall ließe sich der Biokatalysator auf diese Weise kontinuierlich verwenden.

Die Aufarbeitung des Limonen-Valencen-Nootkaton-Gemisches nach Extraktion ist für den Industriepartner Döhler aufgrund der Erfahrungen im Bereich Aroma- und Trenntechnologie bereits bekannt. Über eine Kieselgelsäule wird Nootkaton aus dem Gemisch entfernt und anschließend mit Alkohol eluiert. Anschließend werden Alkohol und eventuell verbliebene Limonenreste durch Destillation vom Nootkaton recycelt. Möglicherweise im Nootkaton auftretende, unerwünschte Nebenprodukte werden durch Molekulardestillation entfernt. Das Limonen-Valencen-Gemisch wird nach Abtrennen des Nootkatons durch Destillation getrennt, um anschließend das Valencen für weitere Biotransformationen einzusetzen.

Die abschließende Ökoeffizienzanalyse soll zurückgestellt und auf Basis der dann zur Verfügung stehenden Datenlage ermittelt werden.

8 Literatur

Patentanmeldungen:

N-Zyme BioTec: Enzymatic synthesis of the grapefruit flavour nootkatone EP 08.1711483, 2008

Begutachtete Publikationen:

Fraatz MA, Berger RG, Zorn H: Nootkatone – a Biotechnological Challenge, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009, **83**, 35-41.

Fraatz MA, Kopp SJL, Stöber R, Kaspera R, Nimtz M, Berger RG, Zorn H: A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone, J. Mol. Cat. B 2009 **61**, 202–207.

Krügner S et al.: A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation, Bioresour Technol 2010, **101**:457-462.

Zorn H et al.: “Bioflavours” – an excursion from the garlic mushroom to raspberry aroma. In: Hofmann T, Meyerhof W, Schieberle P (Eds.) Recent Highlights in Flavor Chemistry and Biology. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München, 2008, 203-209.

Krügner S, Krings U, Zorn H, Berger RG: Gewinnung des Aromastoffs Nootkaton: Biokatalyse und Downstream-Processing, Chem. Ing. Tech. 2009, **81**(8), 1071.

Berger RG: Biotechnology of flavours – the next generation, Biotech. Lett. 2009, **31**, 1651-1659.

Sonstige Publikationen:

Fraatz MA, Rinne S, Berger RG, Zorn H (2007) Terpenoide Aromen aus nachwachsenden Rohstoffen. Lebensmittelchemie **61**:159-160.

Linke D, Kopp SJL, Zorn H, Berger RG: Enzyme aus Basidiomyceten – Biokatalysatoren der Zukunft. Lebensmittelchemie 2007, **61**, 135-136.

Berger RG: From fermentation to white biotechnology: how microbial catalysts generate flavours, In: Modifying flavour in food, A. Taylor, J. Hort (Eds.), Woodhead, Cambridge, England, 2007, pp. 64-94.

Berger RG, Zorn H (2008) Biotechnology of flavours – recent progress. In: Koutinas A, Pandey A, Larroche C (Eds) Current topics on bioprocesses in food industry, Vol II. Asiatech Publishers, New Dehli, pp 30-42.

Fraatz MA et al.: Synthese von natürlichem Nootkaton. Lebensmittelchemie 2009, **63**:130-131.

Krings U, Lehnert N, Rheinheimer, M, Berger RG: Mikroorganismen erzeugen hochwertige Aromen, 2009, www.aktuelle-wochenschau.de/w41/woche41.html.

Zorn H, Riemer SJL, Szweda R, Fraatz MA (2009) Neue enzymatische Verfahren für die Lebensmittel- und Aromabiotechnologie. Lebensmittelchemie; im Druck.

Berger RG: White Biotechnology: Sustainable Options for the Generation of Natural Volatile Flavours, Proc.12th Weurman Flavour Symposium, Eds. Imre Blank, Matthias Wüst, Chahan Yeretjian, im Druck.

Vorträge:

Zorn H: Natural flavours from renewable resources. European BioPerspectives, Köln, 2007.

Zorn H et al.: "Bioflavours" – an excursion from the garlic mushroom to raspberry aroma. Wartburg Flavour Symposium, 2007, Dt. Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie

Fraatz MA et al.: Terpenoide Aromen aus nachwachsenden Rohstoffen. Regionaltagung West der Lebensmittelchemischen Gesellschaft 2007.

Fraatz MA et al.: Enzymatische Synthese von Nootkaton. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2009.

Krügenger S et al.: Gewinnung des Aromastoffs Nootkaton: Biokatalyse und Downstream-Processing. 27. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 08.-10. Sept. 2009.

Zorn H: Sustainable biochemical and chemical engineering – *SusChemEng*. Deutsch-Russisches Forum Biotechnologie, Pushchino, Russland, 2008.

Zorn H: Basidiomyceten – Aromafabriken und Werkzeugkasten für die Weiße Biotechnologie. GDCh-Kolloquium der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2009.

Zorn H et al.: Neue enzymatische Verfahren für die Lebensmittel- und Aromabiotechnologie. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2009.

Doktor- und Diplomarbeiten:

Fraatz MA (2007): Enzymatische Oxidation von Mono- und Sesquiterpenen. Leibniz Universität Hannover

Krügner S., Leibniz-Universität Hannover, Dissertation 2009

Zoher A: Biotechnologische Produktion von natürlichem (+)-Nootkaton, Diplomarbeit, HS Mannheim, 2008

Behrens M: Bioprozessentwicklung zur Herstellung von natürlichem (+)-Nootkaton. Diplomarbeit. TU Dortmund, 2008

Zawar YD: Biocatalytic production of natural (+)-Nootkatone. Masterarbeit. TU Dortmund, 2008

Stöber R: Molekulare Charakterisierung einer neuartigen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. Bachelorarbeit. TU Dortmund, 2008

Schröder J: Heterologe Expression einer neuartigen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. Bachelorarbeit. TU Dortmund, 2008