

**Technische Universität München**  
**Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe**

**Funktionalisierung von Lipiden durch Peroxygenase**

Christopher Fuchs

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 16.01.2013 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.06.2013 angenommen.



**Carpe diem!**

**Horaz (65 – 8 v. Chr.)**



**meinen Eltern**



## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Professor Dr. Wilfried Schwab dafür bedanken, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen durfte und ich dadurch unglaublich viel für meine Zukunft gelernt habe. Gerade das Wissen, welches er mir auf dem Gebiet der Chemie und Analytik beigebracht hat, war unglaublich wertvoll. Willi hat immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme gehabt und war gleichzeitig sehr geduldig. Er gab mir viele Anregungen für meine Versuche, die ich dankend aufnahm und die letztendlich zum Erfolg führten.

Ich danke Dr. Thomas Hoffmann für die Beantwortung vieler biochemischer und analytischer Fragen sowie beim Lösen von Problemen rund um das Arbeitsgruppennetzwerk.

Dr. Fong-Chin Huang danke ich dafür, dass sie mich am Anfang meiner Doktorarbeit an die Hand nahm und mir viel Unterstützung beim Planen meiner Versuche gab.

Dr. Anja Preuß hat mir gerade bei den Vorbereitungen für die NMR-Messungen beigestanden und auch maßbeglich zu deren Erfolg beigetragen.

Dr. Anja Preuß und Dr. Steffi Hücherig danke ich für das intensive und genaue Lesen meines Manuskriptes. Die Verbesserungsvorschläge dazu habe ich gerne aufgenommen.

Dr. Ruth Habegger bin ich für die Hilfe rund um die Kultur der Tomatenpflanzen dankbar.

Kirsten Günther-Jordanland danke ich dafür, dass sie immer einen Platz für eine NMR-Messung fand.

Die gesamte Arbeitsgruppe Schwab verdient natürlich auch meinen Dank; jeder aus der Gruppe hat in irgendeiner Weise geholfen, meine Doktorarbeit zum Erfolg zu führen. Hervorheben möchte ich meine ehemaligen Bürokollegen Quirin, mit dem ich mich intensiv und amüsan über die Kultur der deutschen Staaten und die Rolle von Bayern unterhielt, Ludwig, der als Bier- und Wurstspezialist gilt und als Bayer mich gerne mal in der deutschen Sprache belehrte, und Su-Ying, die zwischendurch immer Zeit für chinesische/taiwanische Unterhaltungen mit mir fand; 你教我中文我谢谢你!

Doreen, Friedericke, Katrin, Steffi und Kilian bin ich dankbar für die Beantwortung vieler meiner Fragen und für die angenehme und lustige Zeit im Labor.

Meinem Bruder Alexander danke ich für Beantwortung vieler meiner chemischen, insbesondere NMR-spektroskopischer Fragen.

Ich möchte nun auch die Gelegenheit nutzen meinen Eltern dafür zu danken, dass sie meinen Weg nach Bayern unterstützen und mir immer Zuflucht in der schönen Heimat, der Kurpfalz, gewährten. Ihr habt mir immer beigestanden, bei Problemen des Alltags geholfen und mir viele Anregungen fürs Leben gegeben; dafür bin ich euch für immer dankbar. Ich wüsste nicht, was ich ohne Euch machen würde.



## **Vorveröffentlichung**

Auszüge dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

### **Originalartikel**

J. Aghofack-Nguemezi, C. Fuchs, S.-Y.Yeh, F.-C. Huang, T. Hoffmann and W. Schwab (2011): An oxygenase inhibitor study in *Solanum lycopersicum* combined with metabolite profiling analysis revealed a potent peroxygenase inactivator. *Journal of Experimental Botany* 62, S. 1313-1323.

### **Vortrag**

Substrate promiscuity of a plant Peroxygenase, IndBiotech2012 Tagung, DECHEMA, Frankfurt/Main, 25.April 2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>15</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>18</b>
<b>Summary</b> .....	<b>20</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1 Pflanzliche Öle</b> .....	<b>23</b>
1.1.1 Chemische Funktionalisierung von Fettsäuren .....	24
1.1.2 Biotechnologische Funktionalisierung von Fettsäuren .....	25
1.1.3 Epoxidierung von Fettsäuren .....	26
<b>1.2 Terpene</b> .....	<b>28</b>
1.2.1 Chemische Funktionalisierung .....	29
1.2.2 Biotechnologische Funktionalisierung .....	30
<b>1.3 Oxido-Reduktasen</b> .....	<b>31</b>
1.3.1 Verschiedene Vertreter der Oxido-Reduktasen.....	32
1.3.2 Peroxygenase .....	33
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>39</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>40</b>
3.1.1 Chemikalienliste .....	40
3.1.2 Enzyme .....	44
3.1.3 Kommerzielle Kits.....	44
3.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	45
3.1.5 Geräte und Ausstattung.....	45
3.1.6 Software .....	48
3.1.7 Biologisches Material .....	49
3.1.7.1 Mikroorganismen .....	49
3.1.7.2 Pflanzen .....	49
<b>3.2 Anzuchtmethoden</b> .....	<b>49</b>
3.2.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	49
3.2.1.1 Kompetente Zellen .....	49
3.2.1.2 Anzucht für Miniprep und Stammkultur.....	50
3.2.2 Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	50
3.2.2.1 Kompetente Zellen .....	50

---

3.2.2.2	Anzucht zur Proteinexpression .....	50
3.2.3	Anzucht von <i>Solanum lycopersicum</i> .....	51
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>51</b>
3.3.1	RNA-Isolierung aus <i>S. lycopersicum</i> .....	51
3.3.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	52
3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese von RNA .....	52
3.3.4	DNA-Verdau durch DNase.....	52
3.3.5	Reverse Transkription .....	53
3.3.6	Quantitative Polymerasekettenreaktion.....	54
3.3.7	Polymerasekettenreaktion.....	55
3.3.8	Kolonie-Polymerasekettenreaktion .....	56
3.3.9	Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	57
3.3.10	Extraktion von DNA aus einem Agarosegel .....	57
3.3.11	Plasmidisolation .....	57
3.3.12	Restriktionsverdau.....	57
3.3.13	DNA-Ligation.....	58
3.3.14	Transformation von <i>E. coli</i> .....	58
3.3.15	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	58
3.3.16	Sequenzierungen .....	58
<b>3.4</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>59</b>
3.4.1	Herstellung eines Proteinrohextraktes aus <i>S. cerevisiae</i> .....	59
3.4.2	Mikrosomenisolation aus <i>S. cerevisiae</i> .....	59
3.4.3	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	60
3.4.4	Gelelektrophorese von Proteinen .....	60
3.4.5	Untersuchung der Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i> .....	60
3.4.5.1	SDS-PAGE .....	60
3.4.5.2	Aktivitätstest.....	61
3.4.6	Einfluss von Tetracyclin auf die Enzymaktivität.....	62
3.4.7	Effekte von pH-Wert und Lösungsmittel auf die Extraktion von Fettsäurehydroperoxiden.....	62
3.4.8	pH-Optimum .....	62
3.4.9	Temperatur-Optimum.....	63
3.4.10	Substratscreening .....	63
3.4.10.1	Fettsäuren und Fettsäurederivate .....	63
3.4.10.2	Terpene und flüchtige Naturstoffe .....	64
3.4.10.3	1-Methyl-1,4-cyclohexadien und 1,4-cyclohexadien.....	65
3.4.11	Oxidation durch tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid .....	65
3.4.12	Sättigungskurven.....	66
3.4.12.1	Fettsäuren und Fettsäurederivate.....	66

---

3.4.12.2	Wasserstoffperoxid, tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid .....	66
3.4.13	Aktivitätsmessungen .....	67
3.4.13.1	Fettsäuren und Fettsäurederivate .....	67
3.4.13.2	Terpene und andere flüchtige Verbindungen .....	68
3.4.14	Oxidation in organischen Lösungsmitteln .....	69
3.4.15	Großer Reaktionsansatz .....	69
3.4.16	Chemische Oxidation.....	70
<b>3.5</b>	<b>Analytische Methoden .....</b>	<b>71</b>
3.5.1	Dünnschichtchromatographie.....	71
3.5.2	Reinigung unbekannter Oxidationsprodukte über eine Kieselgelsäule .....	71
3.5.3	HPLC-UV .....	71
3.5.4	HPLC-UV/MS.....	72
3.5.5	GC-MS.....	73
3.5.5.1	Gaschromatograph Trace GC, gekoppelt mit Massenspektrometer Trace DSQ .....	73
3.5.5.2	Gaschromatograph 6890 N gekoppelt mit Massenspektrometer 5975 .....	77
3.5.5.3	Gaschromatograph Hewlett Packard HP 5890 Series II gekoppelt mit Sektorfeld- Massenspektrometer MAT 95S .....	78
3.5.6	GC-FID .....	79
3.5.7	NMR-Spektroskopie .....	79
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>81</b>
<b>4.1</b>	<b>Heterologe Expression der Peroxygenase in <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>81</b>
4.1.1	Klonierung und Transformation .....	81
4.1.2	Analyse der Proteinsequenz.....	84
4.1.3	Proteinexpression .....	85
4.1.4	Mikrosomenisolation .....	86
4.1.5	Einfluss von Tetracyclis auf die Enzymaktivität.....	87
<b>4.2</b>	<b>Epoxidierung von Fettsäuren .....</b>	<b>88</b>
4.2.1	Effekte von pH-Wert und Lösungsmittel auf die Extraktion .....	88
4.2.2	pH-und Temperatur-Optima .....	89
4.2.3	Substratscreening.....	90
4.2.4	Identifizierung unbekannter Oxidationsprodukte der $\alpha$ -Linolensäure durch NMR-Spektroskopie 95	
4.2.5	Überblick des Substratscreenings .....	97
4.2.6	Substratsättigungen .....	97
4.2.7	Aktivitätsmessungen .....	100
<b>4.3</b>	<b>Oxidation von Terpenen .....</b>	<b>102</b>

---

4.3.1	Substratscreening.....	102
4.3.2	Identifizierung unbekannter Oxidationsprodukte durch NMR-Spektroskopie .....	106
4.3.3	Überblick des Substratscreening.....	111
4.3.4	Aktivitätsmessungen .....	111
4.3.5	Oxidation in organischen Lösungsmitteln .....	113
<b>4.4</b>	<b>Oxidation weiterer Naturstoffe.....</b>	<b>114</b>
4.4.1	Substratscreening.....	114
4.4.2	Aktivitätsmessungen .....	115
<b>4.5</b>	<b>Einsatz verschiedener Hydroperoxide als Oxidationsmittel.....</b>	<b>116</b>
4.5.1	Epoxidierung, Hydroxylierung und Aromatisierung durch tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid.....	116
4.5.2	Enzymsättigungen durch Hydroperoxide .....	117
4.5.3	Vergleich von Wasserstoffhydroperoxid, Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid als Oxidationsmittel .....	119
<b>4.6</b>	<b>Expressionsmuster der <i>SIPXG</i>.....</b>	<b>120</b>
4.6.1	Vegetative Pflanzenorgane .....	120
4.6.2	Generative Pflanzenorgane.....	122
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>125</b>
<b>5.1</b>	<b>Expression einer rekombinanten PXG aus <i>S. lycopersicum</i> .....</b>	<b>125</b>
<b>5.2</b>	<b>Epoxidierung von Fettsäuren und Fettsäurederivaten .....</b>	<b>126</b>
<b>5.3</b>	<b>Oxidationen von Terpenen und anderen flüchtigen Naturstoffen .....</b>	<b>129</b>
5.3.1	Epoxidierungen .....	130
5.3.2	Hydroxylierungen .....	132
5.3.3	Aromatisierungen.....	133
<b>5.4</b>	<b>Untersuchung der Genexpression in <i>S. lycopersicum</i> .....</b>	<b>136</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>139</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>146</b>
<b>7.1</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>146</b>
<b>7.2</b>	<b>Effekte von pH-Wert und Lösungsmittel auf die Extraktion.....</b>	<b>146</b>
<b>7.3</b>	<b>Synthese der <math>\alpha</math>-Linolensäureoxide für eine Analyse mittels NMR.....</b>	<b>147</b>
<b>7.4</b>	<b>Chromatogramme des Substratscreening.....</b>	<b>147</b>
<b>7.5</b>	<b>Chemische Oxidation.....</b>	<b>164</b>

<b>7.6</b>	<b>Gewählte Ionenspuren zur Quantifizierung und Semiquantifizierung im GC-MS-Chromatogramm .....</b>	<b>169</b>
<b>7.7</b>	<b>Eichkurven .....</b>	<b>170</b>
7.7.1	Quantifizierung der Epoxidierung von 9-HPOD.....	170
7.7.2	Quantifizierung der Oxidation von Terpenen und anderen sekundären Pflanzenstoffen in Natriumacetatpuffer .....	170
7.7.3	Quantifizierung der Oxidation von $\gamma$ -Terpinen in Natriumacetatpuffer und Alkoholen .....	172
<b>7.8</b>	<b>NMR-Spektren .....</b>	<b>173</b>

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> )
cm	Zentimeter (engl.: <i>centimetre</i> )
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
ER	Endoplasmatisches Reticulum
12,13-EHOD	12,13-Epoxy-9-hydroxy-10(E)- octadecensäure
FAD <sup>+</sup>	Flavinadenindinukleotid, oxidiert
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid, reduziert
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
ha	Hektar
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl.: <i>high performance liquid chromatography</i> )
9-HPOD	9-Hydroperoxy-10 (E), 12(Z)- octadecadiensäure
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration

LB	undefiniertes Nährmedium für Bakterien (engl.: <i>lysogeny broth</i> )
LC	Flüssigchromatographie (engl.: <i>liquid chromatography</i> )
LOX	Lipoxygenase
m	Meter
mCPBS	<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA ( engl.: <i>messenger RNA</i> )
MS	Massenspektrometrie
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Stoffmenge
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat), oxidiert
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat), reduziert
nm	Nanometer
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i> )
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (engl.: <i>open reading frame</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
<i>PXG</i>	Peroxygenase, Gen
<i>PXG</i>	Peroxygenase, Protein
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>



---

SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> )
<i>SIPXG</i>	<i>Solanum lycopersicum</i> Peroxygenase, Gen
SIPXG	<i>Solanum lycopersicum</i> Peroxygenase, Protein
SPME	Festphasen-Mikroextraktion (engl.: <i>solid phase microextraction</i> )
t	Tonne
TIC	Totalionenchromatogramm
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent

## Zusammenfassung

Die weltweite Wirtschaft und Industrie sind stark vom Erdöl abhängig. Abgesehen von der Nutzung als Energierquelle dient Erdöl zur Herstellung einer Vielzahl von Produkten des Alltags, angefangen bei Arzneimitteln über Farben und Kunststoffen bis hin zu Reinigungsmitteln. Da die Erdölvorkommen begrenzt sind und ihr Ende absehbar ist, ist eine Suche nach alternativen Rohstoffquellen unumgänglich. Pflanzen liefern Rohstoffe, die im Zuge der Photosynthese in einem geschlossenen Kohlenstoffkreislauf hergestellt werden und dadurch regenerativ sind. Um diese nachwachsenden Rohstoffe technisch nutzbar zu machen, müssen sie in der Regel auf Molekülebene chemisch und/oder enzymatisch funktionalisiert werden.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Funktionalisierung von Fettsäuren und Terpenen durch eine rekombinante Peroxygenase aus *Solanum lycopersicum* (Tomate). Da Peroxygenase ein Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums (ER) ist, wurde für eine heterologe Proteinexpression als Organismus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) ausgewählt. Die Isolierung von Hefe-Mikrosomen, welche Überbleibsel des ERs sind, ermöglichte die effektive Abtrennung der Peroxygenase von anderen störenden zellulären Proteinen. Mit Hilfe der rekombinanten Peroxygenase konnten diverse Fettsäuren und Fettsäurederivate wie z.B. Ölsäure, Ölsäuremethylester und Linolsäure an ihren Doppelbindungen epoxidiert werden. Die enzymatische Epoxidierung war im Gegensatz zu einer rein chemischen, mit *m*-Chlorperbenzoesäure durchgeführten Oxidation regio- und stereoselektiv. Peroxygenase epoxidierte bevorzugt *cis*-Doppelbindungen gegenüber *trans*-Doppelbindungen. Unter den untersuchten Fettsäuren wurde  $\alpha$ -Linolensäure mit etwa 35 % am besten und Ölsäuremethylester mit 13 % am geringsten umgesetzt. Die Epoxidierung von Oleylalkohol konnte zwar qualitativ festgestellt werden, jedoch wurde dieses Substrat in nicht quantifizierbaren Mengen epoxidiert. Wasserstoffperoxid erwies sich als geeigneteres Oxidationsmittel für Fettsäuren, weil es die größeren Ausbeuten lieferte (relative Produktmenge 1) im Vergleich zu den beiden organischen Hydroperoxiden Cumolhydroperoxid und tertiäres Butylhydroperoxid (relative Produktmenge 0,43 bzw. 0,32). Außerdem entsteht aus Wasserstoffperoxid in der Oxidation lediglich Wasser als Nebenprodukt, wodurch dieses Oxidationsmittel im Falle einer industriellen Nutzung schonend für die Umwelt ist. Die organische Verbindung Tetcyclacis inhibierte die Peroxygenase mit einem IC<sub>50</sub> von 2,6  $\mu\text{mol/l}$ . Diese Hemmung lässt vermuten, dass dieser

Inhibitor irreversibel an das Hämmolekül des Enzyms bindet, wie es auch bei Monooxygenasen der Fall ist.

Neben Fettsäuren wurden auch Terpene und andere lipophile Naturstoffe wie z.B. *cis*-Jasmon und *cis*-Stilben durch die Peroxygenase umgesetzt. Darunter zeigte  $\gamma$ -Terpinen mit 71 % den größten, Terpinolen mit 7 % den geringsten Umsatz. Abhängig von der Molekülstruktur wurden Vertreter der *p*-Menthene unterschiedlich oxidiert: (R)-(+)-Limonen und (S)-(-)-Limonen wurden zu (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid (97 % Diastereomeren-verhältnis) bzw. (S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid (88 % Diastereomerenverhältnis) epoxidiert,  $\alpha$ -Terpinen zu *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en hydroxyliert und  $\gamma$ -Terpinen zu *p*-Cymol aromatisiert. Die Aromatisierung durch die Peroxygenase ist eine neue und noch nicht beschriebene Aktivität dieses Enzyms. Sie unterscheidet sich von Epoxidierungen und Hydroxylierungen dadurch, dass kein Sauerstoffatom vom Hydroperoxid auf das Substrat übertragen wird, sondern Wasserstoffatome vom Substrat auf das Hydroperoxid.

Eine Expressionsanalyse des Peroxygenase kodierenden Gens in Tomatenpflanzen wies Unterschiede in Bezug auf Organ und Entwicklungsstadium auf. Während zwischen Sprossachse und Blatt 4 Wochen nach Aussaat der Unterschied der Expression gering war, lag in der Sprossachse nach 8 und 12 Wochen eine signifikant höhere Expression gegenüber dem Blatt vor. Dass die Peroxygenase ein stressinduziertes Gen ist, konnte durch Auftreten der Blütenendfäule in Tomatenfrüchten gezeigt werden. Diese Stoffwechselkrankheit führte zu einer 11fach höheren Expressionsrate im Vergleich zu gesunden Früchten und bestätigte die Rolle der Peroxygenase in der Abwehr von abiotischen Stress.

## Summary

The global economy and industry depend heavily on crude oil. Apart from crude oil as an energy source, oil is used to produce a wide variety of everyday products, e.g. medicines, colors, plastics and detergents. As the oil resources are limited, a search for alternative resources is inevitable. Plants provide raw materials that are produced during the photosynthesis in a closed carbon cycle and therefore are renewable. To make these renewable resources available for technical applications, they must be chemically and/or enzymatically functionalised on a molecular level.

This work deals with the functionalisation of fatty acids and terpenes by a recombinant peroxygenase from *Solanum lycopersicum* (tomato). As peroxygenase is a membrane protein of the ER, *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) was selected for a heterologous protein expression. The enzyme was expressed in yeast cells and successfully isolated with the yeast microsomes, which are the relict of the ER. This isolation method enabled the separation of peroxygenase from other cellular proteins. The peroxygenase epoxidised various fatty acids and fatty acid derivatives like oleic acid, oleic acid methyl ester or linoleic acid at their double bonds. In contrast to a pure chemical epoxidation by *m*-chloroperoxybenzoic acid, the enzymatic epoxidation by peroxygenase was regio- and stereoselective. The peroxygenase preferred epoxidation of *cis*-double bonds compared to *trans*-double bonds.  $\alpha$ -linolenic acid was epoxidised the best with about 35 % conversion, oleic acid methyl ester showed the lowest conversion with 13 %. The epoxidation of oleyl alcohol was qualitatively determined, but the conversion was too low for a quantification. Hydrogen peroxide was the best oxidant for fatty acids because it lead to the highest product yield (relative product amount 1) compared to the organic hydroperoxides cumene hydroperoxides and tertiary butyl hydroperoxide (relative product amount 0,43 and 0,32, respectively). Furthermore, the only side product of the oxidation with hydrogen peroxide is water, which let this oxidant become an environmentally friendly co-substrate in the case of an industrial usage. The organic compound tetracyclacis inhibited the peroxygenase with a  $IC_{50}$  of 2,6  $\mu\text{mol/l}$ . This inhibition is probably caused by the irreversibly binding of tetracyclacis to the heme molecule of the enzyme, as it is known for monooxygenases.

Besides fatty acids, terpenes and other lipophilic natural products like *cis*-jasmone and *cis*-stilbene are substrates for the peroxygenase.  $\gamma$ -terpinene showed the highest conversion with 71 %, terpinolene the lowest conversion with 7 %. *p*-menthenes could be oxidised in different ways depending on their molecular structure: (R)-(+)-limonene and (S)-(-)-limonene were

---

epoxidised to (R)-(+)-limonene-*trans*-1,2-epoxide (97 % diastereomeric ratio) and (S)-(-)-limonene-*cis*-1,2-epoxide (88 % diastereomeric ratio), respectively,  $\alpha$ -terpinene was hydroxylated to *cis*-1,4-dihydroxy-*p*-menth-2-ene and  $\gamma$ -terpinene was aromatised to *p*-cymene. The aromatisation by peroxygenase is a new and not yet described activity of this enzyme. It differs from the epoxidation and hydroxylation by the fact that no oxygen atom from the hydroperoxide is transferred to the substrate, but hydrogen atoms from the substrate to the hydroperoxide.

Expression analysis of peroxygenase encoding gene in tomato plants showed differences depending on organ and stage of development. While in the leaf and stem 4 weeks after seeding the difference in expression level was low, the stem showed after 8 and 12 weeks a significantly higher expression of the peroxygenase compared to the leaf. The fact that peroxygenase is a stress-induced gene was shown in tomato fruits by the occurrence of blossom end rot. This metabolic disease led to a 11x higher expression level as compared to healthy fruits and solidifies the role of peroxygenase in defense against abiotic stress.

## 1 Einleitung

Unser heutiger Wohlstand beruht zu einem großen Teil auf der Verwendung und dem Einsatz von Erdöl. Dieser Rohstoff dient zum einen als Energiequelle, zum anderen aber auch als Ausgangsstoff der chemischen Industrie. Unsere Abhängigkeit vom Erdöl ist daran zu sehen, dass eine große Vielfalt der alltäglichen Produkte davon abstammen: Kunststoffe, Farben und Lacke, Reinigungsmittel, Kleidungsstoffe und Medikamente (Bader et al. 2009). Historisch gesehen existiert die chemische Industrie mit Erdöl als dominierende Grundlage erst seit Mitte des 20. Jahrhunderts. In den Jahren davor wurden fossile und nachwachsende Rohstoffe in etwa gleichem Umfang eingesetzt (Eierdanz 1996). Im Zuge der immer knapper werdenden Erdölvorkommen erhalten nachwachsende Rohstoffe nun seit einigen Jahren einen neuen Schub (Bader et al. 2009). Hierbei treten vor allem die pflanzlichen Rohstoffe in den Vordergrund. Sie erbringen gegenüber Erdöl den Vorteil, dass bei ihnen ein geschlossener Kohlenstoffkreislauf zwischen dem Anbau der Pflanzen, der Verarbeitung der Ernteprodukte, der eigentlichen Produktnutzung und der natürlichen Zersetzung nach Gebrauch vorliegt. Ein weiterer Gesichtspunkt sind die züchterischen und gentechnischen Möglichkeiten im Pflanzenanbau, die sich anbieten, um pflanzliche Produkte für spezielle Industriezwecke anzupassen (Eierdanz 1996). Außerdem ist die große Biomasse, die pflanzliche Rohstoffe mit sich bringen, ausschlaggebend, um Erdöl als Kohlenstoffquelle für organische Synthesen zumindest teilweise zu ersetzen (Bader et al. 2009).

Pflanzliche Rohstoffe stammen von so genannten Industriepflanzen ab. Sie lassen sich in die zwei großen Gruppen der Ölpflanzen (Soja, Raps, Sonnenblume) und Kohlenhydratpflanzen (Zuckerrübe und Zuckerrohr, Kartoffel, Mais, zelluloseliefernde Pflanzen) aufteilen. Als kleinere Gruppen sind Heil- und Färbepflanzen sowie latex- und pestizidliefernde Pflanzen zu nennen (Lieberei et al. 2007; Bader et al. 2009). Mit den Öl- und Kohlenhydratpflanzen lassen sich die wichtigsten pflanzlichen Rohstoffe für die chemische Industrie herstellen. Zu diesen Rohstoffen zählen pflanzliche Öle, Cellulose, Stärke und Zucker (Bader et al. 2009). Anhand der steigenden Anbauflächen für Industriepflanzen wird deutlich, dass das Verlangen seitens der Industrie nach pflanzlichen Rohstoffen von Jahr zu Jahr größer wird. Für das Jahr 2012 wird geschätzt, dass in Deutschland über 40.0000 ha mit Industriepflanzen bewirtschaftet werden. Im Vergleich dazu lag im Jahr 2009 die Anbaufläche noch unter 30.0000 ha (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.).

Trotz steigender Anbauflächen wurden in Deutschland im Jahr 2009 nur etwa 10 % der Kohlenstoff-basierten Rohstoffquelle für die organisch-chemische Industrie aus Pflanzen-

oder Tiermaterial bezogen (Bader et al. 2009). Gründe sind die schwankende Qualität der Rohstoffe, eine noch nicht ausgereifte Verfahrenstechnik, ein noch relativ großer Entwicklungsbedarf bei den Endprodukten und letztendlich auch höhere Produktionskosten im Vergleich zu erdölbasierten Produkten (Bader et al. 2009). Die Ursache für die sich noch entwickelnde Produktionsumstellung sind die unterschiedlichen, chemischen Zusammensetzungen von Erdöl und pflanzlichen Rohstoffen. Während Erdöl einen Kohlenstoffanteil von 85-90 % und einen Sauerstoffanteil von 0-1,5 % besitzt, beträgt er z.B. bei Pflanzenölen 76 bzw. 11 %. Hinzu kommt, dass sich beide Rohstoffquellen auf Ebene der chemischen Stoffklassen stark unterscheiden (Bader et al. 2009).

Heutzutage werden zwei Strategien für die industrielle Verwendung pflanzlicher Rohstoffe verfolgt. Die erste ist die mehr oder weniger direkte Nutzung der Biomoleküle, wie z. B. von Kohlenhydraten, Ölen und Terpenen (Corma et al. 2007). Die zweite Strategie beinhaltet den Abbau der Biomoleküle zu kleineren Synthesebausteinen, die als Plattformchemikalien für die Herstellung anderer Verbindungen dienen. Beispiele für solche Plattformchemikalien sind Methanol, Ethen, Bernsteinsäure und Furane (Bader et al. 2009). Die Palette an Produkten auf Basis pflanzlicher Rohstoffe ist vielfältig. Auf Grund der intensiveren Nutzung von nachwachsender Biomasse und der sich entwickelnden „grünen Chemie“ ist eine Steigerung der Produktvielfalt wahrscheinlich (Eierdanz 1996; Corma et al. 2007). Insbesondere die Herstellung von Feinchemikalien und Kunststoffen aus Kohlenhydraten, Fetten und Terpenen wird heute schon in technischem Maßstab vollzogen.

## 1.1 Pflanzliche Öle

In den vergangenen 30 Jahren hat der Anbau von Ölpflanzen weltweit stark zugenommen. Während Anfang der 1980er Jahre 165 Mio. t Ölsaaten produziert wurden, waren es im Wirtschaftsjahr 2008/2009 mehr als 400 Mio. t. Davon machen 57 % Sojaöl, 13 % Rapsöl und jeweils etwa 8 % Sonnenblumen- und Erdnussöl aus (Matthäus 2009). In Deutschland werden die produzierten Pflanzenöle zum Großteil als Bioenergie (67 %) und Nahrungs- und Futtermittel (24 %) verwendet, nur 9 % finden den Weg in die chemische Industrie (Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.). Trotzdem stehen pflanzliche Öle an oberster Stelle der nachwachsenden Rohstoffe für die Industrie (Bader et al. 2009). Ein Grund für den starken industriellen Einsatz liegt in der chemischen Verwandtschaft der pflanzlichen Öle mit einigen Erdölfraktionen. Bei ihrer Verwendung kann auf eine aufwendige Synthese von aliphatischen Kohlenstoffketten verzichtet werden (Corma et al. 2007; Bader et al. 2009).

Chemisch gesehen sind pflanzliche Öle Ester aus drei Fettsäuren mit Glycerin, so genannte Triglyceride. In der Regel sind die Fettsäuren in einem Triglycerid nicht verzweigt und enthalten eine gerade Anzahl an Kohlenstoffatomen. Die Kettenlänge der Fettsäure und das Vorhandensein von (*cis*-)Kohlenstoffdoppelbindungen hängen von der jeweiligen Fettart ab und bestimmen den Schmelzpunkt eines Fettes: Je kürzer der aliphatische Rest ist und je mehr Doppelbindungen vorhanden sind, desto niedriger ist der Schmelzpunkt (Hart et al. 2007).

Für ihre Anwendung in der Industrie werden die pflanzlichen Öle meist in ihre Hauptbestandteile Fettsäuren und Glycerin gespalten. Die Hydrolyse (Verseifung) der Fette kann durch Lipasen enzymatisch erfolgen, wird in der Technik jedoch überwiegend chemisch durchgeführt (Corma et al. 2007). Der chemische Weg sieht eine Hydrolyse der Triglyceride durch hohe Temperatur, hohen Druck und einen Metallkatalysator vor. Eine Alternative dazu stellt das Erhitzen zusammen mit Natronlauge dar. Das entstandene Glycerin kann direkt als Frostschutz- oder Lösungsmittel eingesetzt werden und ist Bestandteil von Rasierseifen, Kosmetika und Hustensäften (Corma et al. 2007; Hart et al. 2007). Glycerin kann aber auch zu Dihydroxyaceton und Glycerinsäure oxidiert und als Plattformchemikalie verwendet werden. Darüber hinaus sind Glycerylcarbonatester und Polyglycerol pharmazeutisch aktive Substanzen (Corma et al. 2007). Das zweite Produkt der Fetthydrolyse sind die Fettsäuren. Als ein Alltagsprodukt sind die Natrium- oder Kaliumsalze der Fettsäuren zu erwähnen, die unter dem Namen Seifen bekannt sind (Hart et al. 2007). Fettsäuren können chemisch und/oder biotechnologisch funktionalisiert werden und erhalten dadurch neue Eigenschaften und erweiterte Anwendungsmöglichkeiten.

### **1.1.1 Chemische Funktionalisierung von Fettsäuren**

Die Carboxylgruppen der freien Fettsäuren können chemisch modifiziert und in Amine, Alkohole, Sulfate oder Ester umgewandelt werden. Dadurch erhöht sich ihre Vielfalt und sie finden Anwendungen beispielsweise als Rostschutzmittel, Tenside, Emulgatoren, Weichmacher von Lacken und als Bestandteile von Kosmetika und Wachsen (Corma et al. 2007; Bader et al. 2009; Hart et al. 2007).

Ein anderer Angriffspunkt der Fettsäuremodifikation ist neben der Carboxylgruppe der aliphatische Rest. Er kann durch katalytischen Einbau von Kohlenstoffmonoxid an einer ungesättigten Doppelbindung hydroformyliert werden. Die gebildeten Aldehyde können u. a. für die Synthese von Polyestern und Polyamiden verwendet werden (Pryde et al. 1972). Dimerisierungen von ungesättigten Fettsäuren ermöglichen die Verdoppelung der Kettenlänge. Das gebildete Dimer kann für die Bildung von Polyethern und Polyurethanen herangezogen



werden (Heidbreder et al. 1999). Als weitere Modifikation von ungesättigten Fettsäuren ist die Metathese zu erwähnen. Sie ermöglicht die Umstrukturierung der Kohlenstoffketten und eine Produktion neuer hochwertiger Oleochemikalien (Choo et al. 1996; Mol 2002).

### 1.1.2 Biotechnologische Funktionalisierung von Fettsäuren

Die biotechnologische Umwandlung von Naturstoffen mit Mikroorganismen und/oder Enzymen wird als weiße Biotechnologie bezeichnet. Die Reaktionswege dieser Technologie unterscheiden sich manchmal deutlich von einer rein chemischen Synthese. Mit der weißen Biotechnologie können Feinchemikalien hergestellt werden, deren Synthese in einem chemischen Prozess zu komplex, zu ineffizient, ökologisch zu problematisch oder auch zu teuer wären. Beispiele hierfür sind die Produktionen von Ethanol, Zitronensäure, einigen Aminosäuren und den Vitaminen B<sub>2</sub> und B<sub>12</sub> (Schmid 2006). Neben vielen Naturstoffen werden auch Fette und Fettsäuren mittels der weißen Biotechnologie in neue Verbindungen umgewandelt, die entweder direkt angewandt werden können oder als Plattformchemikalien für weitere Synthesen dienen.

Lipasen sind die am meisten eingesetzten Enzyme der Fett-Biotechnologie (Metzger und Bornscheuer 2006; Schörken und Kempers 2009). In der Natur sind sie für die Hydrolyse von Triglyceriden verantwortlich, um Nahrungs- oder Speicherfette in Glycerin und Fettsäuren zu spalten und für den Organismus zur Verfügung zu stellen (Christen und Jaussi 2005; Heldt und Heldt 2003). Lipasen werden zur Fettspaltung in der Waschmittel-, Lebensmittel-, Kosmetik- und Papierindustrie eingesetzt (Hasan et al. 2006; Schmid 2006). Da Lipasen oft chemo-, regio- und stereoselektiv arbeiten, können sie in der Praxis zur gezielten Hydrolyse bestimmter Fettsäuren in einem Triglycerid herangezogen werden. Eine Kombination von Esterspaltung und Esterbildung durch Lipasen dient in der Praxis für eine Umesterung und gezielten Synthese gewünschter Triglyceride (Metzger und Bornscheuer 2006).

Außer den Lipasen finden die Lipoxygenasen eine kommerzielle Anwendung zur Modifikation von Fettsäuren. Sie katalysieren die Dioxygenierung von Linol- und Linolensäure mit einem *cis*, *cis*-1,4-Pentadiensystem und führen zur Bildung konjugierter Hydroperoxydiensäuren. Eine im Anschluss durchgeführte Spaltung der Kohlenstoffkette durch eine Hydroperoxid-Lyase führt zur Bildung der Aromastoffe Hexenal oder Hexanal, die weiter zu Hexenol bzw. Hexanol reduziert werden können. Auf diese Weise werden natürliche Aromastoffe für die Nahrungs- und Duftstoffindustrie aus Fettsäuren produziert (Heldt und Heldt 2003; Schörken und Kempers 2009). Hydroperoxydiensäuren können mit Cystein zu Hydroxydiensäuren reduziert werden, die Anwendungen in Kosmetik-, Farbstoff-

und Lebensmittelindustrie finden sowie als Monomere für Polymerisationsreaktionen eingesetzt werden können (Huang und Schwab 2011). Neben Linol- und Linolensäure fungiert auch die Ricinolsäure als Edukt für die biotechnologische Synthese eines Aromastoffes. In diesem Fall wird die Fettsäure mikrobiell durch *Yarrowia lipolytica* in das fruchtig-ölige  $\gamma$ -Decalacton umgewandelt (Aguedo et al. 2004).

Ein anderer biotechnologischer Verwendungszweck von Fettsäuren sind die Biotenside. Biotenside sind Detergenzien, die aus einer hydrophoben Schwanzgruppe, wie z. B. einer Fettsäure, und einem hydrophilen Kopfende bestehen. Der hydrophile Rest kann je nach Biotensid ein Zucker, ein Peptidrest oder Phosphat sein, die Tenside werden dann jeweils als Glykolipide, Lipopeptide bzw. Phospholipide bezeichnet (Schmid 2006). Industriell wichtige Biotenside sind die beiden zur Gruppen der Glykolipide gehörenden Sophorolipide und Rhamnolipide und das Lipopeptid Surfactin (Schörken und Kempers 2009). Sie werden aus Fettsäuren, Fetten oder auch aus Fettabfällen mit Hilfe verschiedener Mikroorganismen produziert und können als Detergenz und Emulgator in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie oder auch bei der Reinigung ölverseuchter Böden eingesetzt werden (Gorin et al. 1961; Felse et al. 2007).

### 1.1.3 Epoxidierung von Fettsäuren

Ungesättigte Fettsäuren können an ihren Doppelbindungen epoxidiert werden. Eine der ersten Epoxidierungsreaktionen an ungesättigten Kohlenstoffverbindungen wurde 1909 mit Benzoylhydroperoxid als Oxidationsmittel durchgeführt (Prileschajew 1909). Bei dieser sogenannten Prileschajew-Reaktion wird von einem Hydroperoxid oder von einer Persäure, z. B. der *m*-Chlorperbenzoesäure, ein Sauerstoffatom auf eine Doppelbindung übertragen. Als Produkte entstehen ein Alkohol bzw. die reduzierte Säure und ein Epoxid (Abbildung 1.1).

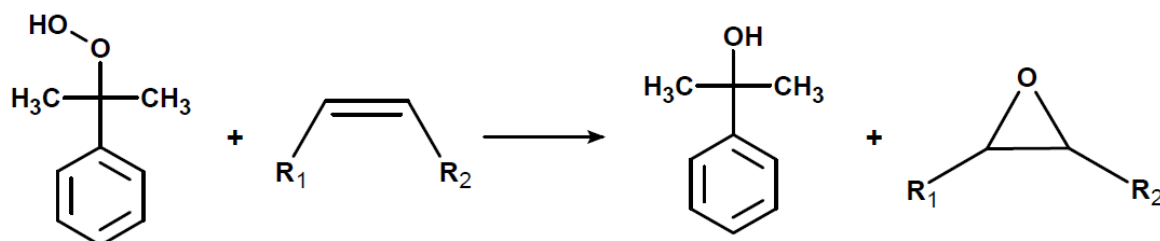


Abbildung 1.1 Prileschajew-Reaktion (Prileschajew 1909).

In einer chemoenzymatischen Variante der Prileschajew-Reaktion oxidiert eine Lipase mit Wasserstoffperoxid eine ungesättigte Fettsäure zu einer Persäure. Im Anschluss wird die

Persäure an ihrer Doppelbindung epoxidiert und eine Epoxyfettsäure gebildet (Rüsch und Warwel 1997). Als Katalysatoren können auch Übergangsmetalle wie Vanadium, Molybdän oder Rhenium zur Bildung von Epoxiden eingesetzt werden. Das Oxidationsmittel ist in diesen Fällen ein Hydroperoxid (Sharpless und Michaelson 1973; Sobczak und Ziólkowski 2003; Herrmann et al. 1991). Eine Abwandlung dazu ist die Einlagerung von Titan in die Hohlräume von Zeolithen. Durch die damit verbundene Oberflächenvergrößerung wird eine heterologe Katalyse zur Epoxidierung von Fettsäuremethylestern ermöglicht (Guidotti et al. 2003). Weiterentwicklungen solcher Katalysatoren sind Übergangsmetallkomplexe, die aus einem Titanoxid und enantiomerreinem Diethyltartrat bestehen. Diese Komplexe ermöglichen die selektive Synthese enantiomerer Epoxide (Katsuki und Sharpless 1980). Spezielle Metallkomplexe sind die Metalloporphyrine. Sie bestehen aus einem Tetrapyrrolring mit einem komplexiertem Metallion. Metalloporphyrine katalysieren unter Verwendung verschiedener Oxidationsmittel den Einbau einer Epoxidgruppe an eine Doppelbindung. Der Enantiomerenüberschuss liegt zwischen 70 und 80 % (Besse und Veschambre 1994). Diese Katalyse kann als eine Art Nachahmungsreaktion von hämhaltigen Enzymen verstanden werden. Trotz der Vielfalt an möglichen chemischen Epoxidierungen sind sie mit Ausnahme der Prileschajwe-Reaktion noch nicht vollständig ausgereift, um für industrielle Synthesen verwendet zu werden (Corma et al. 2007).

Neben den genannten Möglichkeiten der chemischen existieren noch die enzymatischen Epoxidierungen. Enzyme haben gegenüber einer rein chemischen Epoxidierung den Vorteil, dass sie regio- und stereospezifisch epoxidieren (Besse und Veschambre 1994). Durch Monooxygenasen in einer Bakterienkultur von *Pseudomonas oleovorans* oder *Corynebacterium equi* können endständige Doppelbindungen an Alkenen und Alkenderivaten *in vivo* epoxidiert werden (May und Schwartz 1974; Ohta und Tetsukawa 1978; de Smet et al. 1983). Der Enantiomerenüberschuss erreicht teilweise 100 % (Ohta und Tetsukawa 1978). Neben den Monooxygenasen epoxidieren auch Chloroperoxidasen Alkene mittels Wasserstoffperoxid zu den entsprechenden Epoxiden. Der Enantiomerenüberschuss ist sehr hoch und liegt zwischen 74 und 98 % (Allain und Hager 1993). Halohydrinepoxidasen aus *Flavobacterium spec.* verwenden als Substrat ein  $\alpha,\beta$ -Halohydrin (Halogenalkan mit benachbarter Hydroxygruppe). Das Halogen wird als entsprechendes Halogenid abgespalten und aus der Hydroxygruppe entsteht ein Epoxid (Geigert et al. 1983).

Zusätzlich zu den bakteriellen können auch pflanzliche Enzyme eine Epoxidierung an Doppelbindungen durchführen. Mit Hilfe einer rekombinanten Cytochrom-P450-Monooxygenase aus dem Wolfsmilchgewächs *Euphorbia lagascae* konnte aus Linolsäure

12-Epoxyoctadeca-*cis*-9-ensäure (Vernolsäure) *in vitro* hergestellt werden (Cahoon et al. 2002). Trotz vieler weiterer Experimente zur Epoxidierung durch Monooxygenasen wurden kaum Fettsäuren als Substrate untersucht (Chua et al. 2012). Auf die pflanzliche Peroxygenase und ihre oxidierenden Eigenschaften wird in Kapitel 1.3.2 detailliert eingegangen.

Fettsäureepoxide können als Flammschutzmittel, Hitze- und Lichtstabilisatoren verwendet werden. Sie besitzen Eigenschaften von Weichmachern und werden Schmiermitteln, Urethanschäumen und Kunststoffen zugesetzt (Corma et al. 2007). Epoxide sind außerdem sehr vielfältige Plattformchemikalien, die durch stereospezifische Ringöffnungen in bifunktionale Moleküle überführt werden können (Besse und Veschambre 1994). Sie reagieren mit ein- und mehrwertigen Alkoholen zu Etheralkoholen, speziellen Polyolen für die Polyurethansynthese (Gruber et al. 1987). Durch säurekatalysierte Hydrolyse entstehen aus den Epoxiden zweiwertige Alkohole mit benachbarten Hydroxygruppen. Eine Behandlung der Epoxide mit Natriumazid oder Dimethylthioformamid führen zu Epiamino- bzw. Epithiofettsäuren (Jie und Zheng 1988; Metzger und Fürmeier 1999). Amine entstehen aus Fettsäureepoxiden durch eine Ringöffnung mit Diethylaminen (Biswas et al. 2005). All diese Umwandlungen der Epoxidgruppe in eine andere funktionelle Gruppe erhöhen die Vielfalt an chemischen und physikalischen Eigenschaften. Diese neuen Stoffe können zur Herstellung von Emulgatoren, Polymeren, Kosmetika und Pharmazeutika herangezogen werden (Harry-O'kuru et al. 2002; Lligadas et al. 2006; Corma et al. 2007).

## 1.2 Terpene

Terpene sind sekundäre Pflanzenstoffe, die als Grundstruktur das Isopren enthalten. Sie werden nach der Anzahl der Kohlenstoffe in Hemiterpene (C<sub>5</sub>), Monoterpene (C<sub>10</sub>), Sesquiterpene (C<sub>15</sub>), Diterpene (C<sub>20</sub>), Triterpene (C<sub>30</sub>) und Tetraterpene (C<sub>40</sub>) untergliedert. Terpene sind überwiegend lipophile Verbindungen mit meist ein oder mehreren Doppelbindungen. Unter den sekundären Pflanzenstoffen machen die Terpene die vielfältigste Gruppe aus. Es sind mehr als 20.000 Terpene bekannt. Die verschiedenen Terpene erfüllen eine große Anzahl an überwiegend ökologischen Funktionen. Monoterpene fungieren auf Grund ihrer Flüchtigkeit als Lockstoff für Bestäuber (z. B. Linalool) oder auch als Abwehrstoff gegen Schädlinge (z. B. Pinen). Zu den Sesqui- und Diterpenen zählen ebenfalls Phytoalexine und Phytohormone wie Abscesinsäure und die Gibberelline. Membranbausteine wie das Cholesterin sind Triterpene und Photosynthesepigmente wie die Carotinoide sind

Tetraterpene (Heldt und Heldt 2003; Taiz und Zeiger 2006; Lieberei et al. 2007). Innerhalb des Pflanzenorganismus liegen Terpene u.a. auch als Bestandteile von Harzen, Wachsen, Milchsaft und ätherischen Ölen vor. Aus diesen Sekreten werden Terpene für kommerzielle Anwendungen gewonnen. Besonders die Terpentinöle von Nadelbäumen und der Terpentinpistazie (*Pistacia terebinthus*) sowie die ätherischen Zitrusöle sind von wirtschaftlicher Bedeutung (Corma et al. 2007; Heldt und Heldt 2003). Terpene dienen in der Praxis als Aroma- und Duftstoffe, natürliche Insektizide, Lösungsmittel, Pharmaka und Pharmakavorstufen (Heldt und Heldt 2003; Taiz und Zeiger 2006). Die meisten Terpene werden direkt eingesetzt, jedoch können sie auch chemisch oder biotechnologisch in neue Verbindungen umgewandelt werden, wodurch die Produktvielfalt erhöht wird (Corma et al. 2007).

### 1.2.1 Chemische Funktionalisierung

Terpene können durch verschiedene chemische Reaktionen funktionalisiert werden. Eine dieser Möglichkeiten ist die Isomerisation. Hierbei wird ein Terpen in ein Konstitutionsisomer umgewandelt. Das jeweilige Produkt der Isomerisation hängt von den Reaktionsbedingungen und Katalysatoren ab. Eine Isomerisierung von Limonen resultiert – auf Grund stattfindender Sekundärreaktionen – meist in mehreren Produkten wie z. B.  $\alpha$ -Terpinen,  $\gamma$ -Terpinen, Terpinolen oder *p*-Cymol (Corma et al. 2007). Aus  $\alpha$ -Pinen entstehen als Hauptprodukte Camphen und Limonen, letzteres kann wiederum zu anderen Monoterpenen isomerisieren (Takashi et al. 1998; Yadav et al. 2004; Yamamoto et al. 2000). Aldolreaktionen zwischen Aldehyd- und Ketogruppen von Terpenen wurden am Citral, dem Gemisch von Geranial und Neral, untersucht. Citral kondensiert mit Aceton zu Pseudoionon, welches über Zwischenreaktionen zur Synthese von Vitamin A verwendet wird. Mit Methylethylketon kondensiert Citral zu *n*-Methylpseudoionon und Isomethylpseudoionon (Abelló et al. 2005).

Eine Aromatisierung findet bei Terpenen mit dem *p*-Menthan-Grundgerüst statt. Ein Mangan-Aluminium-Katalysator oxidiert  $\gamma$ -Terpinen zu *p*-Cymol mit einer Ausbeute von 95 % (McBride et al. 1999). Limonen wird in Anwesenheit eines Palladium-Silikat-Katalysators zu *p*-Cymol aromatisiert; die Ausbeute beträgt fast 100 %. Dieser Reaktion liegen eine Hydrierung von Limonen zu *p*-Menthan und eine Dehydrierung von *p*-Menthan zu *p*-Cymol zu Grunde (Buhl et al. 1999). Anschließend kann *p*-Cymol durch Salpetersäure und Kaliumpermanganat zu Terephthalsäure, einem Monomer für Polyethylenterephthalat-Kunststoffe (PET), oxidiert werden (Colonna et al. 2011).

Terpene können ebenfalls an ihren Doppelbindungen epoxidiert werden. Die dabei erhaltenen Terpenepoxide sind Ausgangsmaterialien der organischen Chemie und können für die Synthese von Alkoholen, Carbonylverbindungen oder Ethern verwendet werden. Die beiden *cis-trans*-Isomere Geraniol und Nerol werden mit einem Umsatz von 96 bzw. 98 % jeweils zum 6,7-Epoxid oxidiert. Die Enantioselektivität liegt bei über 80 %, Nebenprodukte sind geringe Mengen an 2,3-Epoxid und an Diepoxid (Saladino 2003). Ein Beispiel für die Epoxidierung eines ringförmigen Monoterpens stellt  $\alpha$ -Pinen dar.  $\alpha$ -Pinen wird in Anwesenheit schwermetallhaltiger Katalysatoren durch verschiedene Oxidationsmittel zu  $\alpha$ -Pinenoxid epoxidiert. Das  $\alpha$ -Pinenoxid kann im Anschluss zu 1,2-Pinandiol, D-Verbenon oder Campholenaldehyd umgewandelt werden (Corma et al. 2007). (R)-(+)-Limonen wird mit einer Enantioselektivität von 83 % und einem Umsatz von 75 % zu (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid oxidiert. Als Oxidationsmittel fungiert Wasserstoffperoxid, der Katalysator ist Methylrheniumtrioxid (Saladino 2003). (R)-(+)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid entsteht bei Verwendung von molekularem Sauerstoff und einem Mangan-Salen-Komplex auf Hydrotalkit-Mineral. Die Enantioselektivität liegt hier bei 93 % und der Umsatz bei 95 % (Bhattacharjee et al. 2004). Limonen-1,2-epoxide finden Verwendung in Lacken und Druckfarben (Corma et al. 2007), können jedoch auch zusammen mit Kohlenstoffdioxid in Anwesenheit eines  $\beta$ -Diiminat-Zink-Katalysators zu einem Polycarbonat polymerisieren (Byrne et al. 2004). Werden Limonene an beiden Doppelbindungen epoxidiert, entstehen Limonendioxide. Aus diesen Stoffen können Limonendicarbonate hergestellt werden, die zur Synthese von isocyanatfreien Polyurethanen herangezogen werden können (Bähr et al. 2012).

### 1.2.2 Biotechnologische Funktionalisierung

Durch die Methoden der weißen Biotechnologie können Terpene mit Hilfe von Mikroorganismen, pflanzlichen Zellkulturen oder isolierten Enzymen umgesetzt werden. Dadurch entstehen aus herkömmlichen Terpenen neue Stoffe, die andere Eigenschaften mit sich bringen und neue Anwendungen finden können.

Aus (R)-(+)-Limonen entstehen *in vitro* mittels einer rekombinanten Monooxygenase aus *Bacillus licheniformis* die Hauptprodukte (R)-(+)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid (32 %) und *cis*-Carveol (28 %) sowie vier weitere Nebenprodukte (u. a. (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid zu 10 %). (S)-(-)-Limonen dagegen wird durch das gleiche Enzym zu (S)-(-)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid (43 %) oxidiert, als Nebenprodukt wird u. a. *cis*-Carveol (20 %) gebildet (Dietrich et al. 2008). Zellfreie Extrakte von *Tanacetum vulgare* (Rainfarn) enthalten oxidierende Enzyme, die Geraniolpyrophosphat zu etwa 96 % umsetzen. Als Produkte

entstehen mehr als 14 hydroxylierte und epoxidierte Derivate des Geraniols wie 3,7-Dimethylocta-*trans*, *trans*-2,5-Dien-1,7-diol (40 %) und 6,7-Epoxygeraniol (22 %) (Banthorpe et al. 1977).

Statt der Reaktionen *in vitro* besteht auch die Möglichkeit, Terpene lebenden Systemen zuzufügen und sie *in vivo* umzusetzen (Biotransformation). Der pflanzenpathogene Pilz *Glomerella cingulata* oxidiert in einer sieben Tage dauernden Biotransformation  $\alpha$ -Bisabolol zu (3R, 4R)-3,4-Dihydroxy-bisabololoxid B als Hauptprodukt (78 %) und zu (3S, 4S)-3,4-Dihydroxy-bisabololoxid B und (3R, 4R)-3,4-Dihydroxy- $\alpha$ -bisabolol als Nebenprodukte (18 bzw. 4 %) (Miyazawa et al. 1995).  $\alpha$ -Ionon wird in einer Zellkultur desgleichen Pilzes zu  $\alpha$ -Ionol und 7,8-Dihydro- $\alpha$ -ionol reduziert (Miyazawa und Shimizu 2012). Der Hefepilz *Trichosporon cutaneum* setzt in einer Biotransformation verschiedene Mono- und Sesquiterpene um. (R)-(-)-Carvon wird mittels einer Bayer-Villiger-Monooxygenase durch Einbau eines Sauerstoffatoms in den *p*-Menthenring zu einem Lakton, dem (6R)-Isoprenyl-(3R)-methyl-2-oxo-oxepanon, oxidiert. Das Lakton kann durch eine Laktonhydrolase zu einer Oxosäure hydrolysiert werden. Weitere Produkte von (R)-(-)-Carvon sind der Alkohol (1S,2R,4R)-Neoisodihydrocarveol und das Epoxid 2,3-Epoxy-(5R)-isopropenyl-2-methylcyclohexenol. *T. cutaneum* oxidiert außer (R)-(-)-Carvon auch *cis*-Jasmon. Bei dessen Oxidation entstehen 4-Hydroxyjasmon, 7,8-Epoxyjasmon und 7,8-Dihydroxyjasmon. (R)-(+)-Limonen wird an einer der beiden Doppelbindungen zu einem 1,2-Diol oder einem 8,9-Diol hydroxyliert (Pinheiro und Marsaioli 2007).

Außer mit einer Zellkultur aus Pilzen kann eine Terpenumsetzung auch mit einer pflanzlichen Zellkultur erfolgen. Die Zugabe von (S)-(-)-Limonen zu Zellsuspensionen von *Solanum aviculare* (Känguruapfel) oder *Dioscorea deltoidea* (Yams) resultiert nach zehntägiger Inkubation in einer kompletten Verstoffwechslung des Limonens. Das entstehende Produktgemisch setzt sich aus 19 % *cis*-Carveol, 6 % *trans*-Carveol und 34 % Carvon bei *S. aviculare* und 20 % *cis*-Carveol, 19 % *trans*-Carveol und 13 % Carvon bei *D. deltoidea* zusammen. Eines der Nebenprodukte ist *p*-Menth-8-en-1,2-diol (Vaněk et al. 1999). Wird  $\gamma$ -Terpinen zusammen mit Blättern von *Thymus vulgaris* (Thymian) inkubiert, wird es zu *p*-Cymol aromatisiert. Ein Folgeprodukt ist Thymol (Poulose und Croteau 1978).

### 1.3 Oxido-Reduktasen

Enzyme, die eine Redoxreaktion katalysieren, zählen zur Klasse der Oxido-Reduktasen. Verschiedene Vertreter dieser Klasse werden in der Biotechnologie eingesetzt, um Substrate

zu oxidieren. Eine enzymatische Reaktion hat gegenüber einer chemischen oft den Vorteil, dass sie regio- und enantioselektiv verläuft und ein Reaktionstyp favorisiert wird (Schmid 2006).

### 1.3.1 Verschiedene Vertreter der Oxido-Reduktasen

Als sehr bekannte und weit verbreitete Oxido-Reduktasen sind die Monooxygenasen zu nennen. Sie übertragen von einem O<sub>2</sub>-Molekül ein Sauerstoffatom auf ein Substrat, das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert. Auf diese Weise katalysieren sie Hydroxylierungen, Epoxidierungen oder auch eine Bayer-Villiger-Reaktion (Pinheiro und Marsaioli 2007). Als prosthetische Gruppe befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms ein Hämmolekül; Monooxygenasen zählen zu den Cytochromen. Das Eisenion des Hämmoleküls ist an der Elektronenübertragung auf den Sauerstoff beteiligt. Als Co-Substrat fungiert NAD(P)H, welches zu NAD(P)<sup>+</sup> oxidiert wird (Besse und Veschambre 1994; Heldt und Heldt 2003). Unter den vielen verschiedenen Monooxygenasen wurden vor allem die bakteriellen Enzyme zu Oxidationsversuchen herangezogen. Ihr Vorteil gegenüber eukaryontischen Monooxygenasen liegt in der meist höheren Aktivität und in der Tatsache, dass die bakteriellen Vertreter keine Membranproteine und folglich einfacher zu handhaben sind (Schewe et al. 2011). Dioxygenasen enthalten auch ein Hämmolekül als prosthetische Gruppe. Im Unterschied zu den Monooxygenasen übertragen sie jedoch zwei Sauerstoffatome auf das Substrat. Zu den Dioxygenasen zählen die Lipoxygenasen und die Cyclooxygenasen. Lipoxygenasen oxidieren Linol- und Linolensäure zu einem Hydroperoxid (Heldt und Heldt 2003), wohingegen Cyclooxygenasen Arachidonsäure zu einem Endoperoxid oxidieren, welches Bestandteil des Prostaglandinsyntheseweges ist (Hemler und Lands 1976). Ein Nachteil von Monooxygenasen (und teilweise auch von Dioxygenasen) für kommerzielle Redoxreaktionen ist die Abhängigkeit von NAD(P)H, ohne welches keine Oxidation stattfinden kann. Anstatt die Enzyme zu isolieren und der Enzymkatalyse das relativ teure NAD(P)H von außen zuzufügen, wird in der Praxis meist auf eine *in vivo*-Oxidation durch Monooxygenasen zurückgegriffen. Bei einer Reaktion mit lebenden Zellen reduziert der zelluläre Stoffwechsel das NAD(P)<sup>+</sup> zu NAD(P)H, welches dann für neue Oxidationen zur Verfügung steht (Schewe et al. 2011).

Dehydrogenasen sind Oxido-Reduktasen, die ein Substrat durch Abspaltung von Wasserstoff oxidieren. Sie benötigen dazu einen Cofaktor wie NAD(P)<sup>+</sup> oder FAD<sup>+</sup> als Oxidationsmittel, der zu NAD(P)H bzw. FADH<sub>2</sub> reduziert wird. Die unterschiedlichen Absorptionsspektren der oxidierten und reduzierten Form des Cofaktors werden in der Praxis genutzt, um



biochemische Quantifizierungen mit Dehydrogenasen durchzuführen. Als Beispiel ist die Bestimmung der Blutkonzentrationen von Ethanol und Glukose in medizinischen Laboren zu nennen. Hierbei wird der jeweilige Metabolit durch eine Dehydrogenase und in Anwesenheit eines Cofaktors oxidiert, die Cofaktoren werden unter Änderung ihres Absorptionsspektrums reduziert (Schmid 2006).

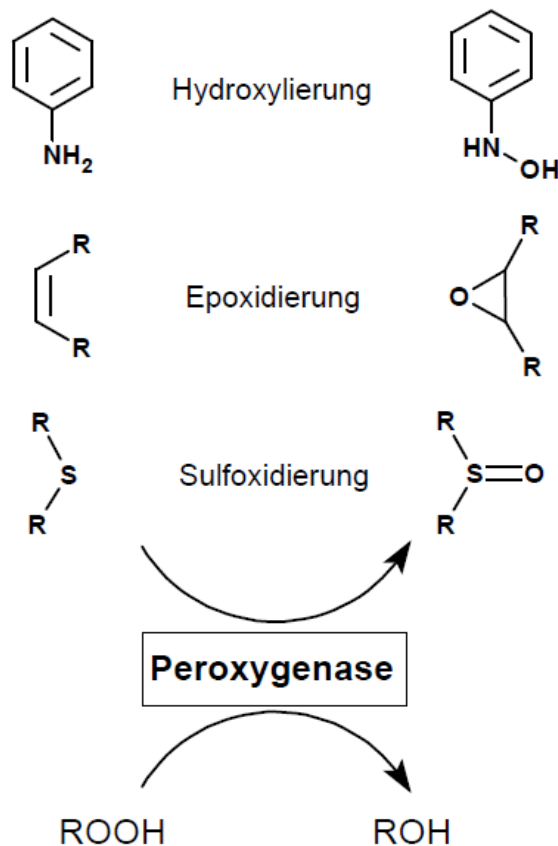
Eine weitere Gruppe der Oxido-Reduktasen sind die Oxidasen. Diese Enzyme übertragen Elektronen von einem Substrat auf molekularen Sauerstoff, welcher zu Wasserstoffperoxid oder Wasser reduziert wird. Als Elektronendonator fungiert im Falle der Glukose-Oxidase Glukose, die durch Sauerstoff zu  $\delta$ -Glukonolacton oxidiert wird. Der Sauerstoffverbrauch in dieser Enzymreaktion wird in einem Glukose-Oxidase-Biosensor ausgenutzt, um die Blutglukosekonzentration zu messen (Clark und Pazdernik 2009).

Die vierte Gruppe der Oxido-Reduktasen sind die Peroxidasen. Sie verwenden als Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid. Peroxidasen oxidieren Phenole zu Phenolradikalen, welche dann spontan, d.h. nicht enzymatisch, dimerisieren und polymerisieren. Diese Reaktionen finden während der Ligninbiosynthese statt (Heldt und Heldt 2003). Die Chlorperoxidasen katalysieren verschiedene Oxidationen wie die Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden (Kiljunen und Kanerva 2000) oder die Übertragung eines Sauerstoffatoms des Wasserstoffperoxids auf ein Substrat, welches sulfoxidiert (Colonna et al. 1990), epoxidiert (Allain und Hager 1993) oder hydroxyliert wird (Zaks und Dodds 1995). Peroxidasen benötigen weder NAD(P)H noch FAD und grenzen sich damit von den Monooxygenasen und Dehydrogenasen ab. Diese Unabhängigkeit von einem Cofaktor vereinfacht eine kommerzielle Anwendung wie z. B. der Meerrettichperoxidase als Reporterenzym in der Immunanalytik (Schmid 2006).

### 1.3.2 Peroxygenase

Das Enzym Peroxygenase (PXG), EC-Nummer 1.11.2.3, wurde das erste Mal von Ishimaru und Yamazaki 1977 in isolierten Mikrosomen aus *Pisum sativum* (Erbsen) beschrieben. Die Forscher konnten darin eine Enzymaktivität feststellen, die in Anwesenheit eines Hydroperoxids Substrate wie Indol, Phenol und Anilin hydroxyliert. Das Hydroperoxid wird in der Reaktion zu einem Alkohol reduziert. Neben Hydroxylierungsreaktionen (Ishimaru und Yamazaki 1977) katalysiert die PXG jedoch auch die Sulfoxidation organischer Schwefelverbindungen (Blée et al. 1985; Blée und Durst 1987; Blée und Schuber 1989) und die Epoxidierung von Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren (Blée und Schuber 1990a). Als Hydroperoxide fungieren Fettsäurehydroperoxide, Wasserstoffperoxid, tertiäres

Butylhydroperoxid oder Cumolhydroperoxid (Ishimaru und Yamazaki 1977; Blée und Schuber 1990a) (Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2** Die pflanzliche Peroxygenase katalysiert in Anwesenheit eines Hydroperoxids (ROOH) Hydroxylierungen, Epoxidierungen und Sulfoxidierungen (Blée 1998a).

Im Mechanismus der Oxidationen durch die PXG ist ein Hämmolekül als prosthetische Gruppe involviert. Als erste Teilreaktion bindet das Hydroperoxid im aktiven Zentrum der PXG. Die Hydroperoxidgruppe wird heterolytisch gespalten. Dies resultiert in der Bildung eines Alkohols und der Übertragung eines Sauerstoffatoms auf das Eisenion des Häms. Es entsteht ein Ferryl-Oxo-Komplex. Anschließend wird das Sauerstoffatom des Ferryl-Oxo-Komplexes auf ein Akzeptormolekül übertragen, welches dadurch oxidiert wird. Das Häm-Eisen geht in den Ausgangszustand zurück und steht für weitere Sauerstoffübertragungen zur Verfügung. Da in diesem Fall ein Sauerstoffatom zwischen zwei Molekülen übertragen wird, wird dieser Sauerstofftransfer intermolekular genannt. Liegt als Hydroperoxid ein ungesättigtes Fettsäurehydroperoxid vor, kann das Sauerstoffatom auch innerhalb dieses Hydroperoxids auf die Doppelbindung übertragen werden und zur Bildung eines Epoxyalkohols einer Fettsäure führen. Dies wird als intramolekularer Transfer bezeichnet (Blée et al. 1993). Die Doppelbindungen, die durch die PXG epoxidiert werden, liegen in

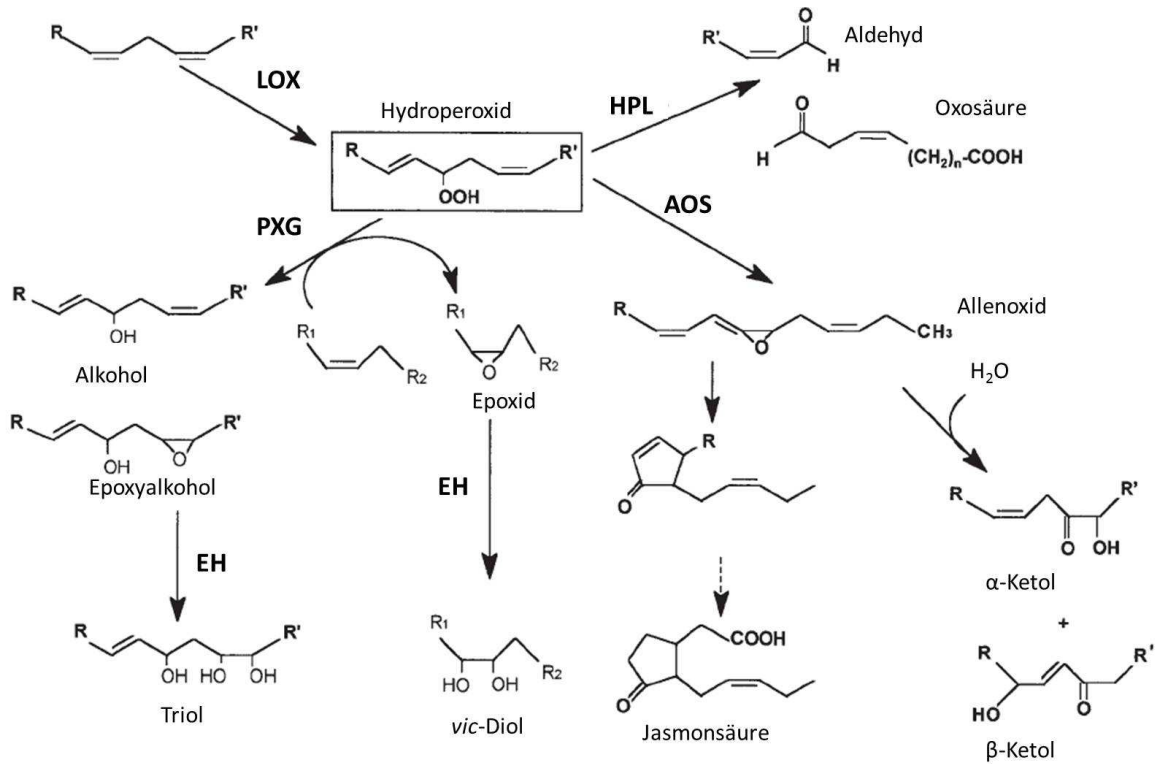
einer *cis*-Konfiguration vor und werden gegenüber solchen mit *trans*-Konfiguration bevorzugt. Dies gilt sowohl für einen intramolekularen als auch intermolekularen Sauerstofftransfer. Der Grund dafür liegt in einer sterischen Hinderung der Moleküle mit einer *trans*-Konfiguration, welche nicht ins aktive Zentrum gelangen (Blée und Schuber 1990a). PXG epoxidiert ungesättigte Fettsäuren nicht nur selektiv in Bezug auf die Konfiguration der Doppelbindungen, sondern auch stereoselektiv in Bezug auf die Konfiguration der resultierenden Epoxidgruppen. Sowohl PXG aus *Glycine max* (Sojabohne) als auch aus *Vicia faba* (Ackerbohne) epoxidieren Linolsäure zu zwei Monoepoxiden in *cis*-Konfiguration (Blée und Schuber 1990b; Hamberg und Hamberg 1990). Zusätzlich zu den genannten Stereoselektivitäten weist PXG bei mehreren Doppelbindungen eine Regioselektivität auf. Die Epoxidierung von Linolsäure durch eine PXG aus *G. max* resultiert zu 72 % in der *cis*-9,10-Epoxy-12-octadecensäure, die restlichen 28 % bestehen zum Großteil aus der *cis*-12,13-Epoxy-9-octadecensäure und mit nur geringem Anteil aus der Diepoxyoctadecensäure (Blée und Schuber 1990a). Mit welcher Aktivität ungesättigte Fettsäuren epoxidiert werden, hängt von der artspezifischen Isoform des Enzyms, der Kettenlänge und der Position der Doppelbindung ab. Eine PXG aus *G. max* und *Avena sativa* epoxidieren Ölsäure (C18:1) im Vergleich zu anderen Fettsäuren mit der höchsten Aktivität. Die PXG aus *G. max* epoxidiert C16:1 und C14:1 bei gleicher Position der Doppelbindung mit 56 bzw. 14 % der Aktivität mit Ölsäure. Dagegen beträgt die Aktivität der PXG aus *A. sativa* 89 bzw. 76 % im Vergleich zur Aktivität mit Ölsäure als Substrat. Eine Verschiebung der Doppelbindung von Position 9 auf 11 oder 6 innerhalb der Octadecensäure hat auf die Epoxidierungsaktivität der PXG aus *G. max* fast keine Auswirkung, die Aktivität der PXG aus *A. sativa* verringert sich stattdessen auf 72 bzw. 87 % (Blée und Schuber 1990a; Meesapyodsuk und Qiu 2011).

Die PXG wird auf Grund des gebundenen Hämmoleküls wie die Monooxygenasen und Peroxidasen zu den Hämproteinen gezählt (Blée und Schuber 1990a; Hanano et al. 2006). Im Vergleich zu diesen Enzymgruppen unterscheidet sich PXG jedoch im Mechanismus der katalysierten Oxidation. Während eine klassische Monooxygenase molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel und NAD(P)H als Cosubstrat benötigt, verwendet PXG als Oxidationsmittel ein Hydroperoxid und arbeitet komplett NAD(P)H unabhängig (Blée et al. 1985). Durch die stattfindende heterolytische, nicht-radikalische Spaltung der Hydroperoxidgruppe grenzt sich PXG auch von den Peroxidasen ab, bei welchen freie Peroxy- und/oder Alkylradikale an der enzymatischen Katalyse beteiligt sind (de Montellano 1992).

Neben unterschiedlichen Reaktionsmechanismen weist PXG keine signifikante Sequenzähnlichkeit mit anderen Cytochromen auf. Stattdessen liegen Gemeinsamkeiten in der

Sequenz der PXG mit Calcium bindenden Membranproteinen, den Calciosinen, vor (Hanano et al. 2006). Calciumionen werden in einem EF-Hand-Motiv dieser Proteine gebunden und sind für die Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins notwendig. Das EF-Hand-Motiv befindet sich am N-Terminus und ist etwa 20 Aminosäuren lang (Murphy 2001; Meesapyodsuk und Qiu 2011). Mit einer rekombinanten Peroxygenase aus *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass eine Abwesenheit von Calcium auch ein Verlust der enzymatischen Aktivität der PXG bedeutet (Hanano et al. 2006). Wie die Calciosine besitzt PXG eine Transmembrandomäne, die etwa 20 Aminosäuren lang ist und durch die das Protein in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) oder der Ölkörperchen eingebettet ist. Der N-Terminus befindet sich im Lumen des ER bzw. im Kern des Ölkörperchens, der C-Terminus im Cytosol (Murphy 2001; Meesapyodsuk und Qiu 2011; Hanano et al. 2006). Auf Grund dieser Lokalisation der PXG in der Zelle ist zu beobachten, dass die höchste Enzymaktivität in isolierten Mikrosomen und Ölkörperchen vorliegt (Ishimaru und Yamazaki 1977; Blée et al. 1985; Hanano et al. 2006).

PXG ist Teil des Oxylipinweges im pflanzlichen Stoffwechsel. Dieser Stoffwechselweg beinhaltet neben PXG eine Reihe anderer Enzyme, die an der Funktionalisierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren beteiligt sind. Die Produkte am Ende dieser Reaktionskaskaden spielen eine Rolle in der Pathogenabwehr oder Cutinbiosynthese (Blée 1998a) (Abbildung 1.3). Den Anfang des Oxylipinweges macht die Lipoxygenase, indem sie die Dioxygenierung von Linol- oder Linolensäure zu konjugierten Hydroperoxydiensäuren katalysiert. Diese relativ reaktiven Verbindungen sind die Ausgangsmoleküle verschiedener enzymatischer und chemischer Reaktionen (Mosblech et al. 2009). Eine Hydroperoxid-Lyase spaltet die Hydroperoxydiensäure in ein Aldehyd und eine  $\omega$ -Oxo-Fettsäure. Zu den gebildeten Aldehyden zählen Hexenale und Hexanale, die zum einen natürliche Feinde von Pflanzenschädlingen anlocken, zum anderen aber auch bakterizid wirken (Heldt und Heldt 2003). Die  $\omega$ -Oxo-Fettsäure ist eine Vorstufe des Wundhormons Traumatin, welches in angrenzenden Geweben Zellteilung und letztendlich einen Wundverschluss auslöst (Zimmermann und Coudron 1979; Heldt und Heldt 2003). Die Hydroperoxydiensäure kann jedoch auch durch eine Allenoxidsynthese in ein chemisch instabiles Allenoxid umgewandelt werden. Das Allenoxid reagiert entweder spontan zu einem Ketol weiter oder wird durch eine Allenoxidcyclase und  $\beta$ -Oxidationen in das Phytohormon Jasmonsäure umgesetzt. Bei Schädlingsbefall induziert Jasmonsäure verschiedene Abwehrgene (Heldt und Heldt 2003).



**Abbildung 1.3 Der Phytooxylipin-Weg.** Ausgehend von einer mehrfach ungesättigten Fettsäure werden durch eine Lipoxygenase (LOX) konjugierte Hydroperoxydiensäuren gebildet. Diese stehen u. a. einer Peroxygenase (PXG) zur Verfügung, um sie in Alkohole, Epoxyalkohole oder Epoxide umzuwandeln. Im Anschluss hydrolysiert eine Epoxidhydratase (EH) die Epoxidgruppe zu benachbarten Hydroxygruppen. Die entstandenen Phytooxylipine sind Teil der Pathogenabwehr und der Cutinbiosynthese. Weitere Enzyme des Phytooxylipin-Weges sind die Hydroperoxidlyase (HPL) und Allenoxidsynthase (AOS) (Blée 1998a).

Neben den genannten Enzymen ist PXG ein weiteres Enzym zur Verstoffwechslung einer Hydroperoxydiensäure. Sie epoxidiert Doppelbindungen sowohl ungesättigter Fettsäuren als auch der Hydroperoxydiensäuren (Blée et al. 1993). Im Anschluss können Epoxidhydratasen (EH) die Epoxidgruppen unter Bildung von Diolen hydrolysieren (Blée 1998a). PXG und EH führen durch unterschiedliche Ausgangssubstrate und Regulationen zu einer Mischung verschiedener Fettsäureepoxide, Hydroxyfettsäuren, Epoxyalkohole, vic-Diole und Triole. Diese Oxylipine sind Monomere für die Biosynthese von Cutinpolymeren, welche neben Wachsen einen wichtigen Bestandteil der pflanzlichen Cuticula ausmachen (Blée und Schubert 1993; Taiz und Zeiger 2006). Die Beteiligung von PXG an der Synthese der Cutinmonomere konnte durch Inhibierung der PXG *in planta* gezeigt werden. Werden Maispflanzen mit Terbufos, einem Organophosphorothioat und Inhibitor der PXG, behandelt, verändert sich die Cuticula in dem Sinne, dass sie nicht nur einen niedrigeren Gehalt an Fettsäureepoxiden besitzt, sondern auch grundsätzlich dünner ist. Zusätzlich sind diese Pflanzen anfälliger

gegenüber Pestizidbehandlung und Befall durch den Pilz *Cochliobolus heterostrophus* (Lequeu et al. 2003). Oxylipine werden durch PXG und EH auch im Sinne der Abwehr von abiotischen und biotischen Stress synthetisiert. Versuche zu einem Caleosin mit PXG-Eigenschaften aus *Arabidopsis thaliana* zeigen, dass sowohl das kodierende Gen als auch das Protein während verschiedener abiotischer Stressbehandlungen wie Kälte und Salz exprimiert bzw. angereichert werden. Neben abiotischem Stress wirkt sich auch die Infektion mit dem pathogenen Pilz *Leptosphaeria maculans* in einer Steigerung der Proteinsynthese jenes Caleosins aus. Außerdem bewirken die beiden Signalsubstanzen Jasmonsäure und Salicylsäure eine Induktion des Caleosins und man vermutet, dass sie das Peroxygenase kodierende Gen mittels einer Signalkaskade stimulieren (Partridge und Murphy 2009).

## 2 Zielsetzung

Nachwachsende Rohstoffe wie pflanzliche Fette und Kohlenhydrate sind eine alternative Kohlenstoffquelle zur Synthese organischer Produkte; sie können die Lücke schließen, die durch den Wegfall der fossilen Rohstoffe entstehen wird. Gerade die biotechnologische Verarbeitung von Naturstoffen durch Mikroorganismen und Enzyme hat sich auf Grund ihrer Umweltverträglichkeit und ihrer gezielten enantioselektiven Synthese in den letzten Jahren mehr und mehr etabliert.

Ziel dieser Arbeit ist die enzymatische Funktionalisierung von natürlichen Lipiden, um dadurch neue Verbindungen herzustellen, die entweder direkt Verwendung finden oder als Plattformchemikalien dienen. Der Weg dieser Funktionalisierung beruht auf einer Oxidation der Lipide durch eine Peroxygenase (PXG) aus *Solanum lycopersicum* (Tomate). Das rekombinante Enzym wird heterolog in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert, isoliert und in verschiedenen Enzymtests eingesetzt. Diese Versuche dienen der biochemischen Charakterisierung des Proteins und stellen die Grundlage für ein Substratscreening dar. Als Substrate für die PXG werden verschiedene ungesättigte Fettsäuren eingesetzt, die Produkte identifiziert und die Umsatzraten ermittelt. Die gebildeten Fettsäureepoxide können in der Industrie an sich verwendet werden oder als Momomere für spätere Fettsäurepolymere dienen. Neben einem Screening nach Fettsäuren als potentielle Substrate werden auch Terpene herangezogen und einer Oxidation durch PXG unterzogen. Terpene sind oft Abfallprodukte der Pflanzen verarbeitenden Industrie und ihre Anwendung in der Technik steht nicht in Konkurrenz mit der Nahrungsmittelproduktion. Zusätzlich zu den häufig vorkommenden Terpenen wie Limonen, Terpinen oder Pinen werden auch seltenere Terpene als Substrate für eine Oxidation durch PXG eingesetzt. Die Struktur der Oxidationsprodukte wird weitestgehend aufgeklärt und die Umsetzungen quantifiziert.

Da PXG als Oxidationsmittel ein Hydroperoxid verwendet, besteht die Möglichkeit, das Oxidationsvermögen verschiedener technischer Hydroperoxide miteinander zu vergleichen.

PXG ist ein Protein, welches in der Pflanze die Bereitstellung von Cutinmonomeren und Oxylipinen ausübt. Zusätzlich zu den biochemischen Charakterisierungen des Enzyms soll auf der RNA-Ebene ein Expressionsmuster der PXG während der Entwicklung von vegetativen Organen von Tomatenpflanzen erstellt werden. Da die Expression und Synthese der PXG stressinduziert ist, soll außerdem eine Expressionsanalyse der PXG in Fäulungsprozessen während der Fruchtreife weitere Erkenntnisse über ihre Beteiligung bei abiotischem Stress erbringen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalienliste

Adenin	Roth, Karlsruhe
Agar	Molekula, München
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ameisensäure, $\geq 98\%$	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Arginin	Roth, Karlsruhe
Asparaginsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
(-)- $\alpha$ -Bisabolol, $> 95\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
tertiäres Butylhydroperoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3-Caren	Roth, Karlsruhe
(S)-(+)-Carvon	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\beta$ -Caryophyllen	Roth, Karlsruhe
Cetyltrimethylammoniumbromid	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroform, deuteriert	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform, deuteriert, $+ 0,03\%$ (v/v)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylsilan	
<i>m</i> -Chlorperbenzoesäure, $> 77\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie <sup>®</sup> Brilliantblau G250	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cumarin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cumolhydroperoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1,4-Cyclohexadien	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1-Cyclohexen-3-carboxyaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3-Cyclohexen-1-carboxyaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cystein	Roth, Karlsruhe
Desoxyadenosintriphosphat	Fermentas, St. Leon-Rot
Desoxycytidintriphosphat	Fermentas, St. Leon-Rot
Desoxyguanosintriphosphat	Fermentas, St. Leon-Rot



---

Desoxythymidintriphosphat	Fermentas, St. Leon-Rot
Dichlormethan	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat	Roth, Karlsruhe
Diethylether, $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
DNA-Größenstandard, GeneRuler <sup>TM</sup> Ladder Mix, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>cis</i> -11-Eicosensäure, $> 99$ %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>cis</i> -9,10-Epoxy-octadecensäure	BIOZOL, Eching
<i>trans</i> -9,10-Epoxy-octadecensäure	BIOZOL, Eching
Erucasäuremethylester, $> 90$ %	CRODA, Nettetal
Essigsäure, 100 %	Roth, Karlsruhe
Essigsäureethylester, HPLC-Qualität	Roth, Karlsruhe
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Furfural	Roth, Karlsruhe
Galaktose	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Geraniol	Roth, Karlsruhe
$\alpha$ -D-Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin, $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Helium 5.0	Westfalen AG, Münster
n-Hexan, GC-Qualität, $\geq 95$ %	Roth, Karlsruhe
Histidin	Roth, Karlsruhe
Iod	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\alpha$ -Ionon	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isoeugenol, Racemat	Roth, Karlsruhe
Isoleucin	Roth, Karlsruhe
<i>cis</i> -Jasmon	Roth, Karlsruhe

---

Jasmonsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Jasmonsäuremethylester	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid, $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe
Kieselgel 60 (0,04 – 0,063 mm)	Roth, Karlsruhe
Konjugierte (10 <i>trans</i> , 12 <i>cis</i> )	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Linolsäure, $> 96$ %	
Leucin	Merck, Darmstadt
Ligasepuffer (10 x)	Fermentas, St. Leon-Rot
(R)-(+)-Limonen $> 97\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
(R)-(+)-Limonen-1,2-epoxid, Racemat, $\geq 97$ %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
(R)-(+)-Limonen- <i>trans</i> -1,2-epoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
(S)-(-)-Limonen, $> 97\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
(S)-(-)-Limonen-1,2-epoxid, Racemat, $97$ %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Linalool $> 95\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Linolsäure	Roth, Karlsruhe
$\alpha$ -Linolensäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol, HPLC Reagent	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Methanol, LC-MS Reagent	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Methionin	Roth, Karlsruhe
1-Methyl-1,4-cyclohexadien	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumhydroxid	St. Florian Apotheke, Freising
Natriumsulfat	Roth, Karlsruhe
Nerol $> 97\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Oleylalkohol	CRODA, Nettetal
Ölsäure, technisch, 75 %	Emery oleochemicals, Düsseldorf
Ölsäuremethylester	Cognis, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe
(RS)- $\alpha$ -Phellandren, Racemat, > 95%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenylalanin	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
$\alpha$ -Pinen, > 98%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglykol 4000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphorsäure, 85 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglykol	Roth, Karlsruhe
Polysorbat 20 (Tween® 20)	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon	Roth, Karlsruhe
Prolin	Roth, Karlsruhe
1-Propanol, $\geq$ 95 %	Roth, Karlsruhe
2-Propanol, $\geq$ 95 %	Roth, Karlsruhe
Proteinmarker Broad Range	New England Biolabs, Beverly, USA
Proteinmarker Molecular Weight Marker SDS7	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rinderserumalbumin purified BSA, 100 mg/ml	New England Biolabs, Beverly, USA
Salzsäure, 37 %	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure, 95-98 %	Merck, Darmstadt
Serin	Roth, Karlsruhe
<i>cis</i> -Stilben, 96 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>cis</i> -Stilbenoxid, 97 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetacyclacis	Erhalten von Professor Karl Stich, Technische Universität Wien
$\alpha$ -Terpinen, > 85%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
$\gamma$ -Terpinen, > 97%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Terpinolen	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Threonin	Roth, Karlsruhe
$\alpha$ -Thujen	Roth, Karlsruhe

Trimethylsilyldiazomethan, 2 mol/l in	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris, $\geq 99,9\%$	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tryptophan	Roth, Karlsruhe
Valin	Roth, Karlsruhe
Vanillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasser, LC-MS Reagent	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Wasserstoffperoxid, 30 %	Roth, Karlsruhe
Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Weitere Chemikalien entsprachen der üblichen Laborausstattung.

### 3.1.2 Enzyme

DNaseI (1 U/ $\mu$ l)	Fermentas, St. Leon-Rot
Fast SYBR Green Mastermix	Applied biosystems, Carlsbad, USA
M-MLV Reverse <i>Transcriptase</i> (200 U/ $\mu$ l)	Promega, Madison, USA
Phusion® DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonuklease BamH I (20 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs, Beverly, USA
Restriktionsendonuklease Hind III (20 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs, Beverly, USA
Restriktionsendonuklease Xho I (20 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs, Beverly, USA
SuperScript® III Reverse <i>Transcriptase</i> (200 U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Carlsbad, USA
SuperScript® III T4-DNA-Ligase (200 U/ $\mu$ l)	Invitrogen, Carlsbad, USA
TaqPolymerase (5 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs, Beverly, USA

Den Enzymen lagen die entsprechenden Puffer bei.

### 3.1.3 Kommerzielle Kits

QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
<i>S. c.</i> EasyComp™ <i>Transformation Kit</i> ,	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sulfit-Kit „Gesamt-SO <sub>2</sub> “	R-Biopharm AG, Darmstadt

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Madison, USA
---	-----------------------

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Alu-CrimpCaps, 11 mm, mit Septum	Wicom, Heppenheim
Glaskügelchen, 0,25-0,50 mm	Roth, Karlsruhe
Küvetten, PMMA, 2,5 ml	Brand, Wertheim
Küvetten, Rotilabo, 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
Mikroeinsätze aus Borosilikatglas mit Kunststofffeder, 0,1 ml	Roth, Karlsruhe
POLYGRAM® SIL G / UV <sub>254</sub> ,	Roth, Karlsruhe
Polyesterfolien mit Kieselgel 60	
Probenflaschen für GC, Braunglas, 1,5 ml	Brennstein Laborbedarf-Glasbläserei, Markt Schwaben
Solid Phase Micro-Extraction	SUPELCO, Belleford, USA
SPME-Phase, 65 µm Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene, fused silica 24 Ga, 3pk	SUPELCO Analytical, Bellefonte, USA
12 %iges Tris-Glycin-Gel mit 1 mm Schichtdicke	anamed Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau

Weitere Verbrauchsmaterialien entsprechen der üblichen Laborausstattung.

### 3.1.5 Geräte und Ausstattung

Analysenmühle A11 basic	IKA, Staufen
Autoklav	ZIBUS technology, Bad Grund
Autoklav Sytec V95	Sytec GmbH, Wettemberg
Brutschrank ThermoForma	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
DNA-Gelapparaturen	Roth, Karlsruhe
Evaporationsgerät vapoTherm	Labortechnik Barkey, Bielefeld
Feinwaage TP-214	DENVER INSTRUMENT GmbH, Göttingen
Flüssigchromatographie:	
Analytische HPLC Maxi-Star inklusive UV-Detektor mit variabler Wellenlänge	Knauer, Berlin

Chromatographiesäule:	
GROM-Sil100, ODS 1 PE, 250 x 4 mm	Phenomenex, Newport Beach, USA
Flüssigchromatograph Agilent 1100 series, gekoppelt mit	
Massenspektrometer Esquire 3000 plus	Bruker Daltonics, Billerica, USA
Chromatographiesäule:	
phenomenex® Luna 3u C18(2) 100A, 150 x 2 mm	Phenomenex, Newport Beach, USA
Gaschromatographie:	
Gaschromatograph Trace GC, gekoppelt mit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Massenspektrometer Trace DSQ	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Kapillarsäulen:	
RESTEK Rtx®-5MS, 15 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan	Restek, Bad Homburg
VF-5MS, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Gaschromatograph Hewlett Packard HP 5890 Series II, gekoppelt mit	
Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95S	GMI, Ramsey, USA
Kapillarsäule:	
DB-5, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Gaschromatograph 450-GC, gekoppelt mit	
Flammenionisationsdetektor	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Kapillarsäule:	
Octakis-(2,3-di-O-butyryl-6-O-tert.-butyldimethylsilyl)-γ-cyclodextrin gelöst	Hergestellt an der Universität Frankfurt/Main

in SE 52 (30 m x 0,25 mm)	
Gaschromatograph 6890 N, Network GC Systems, gekoppelt mit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Massenspektrometer 5975 inert XC Mass Selective Detector	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Kapillarsäulen:	
ZB-WAX, 60 m, Filmdicke 0,25 µm, PEG	Phenomenex, Newport Beach, USA
VF-5MS, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Gefriertruhe -80 °C SANYO ULTRA	EWALD Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf
Geldokumentationsanlage G:BOX	SYNGENE, Cambridge, Großbritannien
Grobwaage ScoutTM Pro	OHAUS®, Parsippany, USA
Heizpilz, 120 W	Winkler, Heidelberg
Horizontalschüttler POLYMAX 1040	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Kernspinresonanz-Spektrometer Avance-III-500	Bruker, Rheinstetten
Kühlanlage F33 (für Destillationen)	JULABO, Allentown, USA
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Leistungssteller Voltrom	Messner emtronic, Dettenhausen
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Minizentrifuge Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
NanoDrop® ND_1000 Spectrophotometer	peqLab, Erlangen
PCR-Maschine Labcycler basic	Biolabproducts GmbH
pH-Meter CG820	Schott-Geräte, Hofheim
Photometer Nicolet Evolution 100	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Protein-Gelapparatur	Roth, Karlsruhe
qPCR-Maschine StepOnePlus	Applied Biosystems, USA
Reinstwassersystem PURELAB Classic	ELGA LabWater, Celle

Schüttelinkubator 3033	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Spannungsgeber E132	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Spannungsgeber E835	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Sterilbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Thermomixer comfort, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge 54151R	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Mikrozentrifuge 1-14	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Vortex VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad HC	Julabo, Seelbach

Weitere Geräte entsprachen der üblichen Laborausstattung.

### 3.1.6 Software

ChemSketch 12.01	ACD Labs, Toronto, Kanada
DSQ-Tune	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Geneious Pro 5.3.4	Biomatters, Neuseeland
MestReNova Version 8.0.0-10524	MESTRELAB Research, Santiago de Compostela, Spanien
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MSD Security ChemStation	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
NIST Mass Spectral Search Program 2.0	FairCom Corporation, Columbia, USA
R (Version 2.13.0)	The R Foundation for Statistical Computing
6300 Series Ion Trap LC/MS Data Analysis 4.0	Bruker Daltonics GmbH, Billerica, USA
StepOne™ Plus V2.1	Applied Biosystems, USA
Vector NTI Ver. 9.0	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Xcalibur, Version 1.4 SR1	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA



### 3.1.7 Biologisches Material

#### 3.1.7.1 Mikroorganismen

**Tabelle 3.1** Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Relevante Eigenschaft	Referenz
<i>Escherichia coli</i> Top10	F- <i>mcrA</i> D( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> <i>araD139</i> , Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen (2008)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> INVSc1	MATa <i>his3</i> Δ <i>1 leu2 trp1</i> -289 <i>ura3-52</i> /MATα <i>his3</i> Δ <i>1 leu2 trp1</i> - 289 <i>ura3-52</i>	Invitrogen (2008)

#### 3.1.7.2 Pflanzen

*Solanum lycopersicum*, Ökotyp *Elba* (Buschtomate) wurde zur RNA-Extraktion und Analyse der Genexpression kultiviert. Die Gattung *Solanum* gehört zur Familie der Solanaceae, Ordnung Solanales, Klasse *Dicotyledoneae*, Unterabteilung *Angiospermae*, Abteilung *Spermatophyta*.

## 3.2 Anzuchtmethoden

### 3.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*

#### 3.2.1.1 Kompetente Zellen

Für die Anzucht von chemisch kompetenten Zellen wurden 20 ml LB-Medium (1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt) mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Platte (1,5 % (w/v) Agar, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt) angeimpft und bei 37 °C und 150 U/min über Nacht geschüttelt. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C und 150 U/min bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden sie bei 4 °C und 4000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Bakterienpellet mit 5 ml Triturationspuffer (100 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 90 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 40 mmol/l Natriumacetat, pH 5,5) resuspendiert und mit Triturationspuffer auf 40 ml aufgefüllt. Nach 15 Minuten auf Eis wurde bei 4 °C und 4.000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet erneut mit 40 ml Triturationspuffer gewaschen. Das gewaschene Zellpellet wurde in 10 ml Triturationspuffer resuspendiert und mit 752 µl Dimethylsulfoxid zu einer Endkonzentration

von 7 % (v/v) versetzt. Die kompetenten Zellen wurden zu 100 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.1.2 Anzucht für Miniprep und Stammkultur

Für die Anzucht von Flüssigkulturen wurden pro Kultur 5 ml LB-Medium unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin mit einer Bakterienkolonie von einer LB-Ampicillin-Platte (+100 µg/ml Ampicillin) angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 150 U/min über Nacht. Die OD<sub>600</sub> dieser Kulturen lag nach der Inkubation zwischen 1,5 und 2,0. Die Vorkultur wurde zur Plasmidisolierung (Kapitel 3.3.11) oder zur Herstellung einer Stammkultur verwendet. Dafür wurden 700 µl Vorkultur mit 700 µl steriler Glycerinstocklösung (65 % (v/v) Glycerin, 1,2 % (w/v) MgSO<sub>4</sub>, 0,3 % (w/v) Tris-HCl pH 8) vermischt. Die Kultur wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 3.2.2 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

### 3.2.2.1 Kompetente Zellen

Die Anzucht von chemisch kompetenten Hefezellen erfolgte laut Anleitung des *S. c.* EasyComp™ *Transformation* Kit, Invitrogen (Kapitel 3.1.3). Die chemisch kompetenten Hefezellen wurden zu 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.2.2 Anzucht zur Proteinexpression

Für die Anzucht von Hefezellen zur Expression rekombinanter Proteine wurden 50 ml SC-U-Medium (0,67 % (w/v) *Yeast Nitrogen Base*, je 0,01 % (w/v) Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Threonin und Tryptophan und je 0,005 % (w/v) Asparaginsäure, Histidin, Isoleucin, Methionin, Valin, Phenylalanin, Prolin, Serin und Tyrosin; + 2 % (w/v) α-D-Glukose) mit einer Hefekolonie von SC-U-Platte (SC-U + 2 % Agar) angeimpft. Die Zellen wurden bei 30 °C und 150 U/min über Nacht inkubiert. Nach Messung der OD<sub>600</sub> wurde die Kultur bei 1500 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Das Hefepellet wurde mit SC-U-Medium (+ 2 % (w/v) Galaktose anstatt Glukose) resuspendiert, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,4 verdünnt und bei 30 °C und 150 U/min für 24 Stunden inkubiert. Die Kultur wurde zu 50 ml aliquotiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 1500 x g und 4 °C für 5 Minuten. Die Hefepellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Nach Bedarf wurden aus den Zellen Proteine extrahiert (Kapitel 3.4.1 und 3.4.2).

### 3.2.3 Anzucht von *Solanum lycopersicum*

Für die Anzucht von *S. lycopersicum* wurden die Samen zum Quellen für 4 Stunden in warmes Wasser gelegt. Anschließend wurden sie etwa 1 cm tief in angefeuchteter Anzucht-Erde ausgesät. Die Pflanzen wuchsen im Pflanzraum bei einer Beleuchtungsstärke von 10,85 kLux und einer Beleuchtungsdauer von 16 Stunden pro Tag. Sie wurden nach 3 Wochen entweder zur RNA-Isolierung verwendet oder in ein Gewächshaus bei natürlichem Tageslicht gestellt. Dort wuchsen sie bis zur Fruchtreife. Wässerung und Düngung erfolgten nach Bedarf.

Zum Klonieren wurden 3 Wochen alte Tomatenpflanzen geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert (Kapitel 3.3.1).

Für Experimente zur Bestimmung der zeitlichen Genexpression in vegetativen Pflanzenorganen wurden Sprossachse und Blatt 4, 8 und 12 Wochen nach Aussaat geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert (Kapitel 3.3.1). Sprossachsen und Blätter stammten aus mittelstehenden Bereichen der Pflanze und waren weder sehr jung noch sehr alt.

Der Einfluss der Blütenendfäule auf die Genexpression der Peroxygenase wurde in grünen befallenen und nicht befallenen Früchten untersucht. Die Früchte wurden mit einem Durchschnittsgewicht von je 50 g geerntet. Bei jeder Frucht wurden die dem Stilansatz zugewandten Zweidrittel und das Drittel, welches der Fruchunterseite zugewandt war, getrennt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert (Kapitel 3.3.1).

## 3.3 Molekularbiologische Methoden

### 3.3.1 RNA-Isolierung aus *S. lycopersicum*

Bei Versuchen mit RNA wurde ausschließlich mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser (0,1 % (v/v) DEPC) gearbeitet.

3 g vegetatives Pflanzenmaterial oder 6 g Frucht (Kapitel 3.2.3) wurden mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser bzw. einer elektrischen Analysenmühle zu feinem Pulver vermahlen und mit 20 ml 65 °C heißem RNA-Extraktionspuffer (25 mmol/l EDTA, 2 mol/l NaCl, 100 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0, 4 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 3 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid, 3 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon) gründlich gemischt. Die Suspension wurde bei 65 °C für 10 Minuten inkubiert und dabei alle 3 Minuten per Hand leicht geschwenkt. Etwa 20 ml einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (24:1)

wurden dazugegeben und 10 Minuten invertiert. Nach Zentrifugieren bei 12000 x g und 10 °C für 10 Minuten wurde der Überstand in ein neues Falcon überführt und erneut mit 20 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, 10 Minuten kontinuierlich gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein neues Falcon überführt, mit 1/3 Volumen Lithiumchloridlösung (8 mol/l) gut gemischt und bei 4 °C über Nacht gelagert. Anschließend wurde bei 12000 x g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl SDS-Lösung (0,5 % (w/v)) gelöst, 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurden zugefügt und 30 Sekunden invertiert. Nach Zentrifugieren bei 16100 x g und 4 °C für 10 Minuten wurde der Überstand mit dem doppelten Volumen an -20 °C kaltem Ethanol gemischt und 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 16100 x g und 4 °C für 30 Minuten wurde das entstandene RNA-Pellet mit 500 µl -20 °C kaltem Ethanol (70 % (v/v)) gewaschen und bei 16100 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde mit -20 °C kaltem Ethanol (100 %) wiederholt. Das gereinigte RNA-Pellet wurde in 100 µl Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert. Da die RNA noch mit DNA verunreinigt sein kann, wurde ein DNA-Verdau durch DNase vollzogen (Kapitel 3.3.4)

### **3.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch am Nanodrop® ermittelt. Als Blindwert diente Wasser.

### **3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA**

Die Trennung von RNA erfolgte in einem Agarosegel (1 % (w/v) Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer (40 mmol/l Tris-HCl pH 7,5, 20 mmol/l Essigsäure, 1 mmol/l EDTA)). 1 µl RNA-Lösung (bis zu 10 µg) wurde mit 8 µl TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5, 1 mmol/l EDTA) und 1 µl Ladepuffer (0,21 % (w/v) Orange G, 0,1 mol/l EDTA, 50 % (w/v) Glycerin, pH 8,0) versetzt und in eine Tasche des Agarosegels aufgetragen. Die Elektrophorese fand in TAE-Puffer bei 120 V für etwa 45 Minuten statt. Das Gel wurde unter UV-Licht der Geldokumentationsanlage betrachtet und fotografiert.

### **3.3.4 DNA-Verdau durch DNase**

Zum Entfernen von kontaminierter DNA wurde die RNA-Lösung (Kapitel 3.3.1) mit einer DNase behandelt. 24 µl RNA-Lösung (die totale RNA-Menge unterschied sich in

Abhängigkeit der RNA-Konzentration) wurden mit 3 µl DNaseI (1 U/µl) und 3 µl DNaseI-Puffer gemischt und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Wasser und 150 µl einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) angehalten. Nach 10 Sekunden Vortexen und Zentrifugieren bei 16100 x g und 4 °C für 5 Minuten wurde die wässrige Phase abgetrennt und erneut mit 150 µl einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol geschüttelt, zentrifugiert und die wässrige Phase abgetrennt. Die bei beiden Extraktionsschritten erhaltenen organischen Phasen wurden vereint und mit 100 µl Wasser geschüttelt. Nach Zentrifugieren bei 16100 x g und 4 °C für 5 Minuten wurde die wässrige Phase abgetrennt und mit der im Arbeitsschritt zuvor erhaltenen wässrigen Phase vereint. 150 µl einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) wurden zugefügt, extrahiert, die wässrige Phase (etwa 200 µl) abgetrennt und mit 600 µl Ethanol und 20 µl Natriumacetatpuffer (3 mol/l, pH 5,2) gemischt. Der Ansatz wurde über Nacht bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde bei 16100 x g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit je 500 µl Ethanol (70 % (v/v)) und einmal mit 500 µl Ethanol (100 % (v/v)) vorsichtig gewaschen; zwischen den Waschschritten wurde bei 16100 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Zuletzt wurde das RNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 20 µl Wasser gelöst. Die von DNA gereinigte RNA wurde entweder für eine reverse Transkription (Kapitel 3.3.5) eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

### 3.3.5 Reverse Transkription

Für eine Quantifizierung der Expression des Peroxygenase kodierenden Gens aus *S. lycopersicum* (*SIPXG*) wurden von jeder Pflanzenmaterialprobe 0,3 µg gereinigte RNA eingesetzt (Kapitel 3.3.4). Die RNA wurde mit Oligo-Desoxythymidin (4,2 µmol/l) gemischt und mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde bei 70 °C für 5 Minuten geschüttelt und auf Eis abgekühlt. Dieser 12 µl-Ansatz wurde mit 2 µl dNTPs (2,5 mmol/l), 1 µl RNaseOut, 1 µl reverse M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/µl) und M-MLV RT Puffer auf 20 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C und darauf für 5 Minuten bei 95 °C. Die cDNA wurde entweder für eine quantitative Polymerasekettenreaktion eingesetzt (Kapitel 3.3.6) oder bei -20 °C gelagert.

Für die Amplifikation und darauf folgende Klonierung der *SIPXG* in einen Expressionsvektor wurden 10 µg RNA eingesetzt, welche keinem DNase-Verdau unterzogen wurde (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2). Die RNA wurde mit Oligo-Desoxythymidin (4,2 µmol/l) gemischt und mit Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Die Mischung wurde 5 Minuten bei 70 °C geschüttelt und auf Eis abgekühlt. Dieser 12 µl-Ansatz wurde mit 1 µl Dithiothreitol (0,1 mmol/l), 2 µl

dNTPs (2,5 mmol/l), 1 µl SuperScript® III Reverse Transcriptase (200 U/µl) und First-Strand Puffer auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 50 °C und darauf für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die cDNA wurde entweder für eine Polymerasekettenreaktion eingesetzt (Kapitel 3.3.7) oder bei -20 °C gelagert.

### 3.3.6 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Um die Expression der *SIPXG* in verschiedenen Organen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Tomatenpflanzen zu ermitteln, wurde eine quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) durchgeführt. Für die Vervielfältigung eines 568 bp großen Fragments der *SIPXG* wurden das Vorwärts-Oligonukleotid *SIPXG\_f* und das Rückwärts-Oligonukleotid *SIPXG\_mr* verwendet (Anhang Kapitel 7.1). Um geringe Schwankungen in den cDNA-Mengen erfassen und berücksichtigen zu können, wurde als interne Kontrolle die Spacer-Region zwischen den 16S- und 23S-rRNA-Abschnitten quantifiziert. Die dazugehörigen Oligonukleotide waren *IS\_f* und *IS\_r* (Anhang Kapitel 7.1).

Für die qPCR wurde cDNA verwendet, die durch M-MLV Reverse Transcriptase aus der RNA der einzelnen Pflanzenproben hergestellt wurde (Kapitel 3.3.5). 2 µl cDNA (unverdünnt für die *SIPXG* oder 1:8000 verdünnt für den internen Standard), je 0,6 µl des jeweiligen Oligonukleotids (10 µmol/l), 6,8 µl Wasser und 10 µl SYBR Green Mastermix wurden in einem 20 µl Ansatz gemischt. Um Schwankungen während des Pipettierens zu minimieren, wurde für jede cDNA eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Kontrollen enthielten Wasser anstatt cDNA. Die Ansätze wurden in Vertiefungen von 96-Well-Platten pipettiert. Für die beiden Oligonukleotidpaare wurde das Temperaturprogramm der Tabelle 3.2 verwendet, um die cDNA-Menge zu quantifizieren und eine Schmelzkurve zu erstellen.

**Tabelle 3.2 qPCR-Programm zur Expressionanalyse der *SIPXG*.**

Temperatur in °C	Zeit in Sekunden	
95	600	
95	15	} 40 Zyklen
60	15	
72	15	
95	15	
60	60	
95	15	

Zur Analyse der relativen Genexpression mittels qPCR wurde die Methode  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  verwendet. Hierbei wird die Änderung der Expression des Zielgenes relativ zu einer Referenzgruppe berechnet (Livak und Schmittgen 2001). Die Werte der Crossing-Points ( $C_t$ -Werte) für *SIPXG* und interne Kontrolle der einzelnen Proben wurden durch die Software StepOne™ Plus V2.1 bestimmt. Von jedem  $C_t$ -Wert der *SIPXG* wurde der entsprechende  $C_t$ -Wert der internen Kontrolle subtrahiert; daraus resultierten die  $\Delta C_t$ -Werte:

$$\Delta C_t = C_t(\text{SIPXG}) - C_t(\text{interne Kontrolle})$$

Zum Vergleich wurden die  $\Delta C_t$ -Werte einer Probe ( $\Delta C_t$  (Zielgen)) in Relation zu einem beliebigen, jedoch während der Berechnung konstanten Referenzgen ( $\Delta C_t$  (Referenzgen)) gestellt. Zunächst wurden die  $\Delta\Delta C_t$ -Werte berechnet:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Zielgen}) - \Delta C_t(\text{Referenzgen})$$

Im Anschluss wurde die relative Expression (RQ) des Zielgens berechnet:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Die Darstellung der Expressionen als Boxplot und die statistische Auswertungen mit dem Wilcoxon–Mann–Whitney U-Test fanden mit dem Programm „R“ statt.

### 3.3.7 Polymerasekettenreaktion

Für eine Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Das cDNA-Fragment, welches die *SIPXG* kodiert, wurde in 2 Teilen vervielfältigt. Der vordere DNA-Abschnitt (5'-Fragment, 568 Basenpaare) wurde getrennt vom hinteren (3'-Fragment, 341 Basenpaare) amplifiziert. Für das 5'-Fragment wurde als Vorwärts-Oligonukleotid *SIPXG\_f* und als Rückwärts-Oligonukleotid *SIPXG\_mr* verwendet. Für das 3'-Fragment wurde als Vorwärts-Oligonukleotid *SIPXG\_mf* und als Rückwärts-Oligonukleotid *SIPXG\_r* verwendet (Anhang Kapitel 7.1). Als Vorlage wurde cDNA eingesetzt (Kapitel 3.3.5).

Für die PCR wurden 2  $\mu\text{l}$  cDNA-Lösung (Kapitel 3.3.5) mit je 1  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Oligonukleotids (10  $\mu\text{mol/l}$ ), 1  $\mu\text{l}$  dNTPs (2,5 mmol/l), 0,5  $\mu\text{l}$  Phusion® DNA-Polymerase

(2 U/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l *First Strand Buffer* Polymerasepuffer und 10,5  $\mu$ l Wasser gemischt. Pro zu amplifizierendes Fragment wurde das Temperaturprogramm von Tabelle 3.3 durchgeführt.

**Tabelle 3.3 PCR-Programm zur Vervielfältigung des 5'- und 3'-Fragments der *SIPXG*.**

Temperatur in °C	Zeit in Sekunden	
94	300	} 35 Zyklen
94	45	
55	45	
72	120	
72	600	
8	$\infty$	

Im Anschluss wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Kapitel 3.3.9).

### 3.3.8 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Zum Testen von Bakterien- und Hefekolonien auf eine erfolgreiche Transformation wurden diese mit einer Kolonie-Polymerasekettenreaktion (Kolonie-PCR) auf das gewünschte DNA-Fragment hin untersucht. Als Vorwärts-Oligonukleotid wurde *SIPXG\_f* und als Rückwärts-Oligonukleotid *SIPXG\_mr* verwendet (Kapitel 7.1), um das 5'-Fragment der *SIPXG* (568 Basenpaare) zu vervielfältigen.

Mit sterilen Spitzen wurden Zellen aus einer Kolonie von der Agar-Platte aufgenommen. Die Zellen wurden in einen Reaktionsansatz bestehend aus je 1  $\mu$ l des jeweiligen Oligonukleotidpaares (10  $\mu$ mol/l), 1  $\mu$ l dNTPs (2,5 mmol/l), 0,3  $\mu$ l TaqPolymerase (5 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l ThermoPolpuffer und 14,7  $\mu$ l Wasser getaucht und gemischt. Das dazugehörige Temperaturprogramm ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

**Tabelle 3.4 Kolonie-PCR-Programm zur Vervielfältigung des 5'-Fragments der *SIPXG*.**

Temperatur in °C	Zeit in Sekunden	
94	300	} 30 Zyklen
94	30	
55	30	
72	60	
72	600	
4	$\infty$	

Im Anschluss wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Kapitel 3.3.9).



### 3.3.9 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die Trennung von DNA erfolgte in einem Agarosegel (1 % (w/v) Agarose und 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer (40 mmol/l Tris-HCl pH 7,5, 20 mmol/l Essigsäure, 1 mmol/l EDTA)). Die DNA-Lösung wurde mit 1/9 Volumen an Ladepuffer (0,21 % (w/v) Orange G, 0,1 mol/l EDTA, 50 % (w/v) Glycerin, pH 8,0) versetzt. Pro Geltasche wurden 33,3 µl der vorbereiteten DNA-Probe aufgetragen. Als Größenstandard dienten 7 µl GeneRuler™ Ladder Mix (0,1 µg/ul). Die Elektrophorese fand in TAE-Puffer bei 120 V für etwa 45 Minuten statt. Das Gel wurde unter UV-Licht der Gel-Dokumentationsanlage betrachtet und fotografiert.

### 3.3.10 Extraktion von DNA aus einem Agarosegel

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel wurde laut Anleitung des QIAEX II Gel Extraction Kit von QIAGEN durchgeführt. Die erhaltene DNA-Lösung wurde entweder für einen Restriktionsverdau (Kapitel 3.3.12) eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

### 3.3.11 Plasmidisolation

Die Plasmidisolation aus *E. coli* wurde laut Anleitung des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System von Promega durchgeführt. Dafür wurden 5 ml Vorkultur von *E. coli* (Kapitel 3.2.1.2) verwendet. Das gereinigte Plasmid wurde für einen Restriktionsverdau (Kapitel 3.3.12) oder eine Transformation von *S. cerevisiae* (Kapitel 3.3.15) verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 3.3.12 Restriktionsverdau

Für den Verdau eines PCR-Produktes (Kapitel 3.3.7) wurden 12 µl PCR-Produkt mit je 20 U Restriktionsendonuklease und Puffer 2 von New England Bioscience in einem 30 µl Ansatz gemischt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für den Verdau eines isolierten Plasmids wurden 5 µl Plasmidlösung (Kapitel 3.3.11) mit je 20 U Restriktionsendonuklease in einem 30 µl Ansatz gemischt und bei 37 °C inkubiert. Die Inkubation dauerte 15 Stunden für eine anschließende Ligation eines DNA-Fragmentes oder 3 Stunden für einen rein analytischen Restriktionsverdau. Der Erfolg des Plasmidverdaus wurde jeweils durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Kapitel 3.3.9). Das benötigte DNA-Fragment wurde gegebenenfalls aus dem Agarosegel extrahiert (Kapitel 3.3.10).

### 3.3.13 DNA-Ligation

Für die Ligation zweier DNA-Fragmente wurden je 4 µl beider DNA-Moleküle (Kapitel 3.3.12) mit 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl Ligasepuffer in einem 10 µl Ansatz gemischt und bei 4 °C für 20 Stunden inkubiert.

Für die Ligation eines DNA-Fragmentes in ein Plasmid wurden 5 µl DNA-Fragment und 3 µl geschnittenes Plasmid (Verhältnis 1,67:1) mit 1 µl T4-DNA-Ligase und dem Ligasepuffer in einem 10 µl Ansatz gemischt und bei 4 °C für 20 Stunden inkubiert. Das ligierte Plasmid wurde für eine Transformation von *E. coli* eingesetzt (Kapitel 3.3.14).

### 3.3.14 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden 5 µl Ligation (Kapitel 3.3.13) zu 100 µl kompetenten Zellen auf Eis pipettiert (Kapitel 3.2.1.1). Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und darauf einem Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C für 30 Sekunden unterzogen. Nach 2 Minuten Ruhezeit auf Eis wurden die Zellen mit 500 µl sterilem SOC-Medium (2 % (w/v) Trypton, 5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mmol/l NaCl, 20 mmol/l Glukose, 2,5 mmol/l KCl, 20 mmol/l MgCl<sub>2</sub>) versetzt und bei 37 °C und 150 U/min für 60 Minuten geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Platten mit den entstandenen Kolonien wurden bei 4 °C gelagert.

### 3.3.15 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von chemisch kompetenten Hefezellen (Kapitel 3.2.2.1) erfolgte laut Anleitung des *S. c.* EasyComp<sup>TM</sup> Transformation Kits, Invitrogen. 5 µl Plasmidlösung (pYES2\_SIPXG (Kapitel 3.3.11) oder das Plasmid ohne Insert, pYES2) wurden eingesetzt. Die Zellen wurden auf SC-U-Platten (SC-U + 2 % (w/v) Agar, + 2 % (w/v) α-D-Glukose) ausplattiert und 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

### 3.3.16 Sequenzierungen

Zum Bestätigen der Ligation der *SIPXG* in das Plasmid pYES2 wurde eine Plasmidprobe mit dem Oligonukleotid T7\_f (Anhang Kapitel 7.1) zum Sequenzieren an Microsynth AG, Balgach, Schweiz, geschickt.

## 3.4 Biochemische Methoden

### 3.4.1 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *S. cerevisiae*

Das Hefepellet aus 100 ml Hauptkultur (Kapitel 3.2.2.2) wurde in 10 ml Natriumphosphatpuffer (50 mmol/l Natriumphosphat, pH 7,4, 1 mmol/l EDTA, 5 % (w/v) Glycerin, 1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) auf Eis resuspendiert. Nach Zentrifugieren bei 1500 x g und 4 °C für 5 Minuten wurde das Hefepellet in 4 ml Natriumphosphatpuffer (+ 0,01 % (w/v) Tween®20) resuspendiert. Das gleiche Volumen an Glaskügelchen (0,25-0,50 mm) wurde zugefügt. Die Zellen wurden 30 Sekunden gevortext und anschließend 30 Sekunden auf Eis gestellt. Dieser Zellaufschluss wurde achtmal wiederholt. Nach Zentrifugieren bei 20000 x g und 4 °C für 5 Minuten wurde der Überstand auf Eis aufbewahrt und das Pellet zweimal mit 4 ml Natriumphosphatpuffer (+ 0,01 % (w/v) Tween® 20) gewaschen und die Überstände vereint. Der Proteinrohextrakt wurde sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 3.4.2 Mikrosomenisolation aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung mikrosomaler Proteine aus Hefezellen wurde das Hefepellet aus 50 ml Kultur (Kapitel 3.2.2.2) in 5 ml Tris-HCl (100 mmol/l Tris, pH 7,5, 1 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) resuspendiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 1500 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Resuspendieren des Hefepellets in 0,5 ml Tris-HCl wurden 1,3 g Glaskügelchen zugegeben. Die Zellen wurden zehnmal abwechselnd 30 Sekunden gevortext und 30 Sekunden auf Eis gestellt. Der Zellaufschluss wurde viermal mit 1 ml Tris-HCl gewaschen, wobei zwischen den Waschschritten bei 1000 x g und 4 °C für 2 Minuten zentrifugiert wurde, so dass sich Zellwandbestandteile und Glaskügelchen absetzen konnten. Die erhaltenen Überstände wurden zur Abtrennung von Zellorganellen mit Ausnahme der Mikrosomen bei 20000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Zum Überstand wurden 0,15 mol/l NaCl und 0,1 g/ml PEG 4000 gegeben und unter Rühren auf Eis gelöst. Zum Fällen der Mikrosomen wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 10000 x g und 4 °C für 10 Minuten wurde das Pellet in 0,5 ml Tris-HCl (+ 0,001 % Tween® 20) resuspendiert und anschließend in einem Glashomogenisator per Hand etwa zehnmal homogenisiert. Die Mikrosomen wurden entweder sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 3.4.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford, 1976, angewandt. 2 µl der zu untersuchenden Proteinlösung wurden mit 98 µl Wasser 1:50 verdünnt und mit 1 ml Bradford-Reagenz (8,5 % (v/v) Phosphorsäure, 5 % (v/v) Ethanol, 0,01 % (w/v) Coomassie) gemischt. Die Extinktion des gebildeten Farbkomplexes wurde bei einer Wellenlänge  $\lambda=595$  nm mittels Photometer ermittelt. Eine Eichgerade mit 0,2 µg, 0,4 µg, 0,8 µg, 10 µg, 15 µg und 20 µg Rinderserumalbumin in Wasser diente der Berechnung der Proteinkonzentration.

### 3.4.4 Gelelektrophorese von Proteinen

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierbei wurde ein 12 %iges Tris-Glycin-Gel mit 1 mm Schichtdicke (anamed Elektrophorese GmbH) verwendet. Die Proteinlösungen wurden auf die gewünschte Konzentration mit Wasser verdünnt und darauf mit ¼ Volumen SDS-PAGE-Laemmli-puffer (250 mmol/l Tris, pH 8,5, 25 % (v/v) Glycerin, 7,5 % (w/v) SDS, 12,5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt. Die Proteine wurden für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und dann in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard diente der Proteinmarker Molecular Weight Marker SDS7 (Sigma-Aldrich), wovon 10 µl in eine Tasche geladen wurden. Die Elektrophorese fand im SDS-PAGE Laufpuffer (25 mmol/l Tris, pH 8,5, 192 mmol/l Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 80 V statt, bis das Bromphenolblau des Laemmli-puffers ins Gel hineingewandert war. Dann wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde bei Austreten des Bromphenolblaus aus dem Gel beendet. Das Polyacrylamidgel wurde für 60 Minuten in Coomassie-Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 1 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie<sup>®</sup> Brilliantblau) geschwenkt. Abschließend wurde das Gel mehrmals mit Entfärbelösung (20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren und der blaue Hintergrund aus dem Gel möglichst verschwunden war.

### 3.4.5 Untersuchung der Proteinexpression in *S. cerevisiae*

#### 3.4.5.1 SDS-PAGE

Der zeitliche Verlauf der Expression der rekombinanten Peroxygenase (SIPXG) in *S. cerevisiae* wurde mittels SDS-PAGE untersucht. Eine Hauptkultur von 50 ml wurde wie in

Kapitel 3.2.2.2 angesetzt und nach 0, 3, 6, 9, 24, 30 und 36 Stunden wurden jeweils 5 ml Kultur entnommen. Die entnommenen Zellen wurden wie beschrieben zentrifugiert und bei -80 °C gelagert. Im Anschluss wurden aus den Hefepellets Proteinrohextrakte hergestellt (Kapitel 3.4.1). Dieser wurde für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet; jeweils 20 µg Protein wurden pro Geltasche geladen (Kapitel 3.4.3). Als Größenstandard wurden 5 µl Proteinmarker Molecular Weight Marker SDS7 mit 5 µl Dithiothreitol (16 mg/ml) gemischt und 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Danach wurde der Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Elektrophorese, Färbung und Entfärbung wurde wie in Kapitel 3.4.4 durchgeführt.

#### 3.4.5.2 Aktivitätstest

Zusätzlich zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde die Aktivität der Peroxygenase zu den jeweiligen Zeitabschnitten aus Kapitel 3.4.5.1 untersucht. Dafür wurden jeweils 50 µg Proteinrohextrakt (Kapitel 3.4.1) mit 12,5 µl 9-HPOD (2 mmol/l in Methanol, 30 %) in 500 µl Natriumacetatpuffer (100 mmol/l, pH 5,5) gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl Salzsäure (100 mmol/l) durch Absenkung des pH-Wertes auf 2,5 gestoppt. Das Oxidationsprodukt wurde mit 500 µl einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1) extrahiert, bei 16100 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und die organische Phase zur Weiterverarbeitung abgenommen. Dieser Extraktionsschritt wurde einmal wiederholt. Die organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel langsam unter einem Stickstoffstrom abgedampft. Der Rückstand wurde in 500 µl Methanol (30 % (v/v)) gelöst und einer Flüssigchromatographie unterzogen (Kapitel 3.5.3). Eine Eichgerade mit 0, 10, 25, 50 bzw. 100 mmol/l 9-HPOD in Methanol (30 % /v/v)) diente der Quantifizierung der übriggebliebenen Konzentration an 9-HPOD (Anhang Kapitel 7.7.1). Aus der Konzentration wurde die Stoffmenge an noch vorhandenem 9-HPOD berechnet:

$$n(9\text{-HPOD}) = c(9\text{-HPOD}) \times 0,5 \text{ ml}$$

Anhand der eingesetzten Stoffmenge von 25 nmol 9-HPOD und der übriggebliebenen Stoffmenge wurde der Substratumsatz ermittelt. Die Aktivität entspricht dem Quotient aus Substratumsatz durch Zeit und hat die Einheit nmol/min.

### **3.4.6 Einfluss von Tetcyclacis auf die Enzymaktivität**

10 µg Proteinrohextrakt (Herstellung ohne Tween®20 im Extraktionspuffer, Kapitel 3.4.1) wurden mit Tetcyclacis (Endkonzentration 0, 10, 50, 100 oder 500 µmol/l) und 50 µl Natriumacetatpuffer (100 mmol/l, pH 5,5, 20 % (w/v) Glycerin) gemischt, mit Wasser auf 475 µl aufgefüllt und bei 4 °C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 25 µl 9-HPOD (2 mmol/l in Methanol, 30 %) zugefügt und bei 26 °C für weitere 60 Minuten inkubiert. Extraktion, Messung und Quantifizierung fanden wie in Kapitel 3.4.5.2 statt.

### **3.4.7 Effekte von pH-Wert und Lösungsmittel auf die Extraktion von Fettsäurehydroperoxiden**

8 Aliquots von je 12,5 µl 9-HPOD (2 mmol/l in Methanol, 30 %) wurden mit Natriumacetatpuffer (Endkonzentration 100 mmol/l, pH 5,5) auf 500 µl aufgefüllt. 4 Aliquots dieser Mischung wurden mit 100 µl Salzsäure (100 mmol/l) auf einen pH-Wert von 2,5 angesäuert, die restlichen 4 wurden mit 100 µl Wasser versetzt. Anschließend wurde mit je 500 µl Diethylether, Dichlormethan, Essigsäureethylester und einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1) extrahiert, bei 16100 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und die organische Phase aufgehoben. Der weitere Verlauf der Extraktion sowie Messung und Quantifizierung fanden wie in Kapitel 3.4.5.2 statt.

### **3.4.8 pH-Optimum**

Die Aktivität der SIPXG wurde bei den pH-Werten 4, 5 und 6 in Natriumacetatpuffer (Endkonzentration 10 mmol/l, 2 % (w/v) Glycerin) und bei den pH-Werten 7, 8 und 9 in Tris-HCl (Endkonzentration 10 mmol/l, pH-Wert 7, 8 oder 9, 2 % (w/v) Glycerin) bestimmt. Dafür wurden jeweils 50 µg Proteinrohextrakt (Kapitel 3.4.1) mit 50 µl Ölsäure (2,82 mmol/l) und 50 µl Puffer gemischt und mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit je 50 µl Wasserstoffperoxid (25 mmol/l) gestartet und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit je 500 µl Dichlormethan extrahiert, bei 16100 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert und die organische Phase aufgehoben. Dieser Extraktionsschritt wurde einmal wiederholt. Die jeweiligen organischen Phasen wurden vereint und das Lösungsmittel langsam unter einem Stickstoffstrom abgedampft. Um die Proben mittels GC-MS zu messen, wurde eine Methylierung der Carboxylgruppen unternommen. Dafür wurden die Rückstände in je 300 µl Methanol gelöst und mit je 150 µl Trimethylsilyldiazomethan (2 mol/l) gemischt. Nach 1 Stunde bei Raumtemperatur bei

geöffnetem Deckel der Reaktionsgefäße wurde das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom abgedampft, der Rückstand in 200 µl n-Hexan gelöst und einer Gaschromatographie unterzogen (Kapitel 3.5.5.1, Methode „Fettsäure 1“). Für eine Semiquantifizierung wurde im GC-Chromatogramm eine Ionenspur von  $m/z$  155 gewählt (Anhang Kapitel 7.6).

### 3.4.9 Temperatur-Optimum

Für die Aktivitätsbestimmung der Peroxygenase bei neun verschiedenen Temperaturen wurden 50 µg Proteinrohextrakt (Kapitel 3.4.1) mit 50 µl Ölsäure (2,82 mmol/l) und 50 µl Natriumacetatpuffer (100 mmol/l, pH 6, 20 % (w/v) Glycerin) gemischt und mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit je 50 µl Wasserstoffperoxid (25 mmol/l) gestartet und je Ansatz bei 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 oder 80 °C für 20 Minuten inkubiert. Je Reaktion wurde mit 100 µl Salzsäure (100 mmol/l) gestoppt. Extraktion und Derivatisierung wurde wie bei der Bestimmung des pH-Optimums durchgeführt (Kapitel 3.4.8). Die Proben wurden einer Gaschromatographie unterzogen (Kapitel 3.5.5.1, Methode „Fettsäure 1“). Für eine Semiquantifizierung wurde im GC-Chromatogramm eine Ionenspur von  $m/z$  155 gewählt (Anhang Kapitel 7.6).

### 3.4.10 Substratscreening

#### 3.4.10.1 Fettsäuren und Fettsäurederivate

Folgende Fettsäuren und Fettsäurederivate wurden auf Oxidation durch die Peroxygenase untersucht:

Ölsäure, Ölsäuremethylester, Oleylalkohol, Linolsäure, konjugierte (10 *trans*, 12 *cis*) Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure, Eicosensäure, Erucasäuremethylester

Reaktionsansatz:

50 µg mikrosomale Peroxygenase (Kapitel 3.4.2) wurden mit 50 µl Substrat (20 mmol/l in Methanol) und 50 µl Natriumacetatpuffer (100 mmol/l, pH 6, 20 % (w/v) Glycerin) gemischt und mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit 50 µl Wasserstoffperoxid (25 mmol/l) gestartet und bei 40 °C für 20 Minuten inkubiert. Drei folgende Kontrollversuche wurden außerdem durchgeführt:

- mit mikrosomalen Proteinen ohne überexprimierte Peroxygenase (Leervektorkontrolle)
- ohne Protein
- ohne Wasserstoffperoxid

Extraktion und gegebenenfalls eine Methylierung (nur bei den Carboxylgruppen der Fettsäuren) wurden wie bei der Bestimmung des pH-Optimums durchgeführt (Kapitel 3.4.8). Nach dem Trocknen mit Stickstoff wurden die Proben mit Oleylalkohol als Substrat in 60  $\mu$ l Methanol (30 % (v/v)) gelöst und mittels LC-MS untersucht (Kapitel 3.5.4). Die restlichen Proben wurden in je 100  $\mu$ l n-Hexan aufgenommen und mit GC-MS gemessen (Kapitel 3.5.5.1, Methode „Fettsäure 1“, zusätzlich Kapitel 3.5.5.2, Methode „Fettsäure 3“). Die Identifizierung fand entweder durch Vergleiche der Massenspektren mit der NIST-Datenbank, Literaturangaben oder der Massenspektren der Oxidationsprodukte durch *m*-Chlorperbenzoesäure (mCPBS) statt (Kapitel 3.4.16). Im Falle der Oxidationsprodukte der  $\alpha$ -Linolensäure wurden diese säulenchromatographisch gereinigt und mittels NMR untersucht (Kapitel 3.4.15, 3.5.2 und 3.5.7).

#### 3.4.10.2 Terpene und flüchtige Naturstoffe

Folgende Terpene und Naturstoffe wurden auf Oxidation durch die Peroxygenase untersucht: (S)-(-)-Limonen, (R)-(+)-Limonen,  $\alpha$ -Terpinen,  $\gamma$ -Terpinen,  $\alpha$ -Phellandren, Terpinolen,  $\alpha$ -Pinen,  $\alpha$ -Thujen, Nerol, Geraniol, (S)-(+)-Carvon, 3-Caren,  $\alpha$ -Jonon,  $\alpha$ -Bisabolol,  $\beta$ -Caryophyllen sowie *cis*-Stilben, *cis*-Jasmon, Jasmonsäure, Jasmonsäuremethylester, Eugenol und Isoeugenol

Reaktionsansatz:

100  $\mu$ g mikrosomale Peroxygenase (Kapitel 3.4.2) wurden mit 50  $\mu$ l Substrat (10 mmol/l in Methanol) und 50  $\mu$ l Natriumacetatpuffer (100 mmol/l Natriumacetat, pH 6, 20 % (w/v) Glycerin) gemischt und mit Wasser auf 450  $\mu$ l aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit 50  $\mu$ l Wasserstoffperoxid (25 mmol/l) gestartet und bei 40 °C für 40 Minuten inkubiert. Drei folgende Kontrollversuche wurden außerdem durchgeführt:

- mit mikrosomalen Proteinen ohne überexprimierte Peroxygenase (Leervektorkontrolle)
- ohne Protein
- ohne Wasserstoffperoxid

Extraktion und gegebenenfalls eine Methylierung (nur bei der Carboxylgruppe der Jasmonsäure) wurden wie bei der Bestimmung des pH-Optimums durchgeführt (Kapitel 3.4.8). Der Rückstand wurde in 100  $\mu$ l Methanol gelöst und mittels GC-MS



untersucht (Kapitel 3.5.5.1, Methode „Terpene 1“ für (S)-(-)-Limonen, (R)-(+)-Limonen,  $\alpha$ -Terpinen,  $\gamma$ -Terpinen,  $\alpha$ -Phellandren,  $\alpha$ -Pinen, Nerol, Geraniol, und  $\beta$ -Caryophyllen; Methode „Terpene 2“ für Eugenol, Isoeugenol und *cis*-Stilben; Kapitel 3.5.5.2, Methode „Terpene 4“ für (S)-(+)-Carvon; Methode „Terpene 5“ für  $\alpha$ -Bisabolol, 3-Caren, *cis*-Jasmon, Jasmonsäure, Jasmonsäuremethylester,  $\alpha$ -Jonon und Terpinolen; siehe außerdem Kapitel 3.5.5.3 für  $\alpha$ -Phellandren und Kapitel 3.5.6 für (S)-(-)-Limonen und (R)-(+)-Limonen).

Für  $\alpha$ -Thujen wurde eine Festphasenmikroextraktion (SPME) durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.13.2).

#### 3.4.10.3 1-Methyl-1,4-cyclohexadien und 1,4-cyclohexadien

1-Methyl-1,4-Cyclohexadien und 1,4-Cyclohexadien wurden auf Oxidation durch die Peroxygenase untersucht.

Reaktionsansatz und Kontrollen wurden wie in Kapitel 3.4.10.2 durchgeführt.

Auf Grund der Flüchtigkeit der Substrate wurde statt einer Flüssigextraktion eine Festphasen-Mikroextraktion (SPME) im Anschluss an die Reaktion durchgeführt. Die Phase (Kapitel 3.1.4) wurde 20 Minuten in die Gasphase oberhalb des Reaktionsansatzes gehalten. Im Anschluss wurde die Phase zum Desorbieren der gebundenen Stoffe 2 Minuten im Injektor der GC erhitzt und die Probe wie beschrieben gemessen (Kapitel 3.5.5.1, Methode „SPME 1“).

### 3.4.11 Oxidation durch tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid

Neben Wasserstoffperoxid wurden zwei weitere, kommerziell erhältliche Hydroperoxide als mögliche Co-Substrate der Peroxygenase eingesetzt: tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid.

Ölsäure sowie die Terpene (S)-(-)-Limonen,  $\alpha$ -Terpinen und  $\gamma$ -Terpinen wurden wie im Kapitel 3.4.10 auf Oxidation durch die Peroxygenase untersucht, wobei anstatt Wasserstoffperoxid entweder 0,75 mmol/l tertiäres Butylhydroperoxid oder 0,5 mmol/l Cumolhydroperoxid verwendet wurden. Drei folgende Kontrollversuche wurden außerdem durchgeführt:

- mit mikrosomalen Proteinen ohne überexprimierte Peroxygenase (Leervektorkontrolle)
- ohne Protein
- ohne Hydroperoxid

Extraktion und eine Derivatisierung der Ölsäure wurde wie beschrieben durchgeführt. Die Proben wurden mittels GC-MS untersucht (Kapitel 3.5.5.2, Methode „Fettsäure 3“ für Ölsäure, Methode „Terpene 6“ für (S)-(-)-Limonen,  $\alpha$ -Terpinen und  $\gamma$ -Terpinen). Für eine

Semiquantifizierung wurde im GC-Chromatogramm eine Ionenspur des jeweiligen Produktes gewählt (Anhang Kapitel 7.6).

### 3.4.12 Sättigungskurven

#### 3.4.12.1 Fettsäuren und Fettsäurederivate

50 µg mikrosomale Peroxygenase (Kapitel 3.4.2) wurden mit 50 µl Natriumacetatpuffer (100 mmol/l, pH 6, 20 % (w/v) Glycerin) gemischt und mit Wasser auf 400 µl aufgefüllt. Insgesamt wurden zehn verschiedene Substratkonzentrationen von 0,02-2 mmol/l eingesetzt. Da die Substrate in Methanol gelöst waren, wurde darauf geachtet, dass der Methanolgehalt in jedem Reaktionsansatz 10 % (v/v) betrug, um einen Einfluss von Methanol auf die Reaktion auszuschließen. Die Reaktion wurde mit 50 µl Wasserstoffperoxid (25 mmol/l) gestartet und bei 40 °C für 40 Minuten inkubiert. Extraktion und gegebenenfalls eine Methylierung (nur bei den Carboxylgruppen der Fettsäuren) wurden wie bei der Bestimmung des pH-Optimums durchgeführt (Kapitel 3.4.8). Die Proben mit Oleylalkohol als Substrat wurden nach dem Trocknen mit Stickstoff in 60 µl Methanol (30 % (v/v)) gelöst und mittels LC-MS untersucht (Kapitel 3.5.4). Die restlichen Proben wurden in n-Hexan aufgenommen und mit GC-MS gemessen (Kapitel 3.5.5.2, Methode „Fettsäure 3“). Für eine Semiquantifizierung wurde im GC-Chromatogramm eine Ionenspur des jeweiligen Produktes gewählt (Anhang Kapitel 7.6).

#### 3.4.12.2 Wasserstoffperoxid, tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid

50 µg mikrosomale Peroxygenase (Kapitel 3.4.2) wurden mit 25 µl Ölsäure (10 mmol/l in Methanol) und 50 µl Natriumacetatpuffer (100 mmol/l, pH 6, 20 % (w/v) Glycerin) gemischt und mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit wässrigen Lösungen von Wasserstoffperoxid und tertiärem Butylhydroperoxid sowie methanolischer Lösung von Cumolhydroperoxid gestartet. Bei dem in Methanol gelöstem Cumolhydroperoxid wurde darauf geachtet, dass der Methanolgehalt in jedem Reaktionsansatz 10 % (v/v) betrug, um einen Einfluss von Methanol auf die Reaktion auszuschließen. Elf verschiedene Konzentrationen vom Wasserstoffhydroperoxid (0,01-5 mmol/l), zehn verschiedene Konzentrationen vom tertiären Butylhydroperoxid (0,1-5 mmol/l) und zehn verschiedene Konzentrationen vom Cumolhydroperoxid (0,005-2 mmol/l) wurden eingesetzt. Die Reaktion fand bei 40 °C für 40 Minuten statt. Extraktion und Methylierung wurden wie bei der Bestimmung des pH-Optimums durchgeführt (Kapitel 3.4.8). Die Proben wurden in n-Hexan aufgenommen und mit GC-MS gemessen (Kapitel 3.5.5.2, Methode „Fettsäure 3“). Für eine

Semiquantifizierung wurde im GC-Chromatogramm eine Ionenspur von  $m/z$  155 gewählt (Anhang Kapitel 7.6).

### 3.4.13 Aktivitätsmessungen

#### 3.4.13.1 Fettsäuren und Fettsäurederivate

Die Aktivität der Peroxygenase bei Fettsäuren und deren Derivaten als Substrate wurde in einem gekoppelten Enzymtest photometrisch ermittelt. Hierbei reagierte Wasserstoffperoxid, welches durch die Peroxygenase nicht umgesetzt wurde, mit nachträglich zugefügtem NADH und einer Peroxidase zu Wasser und  $\text{NAD}^+$ . Die Menge an verbrauchtem NADH ist äquivalent zur übrigen Wasserstoffperoxidmenge und kann wegen der unterschiedlichen Absorptionen von NADH und  $\text{NAD}^+$  photometrisch bei 340 nm gemessen werden:



Reaktionsansatz:

50  $\mu\text{g}$  mikrosomale Peroxygenase (Kapitel 3.4.2) wurden mit 50  $\mu\text{l}$  Substrat (2 mmol/l in Methanol) und 25  $\mu\text{l}$  Natriumacetatpuffer (100 mmol/l, pH 6, 20 % (w/v) Glycerin, 0,01 % (v/v) Tween® 20) gemischt und mit Wasser auf 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit 50  $\mu\text{l}$  Wasserstoffperoxid (10 mmol/l) gestartet und bei 40 °C für 20 Minuten inkubiert. 0,1 ml dieses Reaktionsansatzes wurden mit 1,9 ml NADH-Lösung (Endkonzentration 125  $\mu\text{mol/l}$  in 100 mmol/l Tris-HCl, pH 8 (Sulfit-Kit „Gesamt-SO<sub>2</sub>“, Kapitel 3.1.3)) in einer 2,5 ml-Küvette gemischt. Die Absorption wurde bei 340 nm gemessen (= E1). Anschließend wurden 5  $\mu\text{l}$  NADH-Peroxidase-Lösung (Sulfit-Kit „Gesamt-SO<sub>2</sub>“) zugefügt, gemischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut die Absorption bei 340 nm gemessen (= E2). Mittels dieser beiden Absorptionen wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration folgendermaßen berechnet:

$$c(\text{H}_2\text{O}_2) = \frac{(\text{E1-E2}) \times \text{Gesamtvolumen (in ml)}}{\varepsilon \text{ (in l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times \text{Schichtdicke (in cm)} \times \text{Probenvolumen (in ml)}} = \frac{(\text{E1-E2}) \times 2,005 \text{ ml}}{6,3 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ ml}}$$

Aus der Konzentration wurde die Stoffmenge an noch vorhandenem Wasserstoffperoxid berechnet:

$$n(\text{H}_2\text{O}_2) = c(\text{H}_2\text{O}_2) \times 0,25 \text{ ml}$$

Anhand der eingesetzten Stoffmenge von 500 nmol Wasserstoffperoxid und der übrig gebliebenen Stoffmenge wurde der Substratumsatz ermittelt. Die Aktivität entspricht dem Quotient aus Substratumsatz durch Zeit und hat die Einheit nmol/min. Von diesem Wert wurde die Hintergrundaktivität anderer Wasserstoffperoxid abbauender Enzyme im mikrosomalen Extrakt subtrahiert. Die Hintergrundaktivität wurde in einem Reaktionsansatz mit 37,5 µl Methanol anstatt Substrat gemessen.

#### 3.4.13.2 Terpene und andere flüchtige Verbindungen

Die Aktivität der Peroxygenase bei Terpenen und anderen flüchtigen Substraten wurde über SPME und GC-MS gemessen.

Reaktionsansatz:

50 µg mikrosomale Peroxygenase wurden mit 50 µl Substrat (1 mmol/l in Methanol) und 50 µl Natriumacetatpuffer (100 mmol/l Natriumacetat, pH 6, 20 % (w/v) Glycerin) gemischt und mit Wasser auf 450 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit 50 µl Wasserstoffperoxid (25 mmol/l) gestartet und bei 40 °C für 40 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Phase (Kapitel 3.1.4) 20 Minuten in die Gasphase oberhalb des Reaktionsansatzes gehalten. Die Analyse fand mittels GC-MS statt (Kapitel 3.5.5.1, Methode „SPME 2“ für (S)-(-)-Limonen, (R)-(+)-Limonen, α-Terpinen, γ-Terpinen, α-Phellandren, Terpinolen, Nerol und *cis*-Jasmon; Methode „SPME 3“ für α-Thujen; Methode „SPME 4“ für α-Bisabolol und *cis*-Stilben). Für eine Quantifizierung wurde im GC-Chromatogramm eine Ionenspur des jeweiligen Substrates gewählt (Anhang Kapitel 7.6). Die Peakflächen der Substrate wurden mittels erstellter Eichkurven in Konzentrationen umgerechnet (Anhang Kapitel 7.7.2). Für eine Eichkurve wurden pro Substrat vier Konzentrationen von 10, 50, 75 und 100 µmol/l in Natriumacetatpuffer bei 40 °C für 40 Minuten inkubiert und wie oben beschrieben eine SPME und GC-MS-Messung durchgeführt. Aus den berechneten Konzentrationen konnten die absoluten Stoffmengen in den jeweiligen Reaktionen ermittelt werden. Anhand der eingesetzten Stoffmenge von 50 nmol Substrat und der übriggebliebenen Stoffmenge wurde der Substratumsatz ermittelt. Die Aktivität entspricht dem Quotient aus Substratumsatz durch Zeit und hat die Einheit nmol/min. Von diesem Wert wurde die Hintergrundaktivität der Leervektorkontrolle subtrahiert; diese Kontrollreaktionen beinhalteten 50 µg mikrosomales Protein aus Zellen ohne überexprimierte Peroxygenase.

### 3.4.14 Oxidation in organischen Lösungsmitteln

100 µg mikrosomale Peroxygenase (Kapitel 3.4.2) wurden mit 10 µl γ-Terpinen (0,01 mol/l in Methanol, Ethanol bzw. 1-Propanol) gemischt und auf 995 µl mit Methanol, Ethanol bzw. 1-Propanol aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit 5 µl Wasserstoffperoxid (0,5 mol/l in Wasser) gestartet und bei 40 °C für 40 Minuten inkubiert. Anschließend wurde für 20 Minuten eine Festphasen-Mikroextraktion (SPME; Phasenmaterial siehe Kapitel 3.1.4) in der Gasphase oberhalb des Reaktionsansatzes durchgeführt. Die Analyse fand mittels GC-MS statt (Kapitel 3.5.5.1, Methode „SPME 2“); die Quantifizierung erfolgte wie in Kapitel 3.4.13, wobei für die Eichkurven anstatt Puffer das entsprechende Lösungsmittel verwendet wurde (Anhang Kapitel 7.7.3).

### 3.4.15 Großer Reaktionsansatz

Um ein unbekanntes Oxidationsprodukt mittels NMR zu identifizieren, wurde dieses in größeren Maßstäben enzymatisch synthetisiert.

Etwa 10 mg Proteinrohextrakt (Kapitel 3.4.1) wurden mit 13,6 mg Terpen (α-Phellandren, α-Terpinen oder Terpinolen, jeweils in 10 ml Methanol gelöst) oder 50 mg α-Linolensäure (in 100 µl n-Hexan:2-Propanol 2:1) gemischt und mit Natriumacetatpuffer (Endkonzentration 100 mmol/l, pH 6) auf 100 ml aufgefüllt. Die Reaktion wurde mit 25,5 µl Wasserstoffperoxid (9,79 mol/l) gestartet und 4 bis 5 Stunden bei 40 °C gerührt. Zur Beobachtung des Syntheseverlaufs wurde nach gleichen Zeitabschnitten eine Probe von je 0,5 ml entnommen. Jede Probe wurde zweimal mit je 500 µl Dichlormethan extrahiert. Mit Ausnahme der Proben mit α-Linolensäure wurden keine Methylierungen durchgeführt (Extraktion und Derivatisierung siehe Kapitel 3.4.8). Der Rückstand wurde in 100 µl Methanol (für Terpene) oder 100 µl n-Hexan (für α-Linolensäure) gelöst und einer Gaschromatographie unterzogen (Kapitel 3.5.5.1, Methode „Terpene 1“ für α-Phellandren und α-Terpinen; Kapitel 3.5.5.2, Methode „Fettsäure 3“ für α-Linolensäuremethylester, Methode „Terpene 6“ für Terpinolen). Für eine Semiquantifizierung wurde im GC-Chromatogramm eine Ionenspur des jeweiligen Produktes gewählt (Kapitel 7.6).

Um den Abbau von Wasserstoffperoxid durch andere Enzyme des Proteinrohextraktes auszugleichen, wurde zusätzlich zu den Probenentnahmen alle 30 Minuten erneut jeweils 25,5 µl Wasserstoffperoxid (9,79 mol/l) zur Reaktion zugefügt. Abhängig vom Substratumsatz im jeweiligen Reaktionsansatz wurden nach 90 und 180 Minuten jeweils 13,6 mg α-Phellandren bzw. nach 150 Minuten 13,6 mg Terpinolen zugefügt.

Zum Extrahieren des Oxidationsproduktes von  $\alpha$ -Terpinen wurde der komplette Reaktionsansatz dreimal mit je 50 ml Diethylether geschüttelt und die organischen Phasen im Scheidetrichter getrennt. Zum Extrahieren der Oxidationsprodukte von  $\alpha$ -Phellandren, Terpinolen oder  $\alpha$ -Linolensäure wurde jeweils dreimal mit 50 ml Dichlormethan geschüttelt und die organischen Phasen bei 5000 x g und 4 °C für 10 Minuten getrennt. Sowohl der Diethyletherextrakt als auch die Dichlormethanextrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde langsam und schonend bei 35 °C unter Einsatz einer Vigreux-Kolonnen abdestilliert. Der Rückstand der Terpene wurde entweder bei 4 °C gelagert oder mit einer Kieselgelsäule gereinigt (Kapitel 3.5.2). Der Rückstand der Linolsäure wurde in 500  $\mu$ l n-Hexan gelöst, mit 500  $\mu$ l Trimethylsilyldiazomethan (2 mol/l) gemischt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom abgedampft, der Rückstand in 1 ml eines Gemisches aus n-Hexan und Essigsäureethylester (8,5:1) gelöst und über einer Kieselgelsäule gereinigt (Kapitel 3.5.2).

#### 3.4.16 Chemische Oxidation

Für zusätzliche Identifizierungen von enzymatischen Oxidationsprodukten wurde eine chemische Oxidation der Substrate durchgeführt.

Jeweils 0,18 mmol Ölsäure, Ölsäuremethylester, Oleylalkohol, Linolsäure, konjugierte (10 *trans*, 12 *cis*) Linolsäure,  $\alpha$ -Linolensäure und Eicosensäure wurden in je 1 ml Dichlormethan gelöst und mit je 0,8 ml Natriumhydrogencarbonatlösung (5 % (w/v) in Wasser) überschichtet. Unter starkem Rühren auf Eis wurden jeweils 3 ml mCPBS (0,067 mol/l) langsam zugefügt. Die Suspension rührte etwa 18 Stunden. Anschließend wurde zweimal mit je 5 ml Natronlauge im Scheidetrichter extrahiert und die organischen Phasen gesammelt. Das Dichlormethan wurde unter einem Stickstoffstrom abgedampft. Die Rückstände der Fettsäuren wurden in je 300  $\mu$ l Methanol gelöst und mit je 200  $\mu$ l Trimethylsilyldiazomethan (2 mol/l) für 60 min derivatisiert. Das Lösungsmittel wurde abgedampft und die Rückstände von methylierten Fettsäuren und Ölsäuremethylester in je 1 ml n-Hexan gelöst. Die Proben wurden mittels GC-MS untersucht (Kapitel 3.5.5.2, Methode „Fettsäure 3“). Der Rückstand des Oleylalkohols wurde in 1 ml Methanol (30 % v/v) gelöst und mittels LC-MS untersucht (Kapitel 3.5.4). Zum Vergleich wurden die enzymatischen Oxidationsprodukte (Kapitel 3.4.10) unter denselben chromatographischen Bedingungen gemessen.

## 3.5 Analytische Methoden

### 3.5.1 Dünnschichtchromatographie

Die Auftrennung von Substrat und Oxidationsprodukt in Kieselgel wurde auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte (DC-Platte; Polyesterfolien mit Kieselgel 60, Kapitel 3.1.4) untersucht.

8  $\mu$ l Extrakt (Kapitel 3.4.15) wurden im Abstand von 1 cm vom unteren Rand auf die Platte aufgetragen. Als Fließmittel dienten Gemische aus n-Hexan und Essigsäureethylester sowie Pentan und Diethylether. Nach der Chromatographie wurden die Platten an Luft getrocknet. Anschließend wurden die Platten, auf welchen Terpene getrennt wurden, etwa 2 Sekunden in eine Lösung von 5 % (w/v) Schwefelsäure in Ethanol getaucht, an Luft getrocknet und darauf in eine Lösung von 1 % (w/v) Vanillin in Ethanol getaucht. Zuletzt wurden die Platten bei 100 °C für 5 Minuten erhitzt. Für den Nachweis von  $\alpha$ -Linolensäuremethylester und dessen Oxidationsprodukten wurde die DC-Platte mit Iod bedampft anstatt sie mit Vanillin-Schwefelsäure zu behandeln.

### 3.5.2 Reinigung unbekannter Oxidationsprodukte über eine Kieselgelsäule

Eine Chromatographiesäule aus Glas mit Durchmesser von 2 cm wurde etwa 14 cm hoch mit Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm) befüllt. Die mobile Phase bestand aus einer Mischung aus n-Hexan und Essigsäureethylester (3:2 für Terpene und 8,5:1,5 für  $\alpha$ -Linolensäuremethylester). Der zu trennende Extrakt (Kapitel 3.4.15) wurde in 1 ml des Fließmittelgemisches gelöst und auf die Säule aufgetragen. Bis zu 30 Elutionsfraktionen von je 4 ml wurden gesammelt. Der Verlauf der Elution wurde mittels Gaschromatographie verfolgt; dabei wurden die Elutionsfraktionen direkt in den Gaschromatographen injiziert (Kapitel 3.5.5.1, Methode „Terpene 1“ für  $\alpha$ -Phellandren und  $\alpha$ -Terpinen; Kapitel 3.5.5.2, Methode „Fettsäure 3“ für  $\alpha$ -Linolensäuremethylester, Methode „Terpene 6“ für Terpinolen). Für eine Semiquantifizierung wurde im GC-Chromatogramm eine Ionenspur des jeweiligen Produktes gewählt (Kapitel 7.6).

Die gereinigten Produkte wurden für eine NMR-Spektroskopie verwendet (Kapitel 3.5.7).

### 3.5.3 HPLC-UV

Die quantitativen Messungen der Fettsäurehydroperoxide 9-HPOD und 13-HPOD wurden an der HPLC-UV, Knauer, mit der Chromatographiesäule GROM-Sil100, Phenomenex,

durchgeführt (Kapitel 3.1.5). Das Probenvolumen betrug 30  $\mu\text{l}$ . Als Fließmittel diente eine Mischung aus Wasser (A) und Methanol (B), jeweils mit 0,1 % Ameisensäure. Der Fluss betrug 0,8 ml/min. Es wurde folgender Fließmittelgradient eingesetzt:

0-5 Minuten	B konstant bei 30 %
5-50 Minuten	B stieg auf 100 %
50-60 Minuten	B sank auf 30 %

Die UV-Detektion fand bei 235 nm statt.

### 3.5.4 HPLC-UV/MS

Verwendet wurde der Flüssigchromatograph Agilent 1100 series, Agilent, mit der Chromatographiesäule phenomenex® Luna 3u, Phenomenex. Die Säulentemperatur betrug 25 °C. Das Probenvolumen lag bei 5  $\mu\text{l}$ . Als Fließmittel diente eine Mischung aus Wasser (A) und Methanol (B), jeweils mit 0,1 % Ameisensäure. Der Fluss betrug 0,2 ml/min. Es wurde folgender Fließmittelgradient eingesetzt:

0-5 Minuten	B konstant bei 30 %
5-50 Minuten	B stieg auf 100 %
50-60 Minuten	B sank auf 30 %

Im Anschluss an die Säule befand sich sowohl ein UV-Detektor als auch das Massenspektrometer Esquire 3000 plus, Bruker Daltonics (Kapitel 3.1.5). Die UV-Detektion fand bei 234 nm statt. Für das Massenspektrometer wurden folgende Einstellungen gewählt:

Spraygas	Stickstoff (30,0 psi)
Trockengas	Stickstoff (330 °C, 9 l/min)
Scanbereich	$m/z$ 30 – 800
Polarität	alternierend
ICC Target	20000 oder 200 ms
Zielmasse (SPS)	$m/z$ 400
Ionisierungsspannung	- 4000 V
Endplattenspannung	- 500 V
MS/MS	Auto-tandem MS2
Kollisionsgas	Helium 5.0 ( $3,56 \times 10^{-6}$ mbar)
Kollisionsenergie	1,0 V
Skimmer	40,0 V



Cap Exit	121 V
Oct 1 DC	12,0 V
Oct 2 DC	1,7 V
Trap Drive	45,6
Oct RF	150 V
Lens 1	-5,0 V
Lens 2	- 60,0 V

### 3.5.5 GC-MS

#### 3.5.5.1 Gaschromatograph Trace GC, gekoppelt mit Massenspektrometer Trace DSQ

Trägergas	Helium 5.0
Fluss	1,1 ml/min
Temperatur der Transferline	280 °C
Temperatur der Ionenquelle	250 °C
Ionisierungsenergie	70 eV
Methoden:	
<u>„Fettsäure 1“</u>	
Kapillarsäule	RESTEK Rtx®-5MS, 15 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Split; Splitratio (Splitfluss/Säulenfluss) 10
Injektortemperatur	220 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	100 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient	5 °C/Minute auf 280 °C, 10 Minuten
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Solvent delay	3 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 50 – 600

#### „Fettsäure 2“

Kapillarsäule	VF-5MS, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Split; Splitratio (Splitfluss/Säulenfluss) 10

Injektortemperatur	220 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	100 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	30 °C/Minute auf 190 °C
Temperaturgradient 2	8 °C/Minute auf 250 °C
Temperaturgradient 3	20 °C/Minute auf 280 °C, 10 Minuten
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Solvent delay	3 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 40 – 600

#### „Terpene 1“

Kapillarsäule	RESTEK Rtx®-5MS, 15 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Split; Splitratio (Splitfluss/Säulenfluss) 10
Injektortemperatur	220 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	40 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	6 °C/Minute auf 100 °C
Temperaturgradient 2	40 °C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 10 Minuten
Solvent delay	4 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 40 – 600

#### „Terpene 2“

Kapillarsäule	RESTEK Rtx®-5MS, 15 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Split; Splitratio (Splitfluss/Säulenfluss) 10
Injektortemperatur	220 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	100 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	40 °C/Minute auf 150 °C
Temperaturgradient 2	10 °C/Minute auf 250 °C

---

Temperaturgradient 3	40 °C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Solvent delay	3 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 40 – 600

„Terpene 3“

Kapillarsäule	RESTEK Rtx®-5MS, 15 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Split; Splitratio (Splitfluss/Säulenfluss) 10
Injektortemperatur	220 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	100 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	20 °C/Minute auf 120 °C
Temperaturgradient 2	10 °C/Minute auf 180 °C
Temperaturgradient 3	40 °C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Solvent delay	3 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 40 – 600

„SPME 1“

Kapillarsäule	VF-5MS, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Splitless
Injektortemperatur	250 °C
Starttemperatur	35 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	40 °C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 50 – 200

„SPME 2“

Kapillarsäule	RESTEK Rtx®-5MS, 15 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Splitless
Injektortemperatur	220 °C
Starttemperatur	40 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	8 °C/Minute auf 100 °C
Temperaturgradient 2	40 °C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 50 – 200

„SPME 3“

Kapillarsäule	RESTEK Rtx®-5MS, 15 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Splitless
Injektortemperatur	220 °C
Starttemperatur	40 °C, 3 Minuten
Temperaturgradient 1	20 °C/Minute auf 100 °C
Temperaturgradient 2	40 °C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 50 – 200

„SPME 4“

Kapillarsäule	RESTEK Rtx®-5MS, 15 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Splitless
Injektortemperatur	220 °C
Starttemperatur	100 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	20 °C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Scanrate	500
Scan	<i>m/z</i> 50 – 300

## 3.5.5.2 Gaschromatograph 6890 N gekoppelt mit Massenspektrometer 5975

Trägergas	Helium 5.0
Fluss	1,1 ml/min
Temperatur der Transferline	250 °C
Temperatur der Ionenquelle	230 °C
Ionisierungsenergie	70 eV

## Methoden:

„Fettsäure 3“

Kapillarsäulen	VF-5MS, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Split; Splitratio 10:1
Injektortemperatur	250 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	100 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	30 °C/Minute auf 190 °C
Temperaturgradient 2	8 °C/Minute auf 250 °C
Temperaturgradient 3	20 °C/Minute auf 280 °C, 10 Minuten
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Solvent delay	8 Minuten
Scanrate	2,62/Minute
Scan	<i>m/z</i> 40 – 600

„Terpene 4“

Kapillarsäulen	ZB-WAX, 60 m, Filmdicke 0,25 µm, PEG
Modus	Split; Splitratio 10:1
Injektortemperatur	250 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	40 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient	10 °C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 5 Minuten
Solvent delay	8 Minuten
Scanrate	2,62/Minute
Scan	<i>m/z</i> 40 – 600

„Terpene 5“

Kapillarsäule	ZB-WAX, 60 m, Filmdicke 0,25 µm, PEG
Modus	Split; Splitratio 10:1
Injektortemperatur	250 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	40 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	3 °C/Minute auf 100 °C
Temperaturgradient 2	40°C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 10 Minuten
Solvent delay	8 Minuten
Scanrate	2,62/Minute
Scan	<i>m/z</i> 40 – 600

„Terpene 6“

Kapillarsäule	VF-5MS, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, 5% Diphenyl, 95% Dimethyl Polysiloxan
Modus	Split; Splitratio 10:1
Injektortemperatur	250 °C
Injektionsvolumen	2 µl
Starttemperatur	60 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient 1	5 °C/Minute auf 185 °C
Temperaturgradient 2	40°C/Minute auf 280 °C
Postrun	280 °C, 10 Minuten
Solvent delay	8 Minuten
Scanrate	2,62/Minute
Scan	<i>m/z</i> 40 – 600

### 3.5.5.3 Gaschromatograph Hewlett Packard HP 5890 Series II gekoppelt mit Sektorfeld-Massenspektrometer MAT 95S

Um das Molekulargewicht unbekannter Oxidationsprodukte herauszufinden, wurde eine GC-MS-Messung mit chemischer Ionisation durchgeführt. Für die Trennung wurde eine DB-5-Kapillarsäule, 30 m, Filmdicke 0,25 µm, 5 % Diphenyl, 95 % Dimethyl Polysiloxan, verwendet.

Trägergas	Helium
Injektortemperatur	„cold-on-column“
Injektionsvolumen	0,5 µl
Starttemperatur	35 °C, 2 Minuten
Temperaturgradient 1	5 °C/Minute auf 185 °C
Temperaturgradient 2	15 °C/Minute auf 250 °C, 10 Minuten
Temperatur der Ionenquelle	200 °C
Reaktantgas	Isobutan
Ionisierungsenergie	70 eV
Auflösungsvermögen	1000

### 3.5.6 GC-FID

Für die Trennung enantiomerer Limonenepoxide wurde der Gaschromatograph 450-GC mit einer chiralen Kapillarsäule verwendet; die stationäre Phase der Säule bestand aus Octakis-(2,3-di-O-butyryl-6-O-tert-butyldimethylsilyl)- $\gamma$ -cyclodextrin gelöst in SE 52, 30 m x 0,25 mm (Kapitel 3.1.5). Die Messungen wurden an der Universität Bonn im Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften bei Prof. Dr. M. Wüst durchgeführt.

Trägergas	Wasserstoff
Fluss	1 ml/min
Starttemperatur	40 °C, 5 Minuten
Temperaturgradient	1,5 °C/Minute auf 210 °C, 5 Minuten
Detektor	Flammenionisationsdetektor, 280 °C
Verbrennungsgas	synthetische Luft (300 ml/min) und Wasserstoff (30 ml/min)
MakeUp Gas	Stickstoff (25 ml/min)

### 3.5.7 NMR-Spektroskopie

Die gereinigten Oxidationsprodukte (Kapitel 3.5.2) wurden langsam bei Raumtemperatur getrocknet, um Reste des Fließmittels zu entfernen. Der Rückstand wurde in je 1 ml deuteriertem Chloroform gelöst und erneut bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in etwa 200 µl deuteriertem Chloroform (+ 0,03 % (v/v) Tetramethylsilan) gelöst und in NMR-Röhrchen bis zu einer Füllhöhe von 4 cm gefüllt. Die

Messung wurde mit dem Kernspinresonanz-Spektrometer Avance-III-500, Bruker, durchgeführt, welcher freundlicherweise vom Arbeitskreis Prof. Dr. T. Hofmann zur Verfügung gestellt wurde. Die Messtemperatur lag bei 27 °C. Für die Aufnahme des  $^1\text{H}$ -Spektrums wurde eine Frequenz von 500 MHz, für die des  $^{13}\text{C}$ -Spektrums eine Frequenz von 125 MHz eingestellt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit MestReNova (<http://mestrelab.com>).



## 4 Ergebnisse

Die Peroxygenase (PXG) ist ein Enzym des Lipxygenase-Stoffwechsels in Pflanzen. Sie katalysiert den Sauerstofftransfer von einem Fettsäurehydroperoxid auf eine *cis*-Kohlenstoffdoppelbindung innerhalb des Fettsäurehydroperoxids oder eines zweiten Fettsäuremoleküls. Das Oxidationsprodukt ist ein Epoxid (Blée 1998a). In biotechnologischen Forschungen wurde die Epoxidierung von Fettsäuren mit einer isolierten Peroxygenase aus *A. sativa* untersucht, um verschiedene Fettsäureepoxide für technische Anwendungen zu produzieren (Piazza et al. 2000, 2003). Statt der Isolation der Peroxygenase aus Pflanzen sollte in dieser Arbeit eine Peroxygenase aus *Solanum lycopersicum* auf rekombinanten Weg hergestellt werden, um von Pflanzenmaterial unabhängig Fettsäuren epoxidieren zu können. Die Peroxygenase sollte für eine mögliche biotechnologische Anwendung biochemisch charakterisiert werden.

### 4.1 Heterologe Expression der Peroxygenase in *S. cerevisiae*

#### 4.1.1 Klonierung und Transformation

Für die Charakterisierung der SIPXG wurde eine heterologe Expression des Proteins in *S. cerevisiae* vorgenommen. Aus 3 Wochen alten Tomatenpflanzen (*S. lycopersicum*, Ökotyp *Elba*, Buschtomate) wurde die RNA isoliert und durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (Kapitel 3.3.1 und 3.3.5). Die cDNA diente als Vorlage für eine PCR zur Amplifizierung des DNA-Abschnitts, der die SIPXG kodiert. Das offene Leseraster (ORF) der *SIPXG* wurde von der Unigene-ID SGN-U567002 abgeleitet und stammte von <http://solgenomics.net/index/pl>. Für eine Synthese des kompletten Gens mit dem Oligonukleotidpaar SIPXG\_f und SIPXG\_r konnte jedoch kein PCR-Produkt mit einer erwarteten Basenpaarlänge von 764 nachgewiesen werden. Stattdessen wurde das Gen in zwei Fragmenten (5'- und 3'-Fragment mit 568 bzw. 341 Basenpaare) getrennt voneinander vervielfältigt (Kapitel 3.3.7). Die Fragmente wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel extrahiert (Kapitel 3.3.9 und 3.3.10). Das 5'-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen BamH I und Hind III, das 3'-Fragment mit Hind III und Xho I geschnitten. Beide geschnittenen Fragmente wurden an den spezifischen Hind III-Enden zum vollständigen Peroxygenase-Gen miteinander ligiert (Abbildung 4.1).

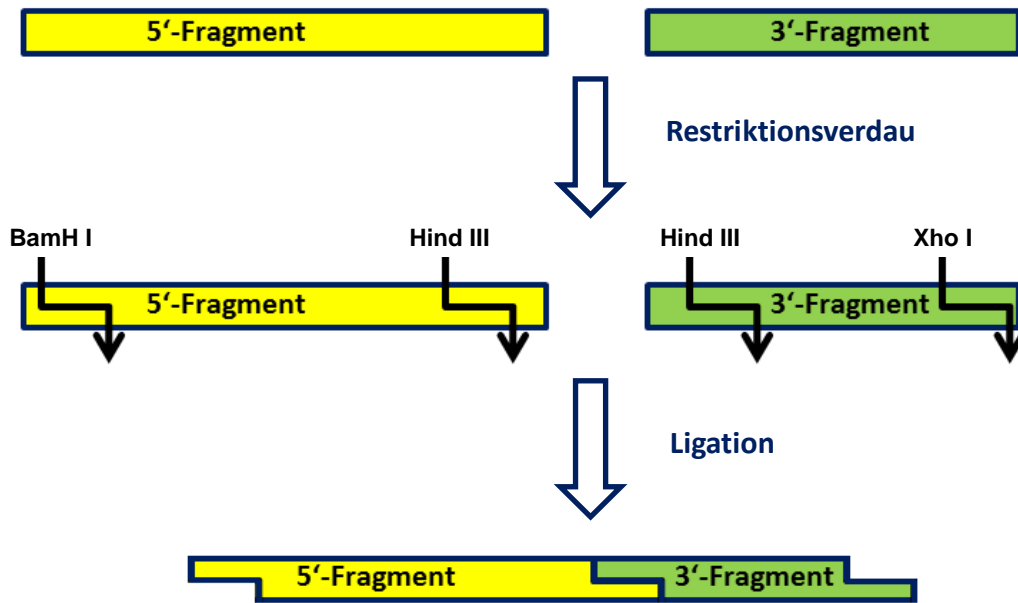


Abbildung 4.1 Schema zur schrittweisen Klonierung der *SIPXG*.

Als Plasmid zur Überexpression der *SIPXG* in *S. cerevisiae* wurde pYES2 gewählt. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen BamH I und Xho I in der *multiple cloning site* geschnitten und durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Das *SIPXG*-Fragment wurde an den spezifischen BamH I- und Xho I-Enden in das geschnittene Plasmid ligiert (Kapitel 3.3.13; Abbildung 4.2).

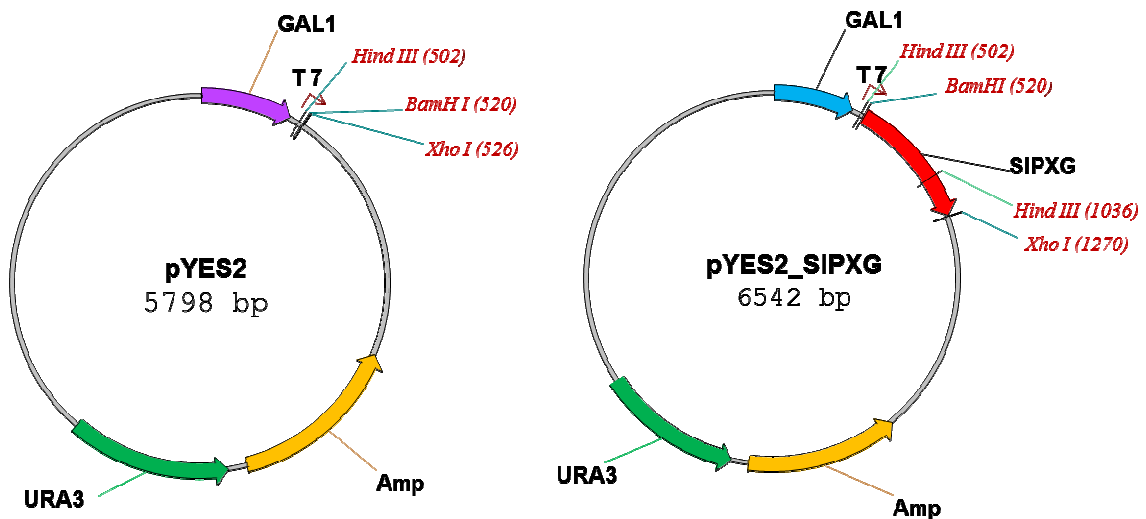


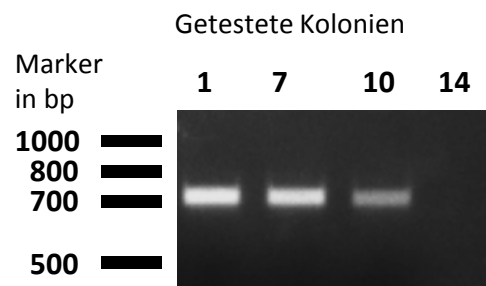
Abbildung 4.2 Hefeexpressionsplasmide pYES2 und pYES2\_SIPXG. pYES2 ohne Insert diente als Leervektorkontrolle, pYES2\_SIPXG enthielt *PXG* aus *Solanum lycopersicum*. Weitere Komponenten: Ampicillin-Resistenz-Gen (Amp), Galaktose induzierbarer Promotor (GAL1), T7-Promotor (T7), Orotidin-5-Phosphat-Decarboxylase-Gen (URA3).

Um sowohl pYES2 als auch pYES2\_SIPXG zu vervielfältigen, wurden chemisch kompetente *E. coli* (Kapitel 3.2.1) mit je einem Ligationsansatz transformiert. Auf Grund der Ampicillin-Resistenz auf dem pYES2-Plamid konnten die transformierten Zellen auf Ampicillin-Platten selektiert werden (Kapitel 3.3.14). Der Erfolg der Transformation wurde durch eine Kolonie-PCR mit dem Oligonukleotidpaar SIPXG\_f und SIPXG\_mr zur Vervielfältigung des 5'-Fragmentes (568 bp) bewiesen (Kapitel 3.3.8). 4 der 14 untersuchten Kolonien enthielten das pYES2\_SIPXG Konstrukt (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3** Kolonie-PCR mit Kolonien von *E. coli* transformiert mit pYES2\_SIPXG. Das Oligonukleotidpaar SIPXG\_f und SIPXG\_mr wurde zur Vervielfältigung des 5'-Fragments (568 bp) der *SIPXG* verwendet.

Die Plasmide der Kolonien 1, 7, 10 und 14 (Abbildung 4.3) wurden isoliert (Kapitel 3.3.11) und einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen (Kapitel 3.3.12). Das erwartete Fragment des Verdau mit BamH I und Xho I hatte eine Größe von 756 bp. Bis auf Kolonie 14 enthielten alle Kolonien das pYES2\_SIPXG-Plasmid (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4** Analytischer Restriktionsverdau der Plasmide pYES2\_SIPXG mit BamH I und Xho I. Erwartet wurde ein Fragment mit einer Größe von 756 bp.

Die Sequenzierung des isolierten Plasmids pYES2\_SIPXG mit der Nummer 1 bestätigte die Richtigkeit des SIPXG kodierenden Abschnitts (Kapitel 3.3.16).

Im Anschluss wurden chemisch kompetente *S. cerevisiae* INVSc1 Zellen (Kapitel 3.1.7.1) mit pYES2 oder pYES2\_SIPXG transformiert. Der Hefestamm INVSc1 ist eine Mangelmutante

in Bezug auf Uracil. Das pYES2-Plasmid enthält ein Gen für die Uracilbiosynthese (Orotidin-5-Phosphat-Decarboxylase-Gen, URA3) und ermöglichte die Selektion transformierter Hefezellen auf Uracilmangelmedium (Kapitel 3.2.2 und 3.3.15); die Transformation wurde mit einer Kolonie-PCR bestätigt (Kapitel 3.3.8).

#### 4.1.2 Analyse der Proteinsequenz

Für die Analyse der Proteinsequenz wurde das ORF der *SIPXG* mittels Vector NTI Ver. 9.0 (invitrogen) in die Primärstruktur der *SIPXG* translatiert (Abbildung 4.5).

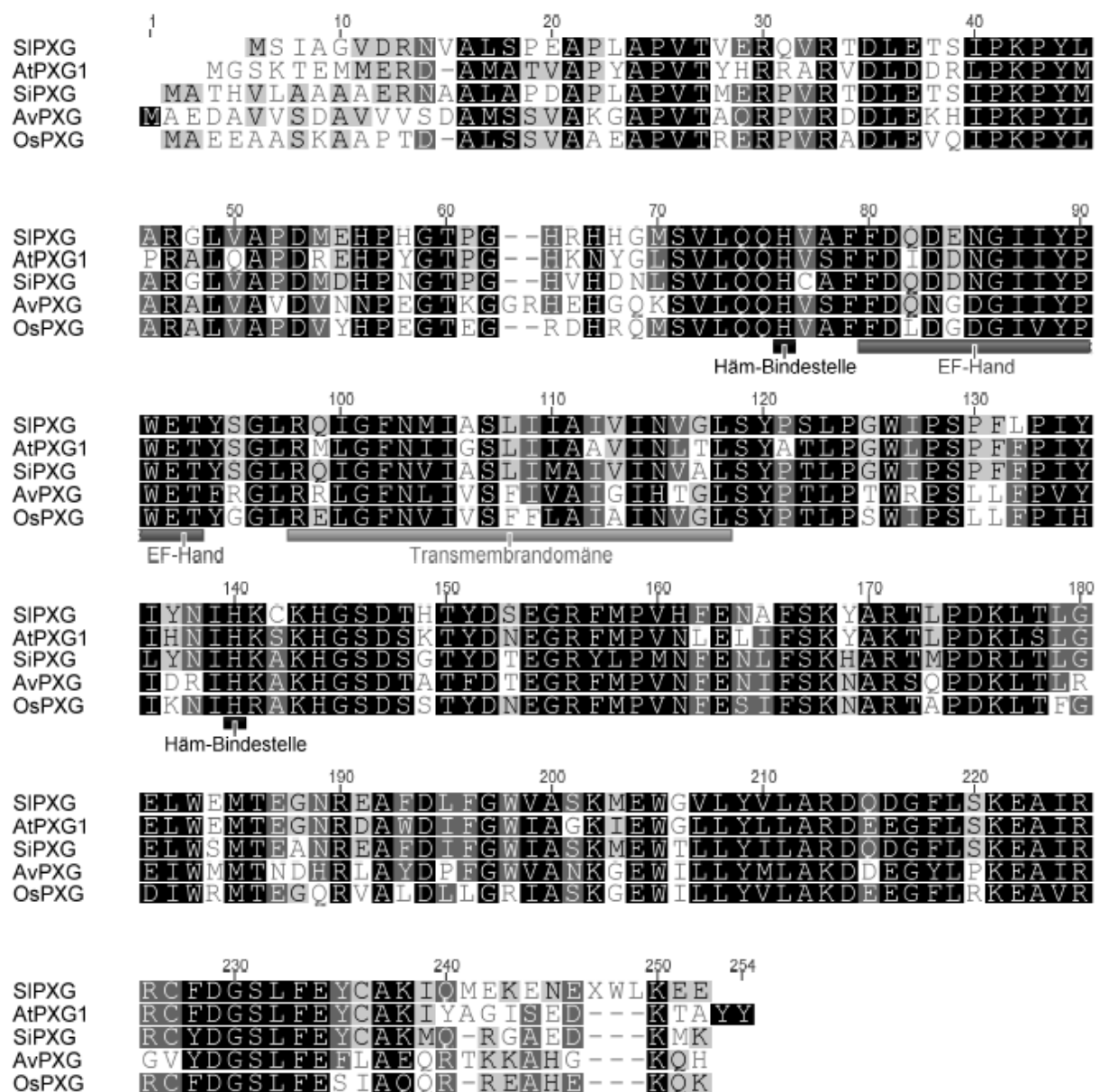
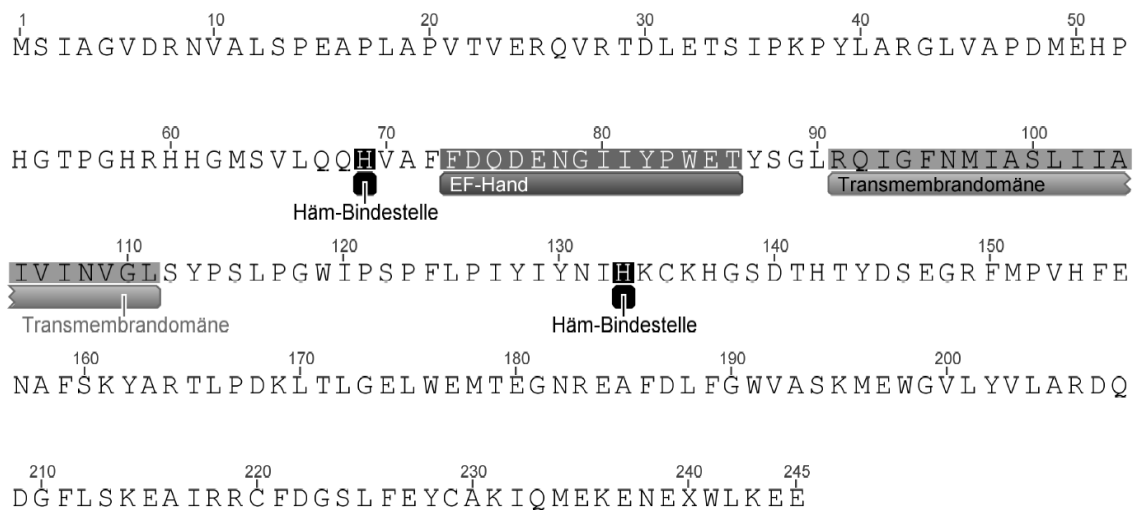


Abbildung 4.5 Vergleich der Proteinsequenz der *SIPXG* mit den Sequenzen der *PXGs* aus *Arabidopsis thaliana*, *Sesamum indicum*, *Avena sativa* und *Oryza sativa*. Hinterlegung in schwarz bedeutet 100 %, in dunkelgrau 80-100 %, in hellgrau 60-80 %, in weiß <60 % identisch.

Die SIPXG hat eine Länge von 245 Aminosäuren, ein Molekulargewicht von 27,9 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 7,87. Ihre Primärstruktur wurde mit PXGs aus *Arabidopsis thaliana*, *Sesamum indicum*, *Avena sativa* und *Oryza sativa* mittels geneious Pro 5.3.4 verglichen. Die SIPXG besitzt mit der PXG aus *S. indicum* (SiPXG) eine Übereinstimmungen von 77,6 %, mit der PXG1 aus *A. thaliana* (AtPXG1) von 67,2 %, mit der PXG aus *O. sativa* (OsPXG) eine von 62,5 % und mit der PXG aus *A. sativa* (AvPXG) eine von 58,3 %. Innerhalb der Sequenzen der verglichenen PXGs liegen viele konservierte Bereiche vor (Abbildung 4.5). Zu nennen sind ein EF-Hand-Motiv mit 14 Aminosäuren in der vorderen Hälfte des Proteins, welches für die Bindung von Calciumionen verantwortlich ist. Ein hoher Anteil hydrophober Aminosäuren mit 21 Aminosäuren hat die Funktion einer Transmembrandomäne und befindet sich in der Mitte des Proteins. Außerdem sind viele der Histidinreste konserviert, wovon zwei das Hämmolekül im aktiven Zentrum des Enzyms binden. In der SIPXG-Sequenz (Abbildung 4.6) erstreckt sich vom Phenylalanin der Position 73 bis zum Threonin der Position 86 das EF-Hand-Motiv. Eine Transmembrandomäne befindet sich zwischen dem Arginin bei Position 91 und dem Leusin bei Position 111. Die Histidinreste 69 und 133 sind potentiell an der Bindung des Hämmoleküls beteiligt.



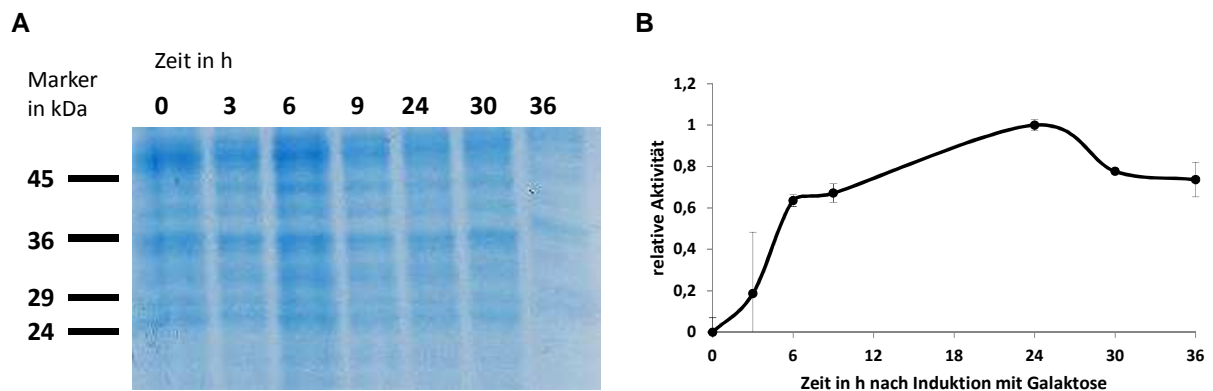
**Abbildung 4.6 Primärstruktur der SIPXG.** Markiert sind zwei Histidinresten zur möglichen Bindung des Hämmoleküls sowie ein EF-Handmotiv und eine Transmembrandomäne.

### 4.1.3 Proteinexpression

Das Vorhandensein eines Galaktose induzierbaren Promotors (GAL1) innerhalb des pYES2-Plasmids ermöglichte die gezielte Transkription der SIPXG in Anwesenheit von Galaktose.

Nach Überführung der Hefezellen in Galaktose haltiges SC-U-Medium wurde die Expression der SIPXG nach 0, 3, 6, 9, 24, 30 und 36 Stunden untersucht (Kapitel 3.4.5). Zu jedem dieser Zeitpunkte wurde ein Aliquot von 5 ml entnommen, ein Proteinrohextrakt daraus hergestellt und eine SDS-PAGE durchgeführt (Kapitel 3.4.5.1; Abbildung 4.7 A).

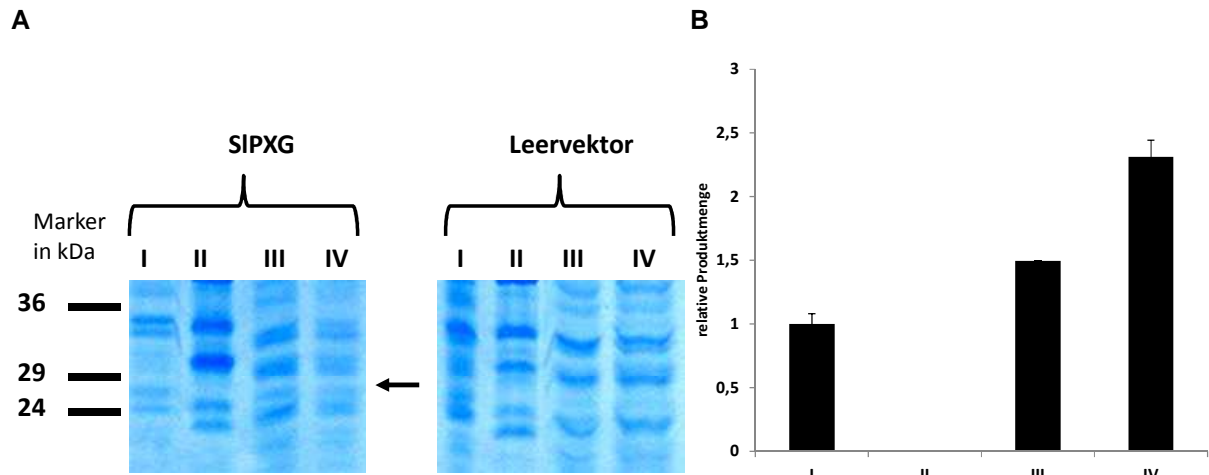
Die SIPXG hat ein Molekulargewicht von etwa 28 kDa. Da im Polyacrylamidgel keine deutliche neue Proteinbande im Verlauf der Zeit zu beobachten war, wurde zusätzlich die Aktivität der SIPXG in den jeweiligen Proteinrohextrakten gemessen. Hierbei wurde die Umsetzung von 9-HPOD (9-Hydroperoxy-10 (E), 12(Z)-octadecadiensäure) zu 12,13-EHOD (12,13-Epoxy-9-hydroxy-10(E)-octadecensäure) untersucht (Kapitel 3.4.5.2). Da das Substrat 9-HPOD eine konjugierte Doppelbindung im Gegensatz zum Produkt 12,13-EHOD besitzt, konnte die Abnahme der 9-HPOD-Konzentration mittels UV-Detektor bei 235 nm quantifiziert und daraus die Aktivität berechnet werden. Anhand dieses Enzymtests zeigte sich, dass 24 Stunden nach Induktion mit Galaktose die höchste Aktivität und basierend darauf vermutlich die größte Proteinexpression vorlag (Abbildung 4.7 B).



**Abbildung 4.7 Heterologe Expression der SIPXG in *S. cerevisiae* (28 kDa) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion mit Galaktose. A:** SDS-PAGE des Proteinrohextraktes, oben: Zeitangaben in Stunden, links: Proteinmarker in kDa. **B:** Aktivität der SIPXG, gemessen am Umsatz von 9-HPOD.

#### 4.1.4 Mikrosomenisolation

Die Peroxygenase ist ein Membranprotein des ERs. Eine Trennung dieses Zellorganells von restlichen Zellbestandteilen ermöglichte eine einfache Reinigung des exprimierten Proteins. Das endoplasmatische Retikulum zerfällt bei der Herstellung des Proteinrohextraktes zu kleineren Vesikeln, den Mikrosomen. Diese wurden aus dem Proteinrohextrakt durch eine Fällung mit Polyethylenglykol (PEG) isoliert (Kapitel 3.4.2). Die verschiedenen Isolationsschritte wurden mittels SDS-PAGE und Aktivitätsmessung untersucht (Abbildung 4.8).



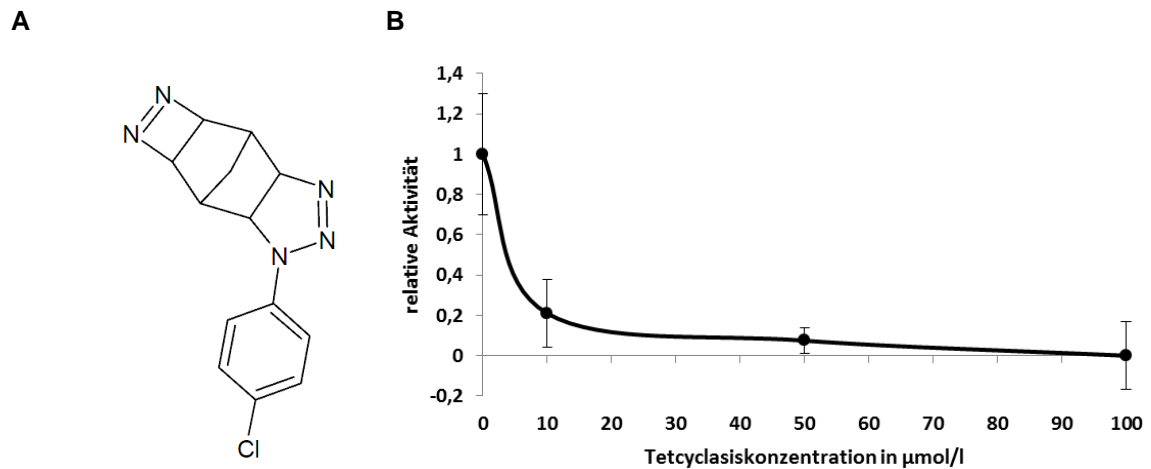
**Abbildung 4.8** Isolation von Mikrosomen aus Hefezellen mit überexprimierter SIPXG: Proteinrohextrakt (I), Überstand der PEG-Fällung (II), Pellet der PEG-Fällung (III) und Homogenisat des Pellets (IV). **A** SDS-PAGE einzelner Isolationsschritte der Proteine aus Hefezellen mit überexprimierter SIPXG (links) und Leervektorkontrolle (rechts), Proteinmarker in kDa. Molekulargewicht der SIPXG: ca. 28 kDa, **B** Aktivitätstest der Isolationsschritte aus Hefezellen mit überexprimierter SIPXG; untersucht wurde die Oxidation von Ölsäure zu 9,10-Epoxy-octadecansäure. Das Produkt wurde mittels GC-MS gemessen.

Im Polyacrylamidgel waren im Proteinrohextrakt (I) sowie im Überstand nach der PEG-Fällung (II) keine SIPXG bei 28 kDa erkennbar. Eine Mikrosomenisolation aus Hefezellen der Leervektorkontrolle schlossen aus, dass es sich beim Protein bei 28 kDa im Rohextrakt um die SIPXG handeln könnte. Im Gegensatz zu den ersten beiden Isolationsschritten zeigten das Pellet der PEG-Fällung und das Homogenisat eine deutliche Proteinbande bei 28 kDa (Pfeil), die in der Leervektorkontrolle nicht auftauchte. Das Vorhandensein der SIPXG im Polyacrylamidgel spiegelte sich auch in den Aktivitätsmessungen wieder. Im Überstand der PEG-Fällung war keine Aktivität messbar, im Pellet der PEG-Fällung dagegen war sie um den Faktor 1,5 größer als im Proteinrohextrakt. Die Homogenisierung steigerte zusätzlich die Aktivität der SIPXG um den Faktor 2,3 im Vergleich zum Rohextrakt.

#### 4.1.5 Einfluss von Tetcyclacis auf die Enzymaktivität

Tetcyclacis ist ein Oxygenase-Inhibitor, der durch Hemmung von Enzymen der Gibberillinsäurebiosynthese als pflanzlicher Wachstumsregulator Verwendung findet (Rademacher et al. 1987). Durch Bindung an Häm-Moleküle innerhalb von Oxygenasen hemmt Tetcyclacis deren Aktivität. Da die Peroxygenase auch ein Häm-Molekül als prosthetische Gruppe besitzt, wurde der Einfluss von Tetcyclacis auf die Aktivität der Peroxygenase untersucht. Das Enzym wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Tetcyclacis für 60 Minuten vorinkubiert. Im Anschluss wurde das Substrat 9-HPOD

zugegeben und dessen Umwandlung zu 12,13-EHOD bestimmt (Kapitel 3.4.6, Abbildung 4.9).



**Abbildung 4.9 Hemmung der SIPXG durch Tetcyclacis.** **A** Strukturformel von Tetcyclacis, **B** Aktivität der SIPXG bei verschiedenen Tetcyclacis-Konzentrationen. Das Enzym wurde 60 Minuten mit Tetcyclacis vorinkubiert, im Anschluss fand eine Umsetzung von 9-HPOD zu 12,13-EHOD statt. Die Quantifizierung des nicht umgesetzten 9-HPOD erfolgte mittels HPLC-UV.

Die Abnahme der Aktivität und somit eine Hemmung des Enzyms durch Tetcyclacis war deutlich erkennbar. Bei einer Inhibitor-Konzentration von 10 µmol/l lagen nur noch 0,2 der ursprünglichen Aktivität vor, bei 50 µmol/l waren es 0,07, bei Konzentrationen über 100 µmol/l Tetcyclacis ging die Aktivität gegen Null. Der  $IC_{50}$  lag bei 2,6 µmol/l Tetcyclacis.

## 4.2 Epoxidierung von Fettsäuren

Die biologische Aufgabe der PXG liegt in der Epoxidierung von Fettsäuren für die Synthese von Cutinmonomeren und Oxylipinen (Blée 1998b). Die Epoxidierung ist hierbei nicht auf eine bestimmte Fettsäure beschränkt, sondern kann bei einer Vielzahl von Fettsäuren und deren Derivaten stattfinden (Piazza et al. 2003). In diesem Teil der Arbeit wurde nicht nur nach weiteren, möglichen Substraten für eine Epoxidierung gesucht, sondern auch grundlegende, biochemische Eigenschaften des Enzyms ermittelt.

### 4.2.1 Effekte von pH-Wert und Lösungsmittel auf die Extraktion

Um die Extraktion epoxidierter Fettsäuren aus wässriger Lösung zu verbessern, wurde sowohl der Einfluss einer Erniedrigung des pH-Wertes als auch der Einsatz verschiedener



Lösungsmittel untersucht. Stellvertretend für andere Fettsäuren wurde 9-HPOD verwendet, weil es eine ähnliche Polarität wie ein Fettsäureepoxid besitzt (Kapitel 3.4.7). Durch Absenkung des pH-Werts auf 2,5 wurde die Carboxylgruppe des 9-HPOD protoniert. Diese Protonierung verbesserte die Löslichkeit in der organischen Phase ausschließlich bei der Extraktion mit Essigsäureethylester. Bei der Verwendung einer Mischung aus Chloroform und Methanol (2:1) oder bei der Verwendung von Diethylether war die Extraktion nach Ansäuerung niedriger, bei Dichlormethan zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zur nicht angesäuerten Lösung (Anhang Abbildung 7.1).

Der Vergleich der Lösungsmittel untereinander zeigte, dass mit Dichlormethan eine Extraktion von 9-HPOD aus wässriger Lösung am effektivsten war. Sie betrug 62 % sowohl für pH 6 als auch pH 2,5. Die Extraktion mit Diethylether lag bei 58 % für pH 6 und 41 % für pH 2,5. Die beiden anderen Lösungsmittel ergaben Ausbeuten unterhalb von 40 %.

Für andere Fettsäuren und Derivate wurde ein ähnliches Extraktionsverhalten vermutet. Bei weiteren Versuchen wurde deshalb der pH-Wert von 6 im Reaktionspuffer beibehalten und als Extraktionsmittel Dichlormethan verwendet.

#### 4.2.2 pH-und Temperatur-Optima

Die Epoxidierung von Ölsäure durch die SIPXG bei verschiedenen pH-Werten zeigte ein breites Optimum des Enzyms bei pH 6. Das Temperaturmaximum der PXG lag bei 40 °C (Abbildung 4.10). Bei den nachfolgenden Experimenten wurden ein pH-Wert von 6 und eine Temperatur von 40 °C während der Enzymreaktion verwendet.

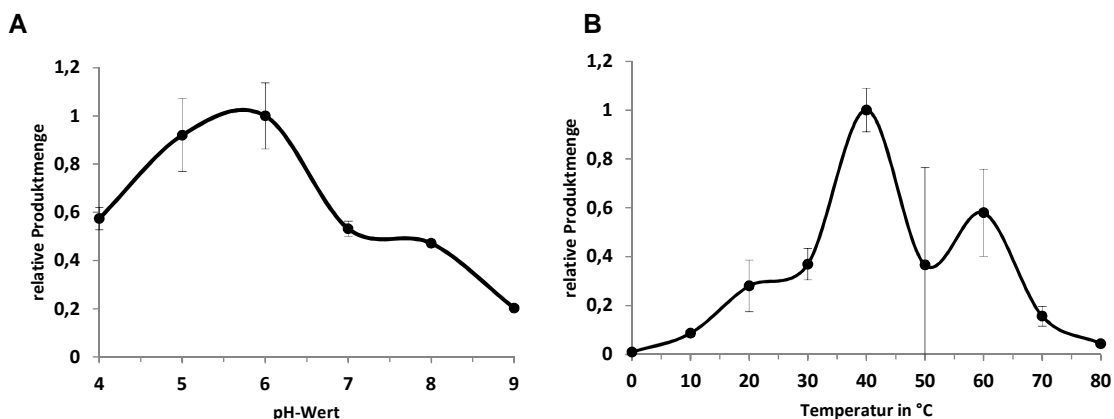
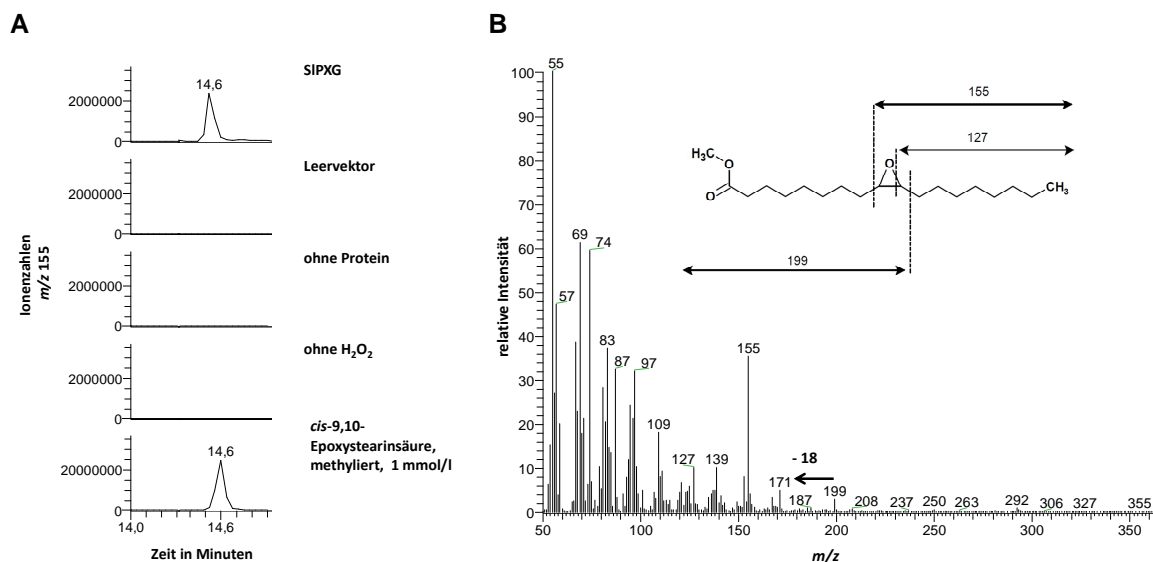


Abbildung 4.10 Aktivitätsoptima der SIPXG für die Oxidation von Ölsäure. Das Oxidationsprodukt 9,10-Epoxy-octadecansäure wurde mittels GC-MS gemessen. A pH-Kurve, B Temperaturkurve.

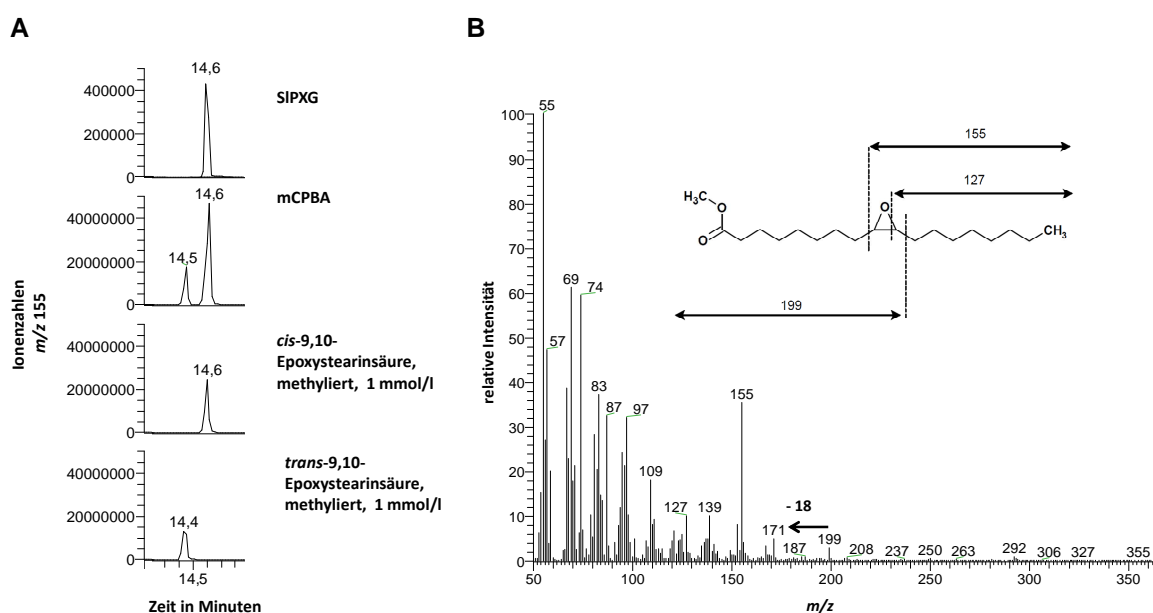
### 4.2.3 Substratscreening

Verschiedene Fettsäuren und Fettsäurederivate wurden auf Oxidation durch SIPXG untersucht; als Oxidationsmittel diente Wasserstoffperoxid. Um auszuschließen, dass andere mikrosomale Proteine eine oxidierende Wirkung haben, wurde eine Kontrollreaktion mit Proteinen ohne überexprimierte SIPXG (Leervektorkontrolle) durchgeführt. Zusätzlich dazu wurden Kontrollversuche ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid unternommen, um eine rein chemische Oxidation bzw. eine Beteiligung anderer Oxidationsmittel auszuklammern. Die Analyse der Oxidationsprodukte der SIPXG fand mit Ausnahme der Proben mit Oleylalkohol ausschließlich durch GC-MS statt; die Proben mit Oleylalkohol wurden mittels LC-MS gemessen (Kapitel 3.4.10.1). Mit Ausnahme des Erucasäuremethylesters wurden alle untersuchten Fettsäuren und Fettsäurederivate durch die SIPXG oxidiert. Die jeweiligen Oxidationsprodukte traten in den Kontrollversuchen nicht auf. Das Oxidationsprodukt der Ölsäure, welches im Anschluss an die Enzymreaktion methyliert wurde, sowie das Oxidationsprodukt des Ölsäuremethylesters waren identisch in Bezug auf Retentionszeit und Massenspektrum mit der methylierten Referenzsubstanz *cis*-9,10-Epoxy-octadecansäure (Abbildung 4.11). Folglich wurde Ölsäure durch die SIPXG zu 9,10-Epoxy-octadecansäure epoxidiert; die Carboxylgruppe wurde erst nach der Enzymreaktion methyliert (Abbildung 4.13). Ölsäuremethylester wurde durch die SIPXG zu 9,10-Epoxy-octadecansäure methylester epoxidiert (Abbildung 4.13).

9,10-Epoxy-octadecansäure und 9,10-Epoxy-octadecansäuremethylester entstanden auch durch chemische Oxidation von Ölsäure bzw. Ölsäuremethylester mit mCPBS (Kapitel 3.4.16; Abbildung 4.12). Durch die Oxidation mit mCPBS entstand zusätzlich das *trans*-Isomer der 9,10-Epoxy-octadecansäure bzw. des 9,10-Epoxy-octadecansäuremethylesters, welches durch Vergleich mit einer Referenzsubstanz identifiziert werden konnte. *cis*- und *trans*-Isomer der chemischen Epoxidierung standen im Verhältnis 3,2 : 1.



**Abbildung 4.11** Epoxidierung von Ölsäure und Ölsäuremethylester durch SIPXG. Das Epoxid der freien Säure wurde nach der Reaktion methyliert und die Produkte beider Substrate mittels GC-MS analysiert. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum bei 14,6 Minuten.



**Abbildung 4.12** Enzymatische und chemische Oxidation von Ölsäure und Ölsäuremethylester. Die enzymatische Oxidation fand mittels SIPXG, die chemische mit *m*-Chlorperbenzoesäure (mCPBS) statt. Das Epoxid der freien Säure wurde nach der Reaktion methyliert und die Produkte beider Substrate mittels GC-MS analysiert. **A** GC-Chromatogramme, **B** Massenspektren der Produkte von SIPXG und mCPBS sowie beider Referenzsubstanzen.



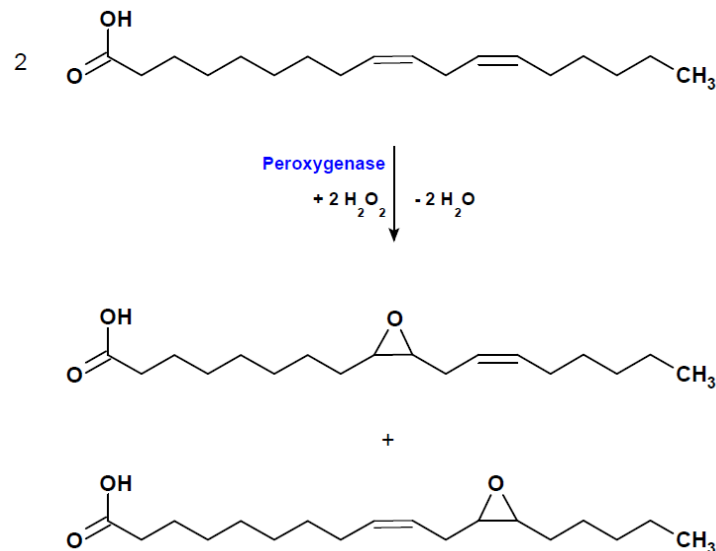


Abbildung 4.14 Epoxidierung von Linolsäure zu 9,10-Epoxy-12-octadecensäure und 12,13-Epoxy-9-octadecensäure durch SIPXG.

Die konjugierte (10 *trans*, 12 *cis*) Linolsäure wurde durch SIPXG zu einem Produkt oxidiert, welches mit dem chemisch synthetisierten Oxidationsprodukt in Retentionszeit und Massenspektrum identisch ist (Anhang Abbildung 7.5 und Abbildung 7.25). Da PXG bevorzugt *cis*-Doppelbindungen epoxidiert (Blée und Schuber 1990), wurde höchstwahrscheinlich die 12,13-Position angegriffen. Diese Vermutung wird auch durch das Fragmentierungsmuster gestützt, mit dessen Hilfe die Struktur des Epoxids nachvollzogen werden konnte (Anhang Abbildung 7.5). Das Oxidationsprodukt ist demnach 12,13-Epoxy-10-octadecensäure (Abbildung 4.15). Durch die Oxidation mit mCPBS entstand außerdem ein weiteres Produkt mit unterschiedlichem Massenspektrum (Anhang Abbildung 7.25). Anhand des Fragmentierungsmusters dürfte es sich hierbei um das 10,11-Epoxid handeln.

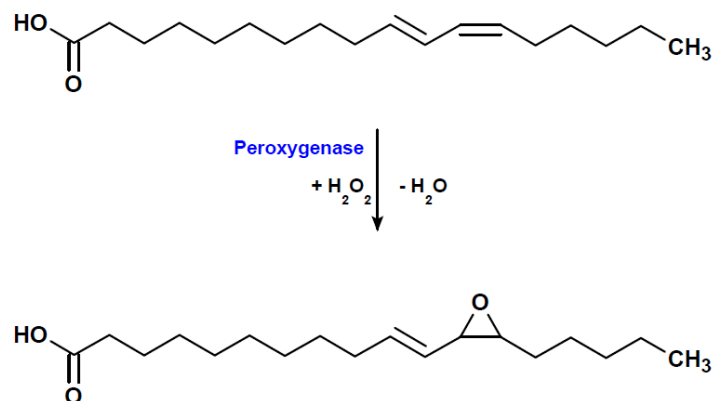


Abbildung 4.15 Epoxidierung von konjugierter (10 *trans*, 12 *cis*) Linolsäure zu 12,13-Epoxy-10-octadecensäure durch SIPXG.

Bei der Oxidation von  $\alpha$ -Linolensäure mittels SIPXG entstanden ein Hauptprodukt und zwei Nebenprodukte (Anhang Abbildung 7.6). Die chemische Oxidation lieferte ebenso das Hauptprodukt und eines der Nebenprodukte (Anhang Abbildung 7.26). Der Vergleich der Massenspektren mit Literaturdaten und der Datenbank führte jedoch bei keinem der Produkte zu einem plausiblen Ergebnis. Die Identifizierung des Hauptproduktes erfolgte deswegen mittels NMR (Kapitel 4.2.4).

Eicosensäure wurde durch die SIPXG in ein Oxidationsprodukt überführt (Anhang Abbildung 7.7). Das Oxid mit gleicher Retentionszeit und Massenspektrum entstand auch bei der Oxidation mit mCPBS (Anhang Abbildung 7.27). Da Eicosensäure nur eine Doppelbindung für eine Epoxidierung besitzt, handelt es sich bei dem Produkt vermutlich um das Monoepoxid 11,12-Epoxy-dodecansäure (Abbildung 4.16), was auch durch die Auswertung des Fragmentierungsmusters bestätigt wird. So ist das Fragment-Ion  $m/z$  155 ein prominentes Ion sowohl im Massenspektrum des Methylesters der 9,10-Epoxy-octadecansäure (9,10-Epoxy-stearinsäure) als auch der 11,12-Epoxy-dodecansäure und entsteht vermutlich durch die Spaltung der Bindung zwischen C8/C9 bzw. C10/C11. Wohingegen sich die Massen der Fragmente, welche durch die Spaltung an der entgegengesetzten Seite des Epoxidrings entstehen, um 28 Masseneinheiten und somit zwei  $\text{CH}_2$ -Gruppen des Alkanrestes unterscheiden ( $m/z$  199 im Massenspektrum des Methylesters der 9,10-Epoxy-octadecansäure und  $m/z$  227 beim entsprechenden Derivat der 11,12-Epoxy-dodecansäure). Durch die Oxidation mit mCPBS entstand außerdem ein weiteres Produkt mit gleichem Massenspektrum, jedoch kürzerer Retentionszeit. Dies kann ein *trans*-Isomer der 11,12-Epoxy-dodecansäure sein, welches wie im Falle der 9,10-Epoxy-octadecansäure vor dem *cis*-Isomer eluiert.

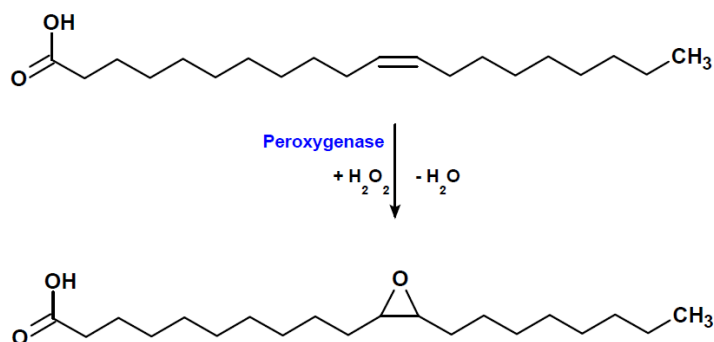


Abbildung 4.16 Epoxidierung von Eicosensäure zu 11,12-Epoxy-dodecansäure durch die SIPXG.

#### 4.2.4 Identifizierung unbekannter Oxidationsprodukte der $\alpha$ -Linolensäure durch NMR-Spektroskopie

Da die Oxidationsprodukte der  $\alpha$ -Linolensäure mittels Massenspektrometrie nicht eindeutig identifiziert werden konnten, wurden die Produkte in Mengen von einigen Milligramm enzymatisch synthetisiert (Kapitel 3.4.15). Während der vierstündigen Reaktion konnte mittels GC-MS die Zunahme des Hauptprodukts als auch eines Nebenprodukts beobachtet werden (Anhang Abbildung 7.2). Nach etwa drei Stunden war ein Plateau erreicht und keine weiteren Oxidationsprodukte wurden gebildet, obwohl das Substrat  $\alpha$ -Linolensäure erst zur Hälfte umgesetzt war. Das zweite Nebenprodukt lag während der gesamten Synthese in fast nicht detektierbaren, gleichbleibenden Mengen vor.

Nach vier Stunden wurde der komplette Reaktionsansatz mit Dichlormethan extrahiert, der Extrakt getrocknet, eingeengt, mit Trimethylsilyldiazomethan methyliert und säulenchromatographisch getrennt (Kapitel 3.5.1 und 3.5.2). Das Substrat und das gereinigte Produkt wurden NMR-spektroskopisch untersucht (Kapitel 3.5.7). Die Signale der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren konnten den Kohlenstoffatomen von Substrat und Produkt eindeutig zugewiesen werden. Mit Ausnahme der Signale der Kohlenstoffatome 15 und 16 stimmten beide Spektren überein. Hier wurde eine starke Hochfeldverschiebung der Signale von 127,1 nach 58,3 ppm bzw. von 131,8 nach 56,3 ppm beobachtet (Tabelle 4.1, Anhang Abbildung 7.28 und Abbildung 7.29). Auch die Signale der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Substrat und Produkt konnten den jeweiligen Wasserstoffatomen zugeordnet werden. Eine Abweichung der Signale beider Spektren lag ausschließlich bei den Wasserstoffatomen vor, die an die Kohlenstoffatome 15 und 16 gebunden sind (Tabelle 4.1, Anhang Abbildung 7.30 bis Abbildung 7.33). Diese Ergebnisse deuteten auf eine veränderte chemische Umgebung an den Kohlenstoffatomen 15 und 16 hin. Durch Vergleich mit publizierten NMR-Spektren (Cui et al. 2008) konnte das enzymatisch gebildete Hauptprodukt eindeutig als 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäuremethylester identifiziert werden. Da die Methylgruppe jedoch nach der enzymatischen Reaktion angefügt wurde, epoxidierte die SIPXG  $\alpha$ -Linolensäure zu 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäure als Hauptprodukt (Abbildung 4.17).

Tabelle 4.1  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Signale von  $\alpha$ -Linolensäuremethylester und 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäuremethylester.

C-Atom	$^{13}\text{C}$ NMR		$^1\text{H}$ NMR			
	Substrat $\delta$ [ppm]	Produkt $\delta$ [ppm]	Substrat $\delta$ [ppm]	Substrat Kopplung; J [Hz]	Produkt $\delta$ [ppm]	Produkt Kopplung; J [Hz]
1	174,3	174,2	---	---	---	---
2	34,1	34,1	2,32	t; 7,6	2,32	t; 7,5
3	24,9	26,1	1,5-1,66	m	1,5-1,66	m
4	29,1	29	1,25-1,39	m	1,25-1,41	m
5	29,1	29,2	1,25-1,39	m	1,25-1,41	m
6	29,16	29,6	1,25-1,39	m	1,25-1,41	m
7	29,1	29,1	1,25-1,39	m	1,25-1,41	m
8	27,2	27,2	2,06-2,11	m	2,06	q; 6,6, 7,1
9	130,3	130,5	5,34-5,41	m	5,31-5,55	m
10	127,2	127,28	5,34-5,41	m	5,31-5,55	m
11	25,6	27,2	2,82	m	2,82	dd; 6,9, 7,0
12	128,2	124,2	5,34-5,41	m	5,31-5,55	m
13	128,2	130,8	5,34-5,41	m	5,31-5,55	m
14	25,5	26,2	2,82	m	2,40-2,45	m
15	127,1	58,3	5,34-5,41	m	2,87-3,01	m
16	131,8	56,5	5,34-5,41	m	2,87-3,01	m
17	20,5	21,1	2,06-2,11	m	2,2-2,28	m
18	14,3	10,6	0,99	t; 7,5	1,07	t; 7,5
19	51,4	51,4	3,68	s	3,68	s

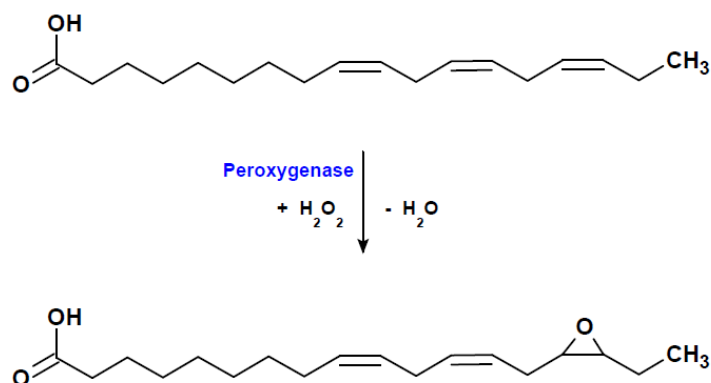


Abbildung 4.17 Epoxidierung von  $\alpha$ -Linolensäure zu 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäure durch die SIPXG.

Die zwei Nebenprodukte der Oxidation von  $\alpha$ -Linolensäure konnten in keiner Elutionsfraktion detektiert werden. Die Identifizierung dieser Verbindungen war nicht möglich.



15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäure machte mehr als zwei Drittel der Oxidationsprodukte aus (68 %), das restliche Drittel wurde unter den zwei Nebenprodukten aufgeteilt (17 und 15 %).

#### 4.2.5 Überblick des Substratscreenings

Die untersuchten Fettsäuren und Fettsäurederivate wurden mit Ausnahme des Erucasäuremethylesters an ihren *cis*-Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen durch SIPXG epoxidiert, *trans*-Doppelbindungen wurden nicht oxidiert. Die gebildeten Epoxide sind Monoepoxide. Di-oder Triepoxide wurden nicht nachgewiesen.

#### 4.2.6 Substratsättigungen

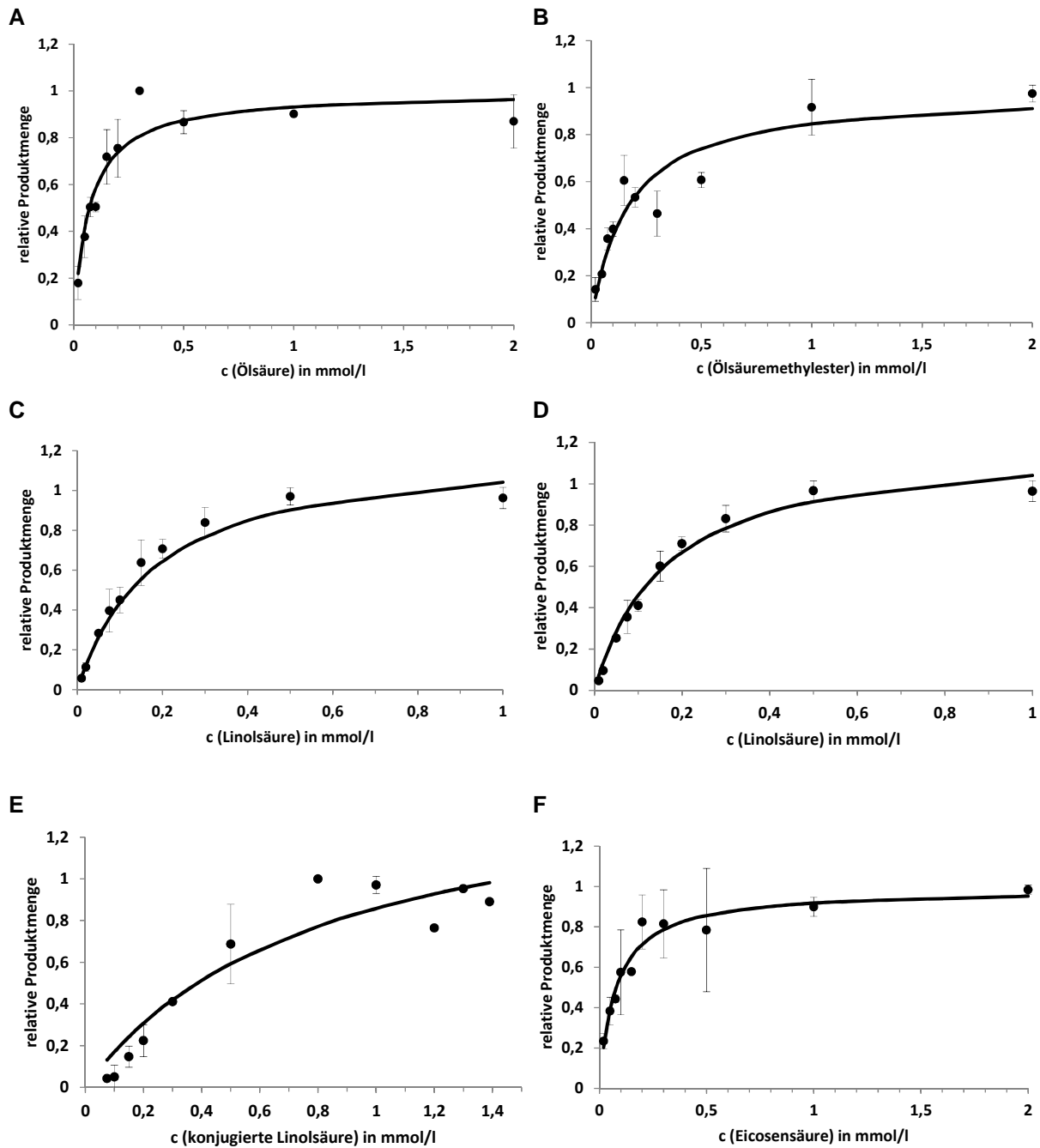
Ein Enzym weist in der Regel eine Sättigung der Reaktionsgeschwindigkeit bei ansteigender Substratkonzentration auf. Diese Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Substratkonzentration beschreibt die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

( $v$  = Reaktionsgeschwindigkeit;  $V_{\max}$  = maximale Reaktionsgeschwindigkeit;  $[S]$  = Substratkonzentration;  $K_m$  = Michaelis-Menten-Konstante)

Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  hat die Dimension einer Konzentration und entspricht der Substratkonzentration, bei welcher die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Der  $K_m$ -Wert kann als reziprokes Maß für die „Affinität“ des Enzyms für ein bestimmtes Substrat bezeichnet werden (Christen und Jaussi 2005).

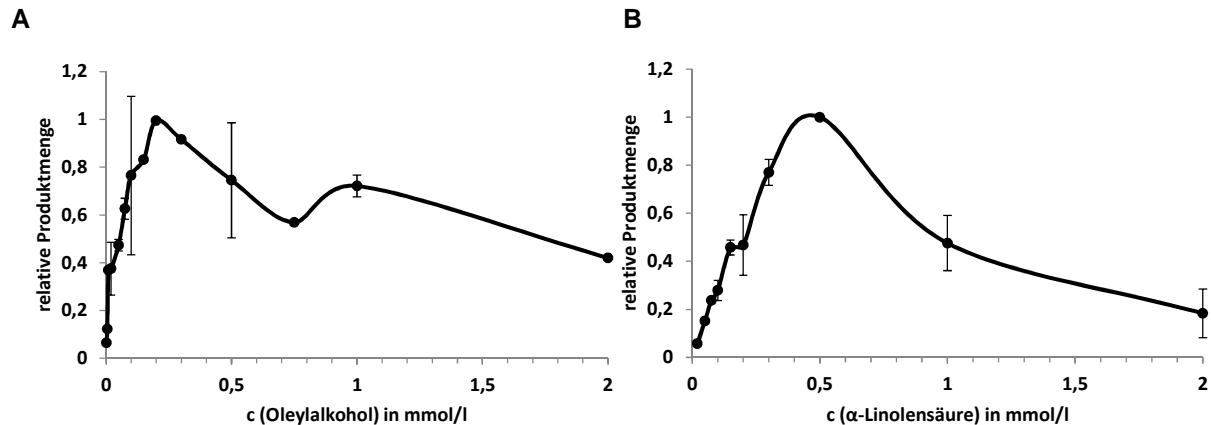
In diesem Teil der Arbeit wurden Sättigungskurven der SIPXG für verschiedene Fettsäuren und Fettsäurederivate erstellt und daraus die dazugehörigen  $K_m$ -Werte berechnet. Die Proteinmenge und die Konzentration des Wasserstoffperoxids wurden konstant gehalten; variabel waren nur die Konzentrationen der Fettsäuren, welche von 0,02-2 mmol/l reichten (Kapitel 3.4.12.1). Da zum Zeitpunkt der Messungen keine Referenzsubstanzen für die Oxidationsprodukte vorlagen, konnten die absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten nicht berechnet werden. Stattdessen wurden die jeweiligen relativen Mengen der Oxidationsprodukte gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen in einem Diagramm aufgetragen. Mit dem Excel Solver wurde eine Näherungskurve berechnet (Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18** Substratsättigung der SIPXG für verschiedene Fettsäuren und Fettsäurederivate. Bei gleichbleibender Menge an Protein und Wasserstoffperoxid wurden verschiedene Substratkonzentrationen eingesetzt. Die Oxidationsprodukte wurden mit GC-MS gemessen und die relativen Mengen der Oxidationsprodukte bei der jeweiligen Substratkonzentration dargestellt. Mit Excel Solver wurde eine Näherungskurve berechnet. Oxidationsprodukte: **A** 9,10-Epoxy-octadecansäure, **B** 9,10-Epoxy-octadecansäuremethylester, **C** 9,10-Epoxy-12-octadecansäure, **D** 12,13-Epoxy-9-octadecansäure, **E** 12,13-Epoxy-10-octadecansäure, **F** 11,12-Epoxy-dodecansäure.

Die Kurven von 9,10-Epoxy-octadecanol und 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäure zeigten nicht den Verlauf einer Hyperbel. Stattdessen wiesen sie einen Abfall der Produktkurve nach Erreichen eines Maximums auf. Es handelte sich hier um eine Art Hemmung der SIPXG, die

bei ansteigender Substratkonzentration verursacht wurde (Abbildung 4.19). Die Sättigungs- und Hemmkurven der SIPXG bei Einsatz verschiedener Substratkonzentrationen ermöglichten die Bestimmung der jeweiligen  $K_m$ -Werte (Tabelle 4.2). Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wegen teilweise nicht vorhandenen Referenzsubstanzen der Epoxide nicht berechnet werden konnte, wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit einer relativen Produktmenge von 1 gleichgesetzt.



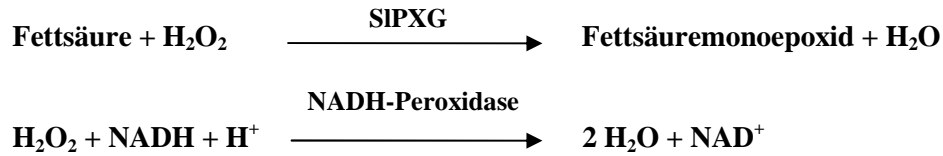
**Abbildung 4.19 Hemmung der Produktbildung der SIPXG bei zunehmender Substratkonzentration.** Untersucht wurde die Epoxidierung von Oleylalkohol und  $\alpha$ -Linolensäure durch die SIPXG. Die relativen Mengen der jeweiligen Oxidationsprodukte werden bei ansteigender Substratkonzentration dargestellt. Oxidationsprodukte: **A** 9,10-Epoxy-octadecanol, **B** 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäure

**Tabelle 4.2  $K_m$ -Werte der SIPXG für Fettsäuren und Fettsäurederivate.**

Substrat	Produkt	$K_m$ -Wert in mmol/l
Ölsäure	9,10-Epoxy-octadecansäure	0,07
Ölsäuremethylester	9,10-Epoxy-octadecansäuremethylester	0,17
Linolsäure	9,10-Epoxy-12-octadecensäure	0,18
	12,13-Epoxy-9-octadecensäure	0,16
konjugierte Linolsäure	12,13-Epoxy-10-octadecensäure	0,82
Eicosensäure	11,12-Epoxy-dodecansäure	0,08
Oleylalkohol	9,10-Epoxy-octadecanol	0,05
$\alpha$ -Linolensäure	15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäure	0,21

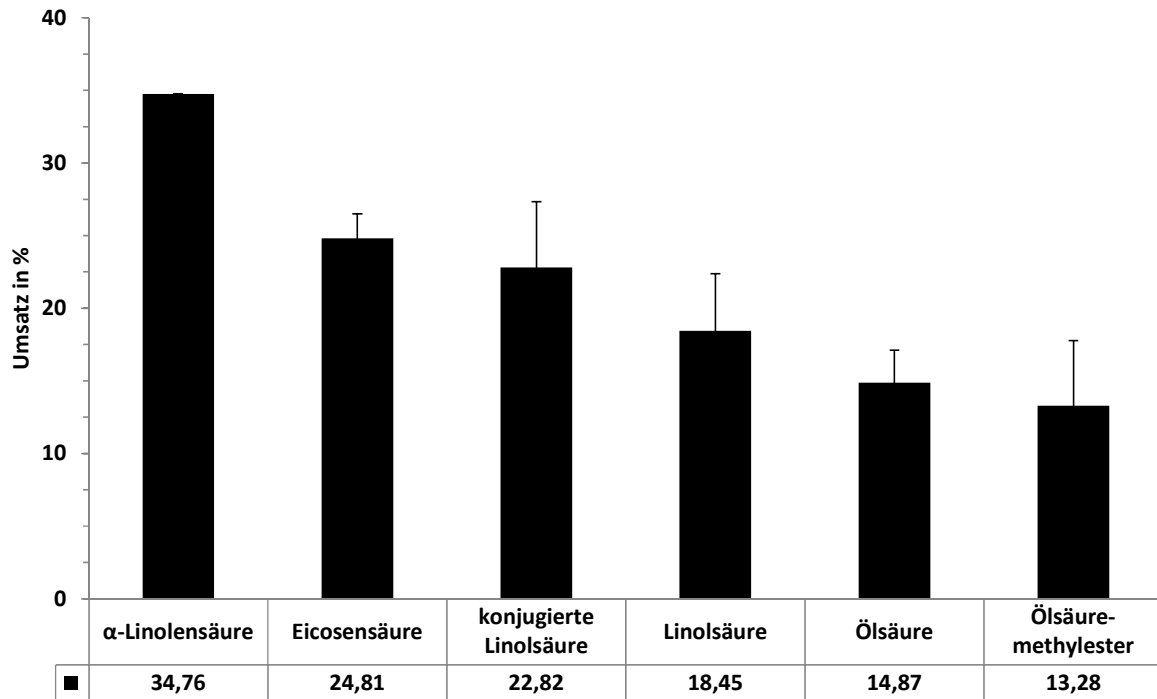
#### 4.2.7 Aktivitätsmessungen

Die Epoxidierungsaktivität der SIPXG für Fettsäuren und Fettsäurederivate wurde mit Hilfe eines gekoppelten Enzymtests ermittelt:

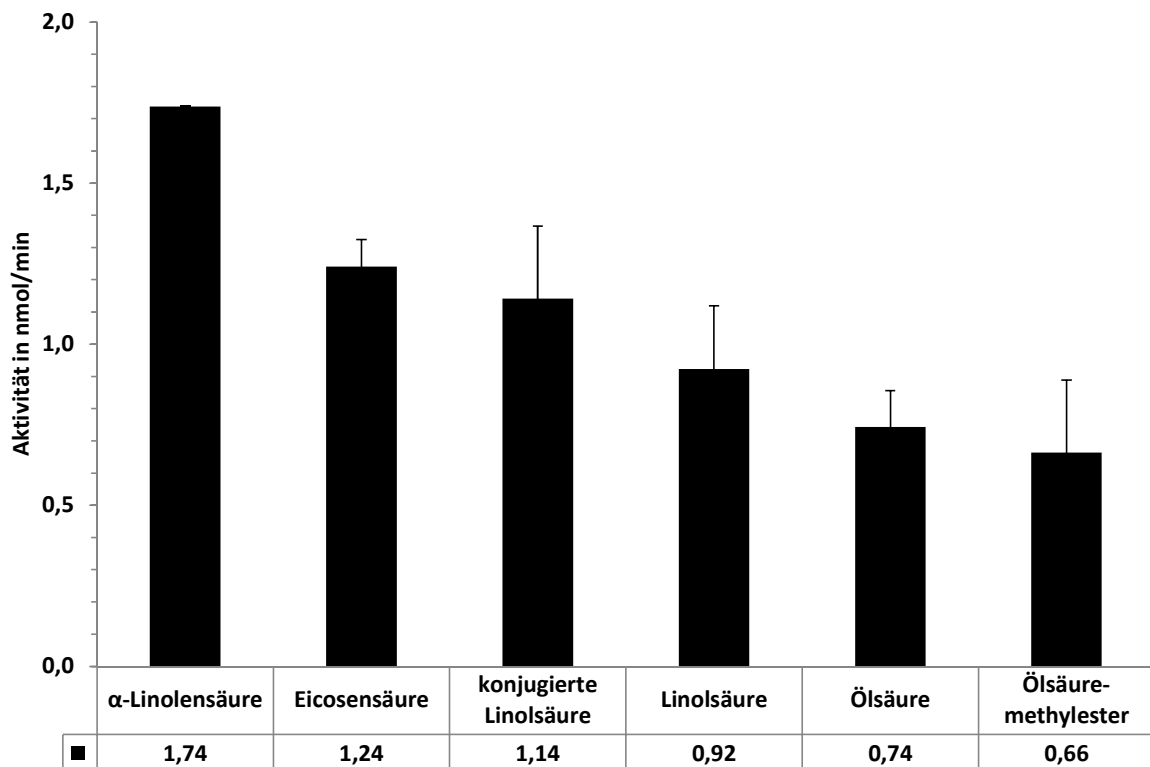


Im ersten Teil katalysierte die SIPXG die Reaktion einer Fettsäure mit Wasserstoffperoxid zu einem Monoepoxid und Wasser. Die verbrauchte Stoffmenge an Wasserstoffperoxid ist äquivalent zur Stoffmenge des gebildeten Epoxids. Das Wasserstoffperoxid, welches bei der Epoxidierung übrig blieb, wurde im zweiten Teil für die Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> durch eine Peroxidase verwendet. Anhand der umgewandelten Menge an NADH konnte die Stoffmenge an Wasserstoffperoxid berechnet werden. Die bei der Epoxidierung eingesetzte Stoffmenge des Wasserstoffperoxids war bekannt. Aus der Differenz von eingesetzter und übrig gebliebener Stoffmenge ergab sich der Umsatz an Wasserstoffperoxid in der Epoxidierungsreaktion. Aus dem Umsatz konnte die Aktivität als Substratumsatz pro Zeit berechnet werden.

Eingesetzt wurden 50 µg mikrosomale SIPXG, 100 nmol Substrat (Endkonzentration 0,4 mmol/l) und 100 nmol Wasserstoffperoxid (Endkonzentration 0,4 mmol/l) (Kapitel 3.4.13.1). Die Zufuhr des Detergens Tween®20 im Reaktionsansatz der SIPXG führte zu einer besseren Löslichkeit der Fettsäuren im wässrigen Puffer. Dadurch waren Epoxidierung und Verbrauch an Wasserstoffperoxid mit geringeren Standardabweichungen verbunden als ohne Detergens. Die Umsätze der SIPXG reichten von 13,3 % bis 34,8 % bei Ölsäuremethylester bzw. α-Linolensäure als Substrat. Da die Epoxidierung von Oleylalkohol nur in sehr geringem Ausmaß stattfand, wurde auf dessen Quantifizierung verzichtet (Abbildung 4.20). Die Aktivitäten für die untersuchten Substrate lagen zwischen 1,74 nmol/min bei α-Linolensäure und 0,66 nmol/min bei Ölsäuremethylester (Abbildung 4.21).



**Abbildung 4.20 Umsätze von Fettsäuren und Fettsäurederivate durch die SIPXG.** Eingesetzt wurden 50  $\mu$ g mikrosomale SIPXG, 100 nmol Substrat und 100 nmol Wasserstoffperoxid, die Reaktionszeit betrug 20 Minuten. Quantifiziert wurde der Verbrauch des Wasserstoffperoxids in einem gekoppelten Enzymtest; hierbei reagierte nach Epoxidierung das restliche Wasserstoffperoxid mit NADH durch eine NADH-Peroxidase zu  $\text{NAD}^+$ , die Messung der Abnahme von NADH erfolgte photometrisch bei 340 nm.



**Abbildung 4.21 Aktivität der SIPXG in Bezug auf die Epoxidierung von Fettsäuren und Fettsäurederivaten.** Versuchsbedingungen und Quantifizierung wie in Abbildung 4.20.

### 4.3 Oxidation von Terpenen

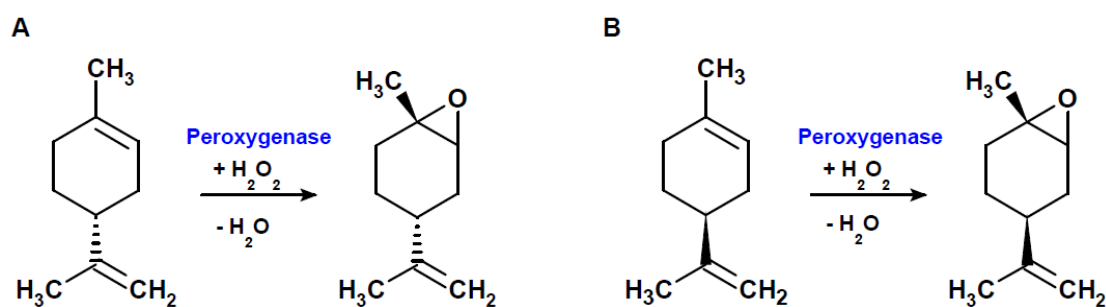
Terpene stellen die größte Klasse an sekundären Pflanzenstoffen dar. Sie werden nach ihrer Anzahl an Kohlenstoffatomen in Monoterpene ( $C_{10}$ ), Sesquiterpene ( $C_{15}$ ), Diterpene ( $C_{20}$ ), Triterpene ( $C_{30}$ ) und Tetraterpene ( $C_{40}$ ) untergliedert. Eine weitere Unterteilung erfolgt in zyklische und azyklische Terpene (Taiz und Zeiger 2006). Terpene sind überwiegend wasserunlösliche Verbindungen. Viele Terpene besitzen *cis*-konfigurierte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen und stellen deshalb potentielle Substrate für Epoxidierungen durch eine PXG dar. In diesem Teil der Arbeit wurden unterschiedliche Terpene als Substrate der rekombinanten SIPXG getestet, die Oxidationsprodukte wenn möglich identifiziert und die Aktivitäten der SIPXG für die jeweiligen Substrate gemessen.

#### 4.3.1 Substratscreening

Die Oxidation verschiedener Terpene durch SIPXG wurde untersucht. Als Oxidationsmittel diente Wasserstoffperoxid. Um auszuschließen, dass andere mikrosomale Proteine eine oxidierende Wirkung haben, wurde eine Leervektorkontrolle durchgeführt. Zusätzlich dazu wurden Kontrollversuche ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid unternommen, um eine rein chemische Oxidation bzw. eine Beteiligung anderer Oxidationsmittel auszuklammern. Die Analyse der Oxidationsprodukte fand durch GC-MS statt (Kapitel 3.4.10.2).

Aus der Oxidation von (R)-(+)-Limonen und (S)-(-)-Limonen ging jeweils ein Hauptprodukt und ein Nebenprodukt hervor (Anhang Abbildung 7.8 und Abbildung 7.9). Dabei handelte es sich jeweils um Diastereomere von Limonen-1,2-epoxid, was durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit denen der Referenzsubstanzen bestätigt wurde. Die (R)-(+)-Limonen-1,2-epoxide lagen in einem Diastereomerenverhältnis von 97:3 vor, die (S)-(-)-Limonen-1,2-epoxide in einem Diastereomerenverhältnis von 88:12 (Anhang Abbildung 7.8 und Abbildung 7.9). Zusätzlich wurde die absolute Konfiguration der Epoxidgruppe an beiden Limonenisomeren genauer untersucht um herauszufinden, welches der möglichen diastereomeren Limonenepoxide durch die SIPXG überwiegend gebildet wurde. Die Versuche der chiralen Analytik wurden an der Universität Bonn, Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Lehrstuhl von Professor Dr. M. Wüst durchgeführt. Die Limonen-1,2-epoxide wurden mit Hilfe einer Kapillarsäule, die mit einer chiralen stationären Phase (Octakis-(2,3-di-O-butyryl-6-O-tert.-butyldimethylsilyl)- $\gamma$ -cyclodextrin gelöst in SE 52) belegt war, getrennt (Kapitel 3.5.6). Der Vergleich mit der enantiomerenreinen Referenzsubstanz (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid zeigte, dass (R)-(+)-

Limonen durch SIPXG zu (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid als Hauptprodukt oxidiert worden ist (Anhang Abbildung 7.10). Da für die Analytik der (S)-(-)-Limonen-1,2-epoxide nur racematische Referenzsubstanzen vorlagen, wurde eine chemische Anreicherung des (S)-(-)-Limonen-*trans*-1,2-epoxids mittels Quecksilber-(II)-chlorid vorgenommen (Blair et al., 2007). Durch Vergleich der Retentionszeiten des chemisch angereicherten (S)-(-)-Limonen-*trans*-1,2-epoxids mit der des enzymatisch gebildeten (S)-(-)-Limonen-1,2-epoxids wurde gezwungen, dass (S)-(-)-Limonen durch die SIPXG zu (S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid als Hauptprodukt oxidiert wurde (Anhang Abbildung 7.11). Die SIPXG katalysierte folglich die Oxidation von Limonen zu sehr diastereomerenreinen Epoxiden: Aus (R)-(+)-Limonen entstand (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid (97 % Diastereomerenverhältnis) und aus (S)-(-)-Limonen entstand (S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid (88 % Diastereomerenverhältnis) (Abbildung 4.22).

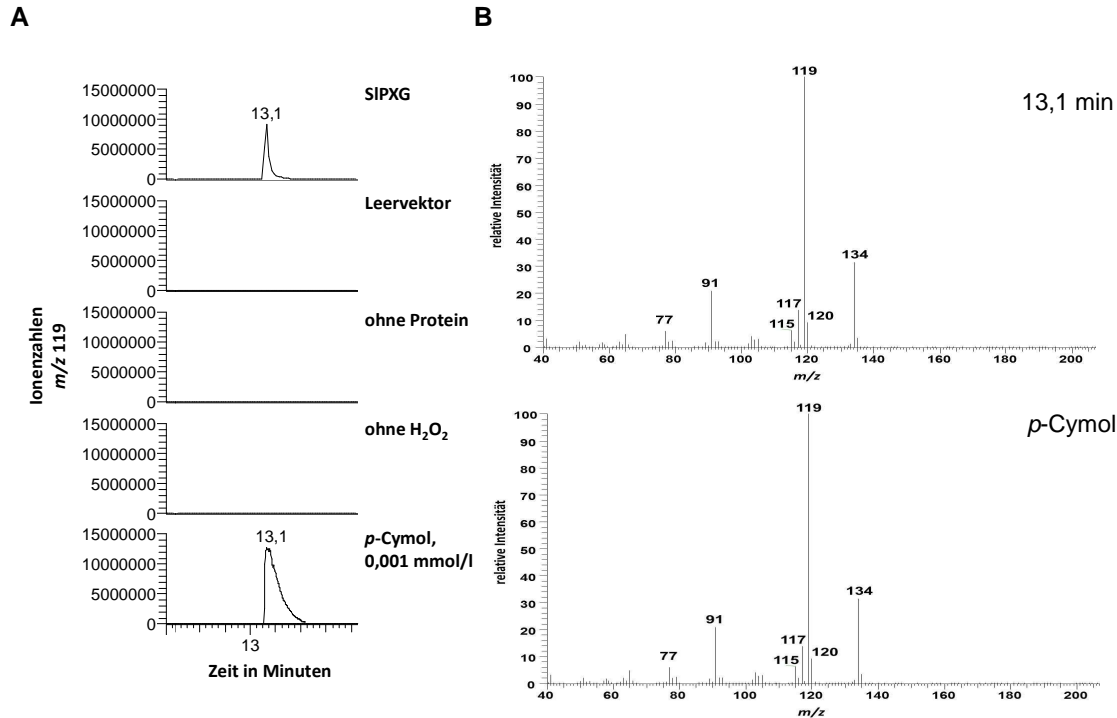


**Abbildung 4.22** Epoxidierung von Limonen durch SIPXG. **A** (R)-(+)-Limonen wurde zu (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid oxidiert, **B** (S)-(-)-Limonen wurde zu (S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid oxidiert.

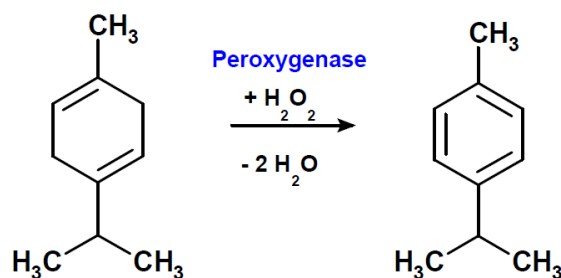
Neben Limonen wurden weitere Monoterpene mit dem *p*-Menthangerüst als Substrat für die SIPXG eingesetzt. Die Oxidation von (RS)- $\alpha$ -Phellandren als auch von (R)- $\alpha$ -Phellandren führte zu je fünf Oxidationsprodukten mit gleichen Retentionszeiten und Massenspektren (Anhang Abbildung 7.12, Abbildung 7.13 und Abbildung 7.14). Die Oxidation von  $\alpha$ -Terpinen und Terpinolen ergab je ein Oxidationsprodukt (Anhang Abbildung 7.15 und Abbildung 7.16). Da die Massenspektren der Oxide von  $\alpha$ -Phellandren,  $\alpha$ -Terpinen und Terpinolen nach Vergleich mit Literatur und Datenbank zu keinem plausiblen Ergebnis führten, wurden die Produkte wenn möglich mittels NMR identifiziert (Kapitel 4.3.2).

$\gamma$ -Terpinen wurde durch die SIPXG zu *p*-Cymol oxidiert. Ein Vergleich der Retentionszeit und des Massenspektrums mit denen einer Referenzsubstanz bestätigte dieses Produkt (Abbildung 4.23). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Vorgängen wurde bei der Oxidation von  $\gamma$ -Terpinen kein Sauerstoffatom vom Wasserstoffperoxid auf das Substrat

übertragen. Die stattgefundenene Reaktion war weder eine Epoxidierung noch eine Hydroxylierung. Die SIPXG katalysierte in diesem Fall die Aromatisierung von  $\gamma$ -Terpinen zu *p*-Cymol (Abbildung 4.24).



**Abbildung 4.23** Oxidierung von  $\gamma$ -Terpinen durch SIPXG. Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). *p*-Cymol diente als Referenzsubstanz. **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum bei 13,1 Minuten im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit SIPXG (oben) und Massenspektrum von *p*-Cymol (unten).



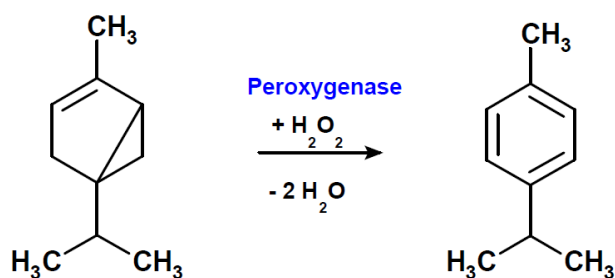
**Abbildung 4.24** Aromatisierung von  $\gamma$ -Terpinen zu *p*-Cymol durch die SIPXG.

Um die Aromatisierung als neuen Reaktionstyp der SIPXG weiter zu charakterisieren, wurden zwei Substrate mit ähnlicher Struktur wie das  $\gamma$ -Terpinen auf eine Aromatisierung getestet. 1,4-Cyclohexadien und 1-Methyl-1,4-cyclohexadien besitzen wie das  $\gamma$ -Terpinen als Grundstruktur einen Ring aus sechs Kohlenstoffatomen mit zwei gegenüberliegenden



Doppelbindungen (Kapitel 3.4.10.3). Zwar wurde bei beiden Substraten die Bildung der Aromaten Benzol bzw. Toluol festgestellt, jedoch kamen diese Stoffe auch in den Kontrollversuchen vor. Stattdessen konnte ein enzymatisches Oxidationsprodukt des 1-Methyl-1,4-cyclohexadiens detektiert werden (Abbildung 7.18). Das Massenspektrum des Produkts zeigte ein mögliches Molekül-Ion bei  $m/z$  110, was auf ein Molekulargewicht von 110 hindeutete. Dies würde die kovalente Bindung eines Sauerstoffatoms an 1-Methyl-1,4-cyclohexadien ( $94+16$ ) bedeuten. Mit Referenzsubstanzen konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Oxid um 3-Cyclohexen-1-carboxyaldehyd oder 1-Cyclohexen-1-carboxyaldehyd handelt. Das Vorliegen eines Epoxids wird vermutet, die genaue Struktur konnte bisher jedoch nicht ermittelt werden.

$\alpha$ -Thujen wurde zu vier Produkten durch die SIPXG oxidiert. Das Hauptprodukt wurde als *p*-Cymol (50% der gebildeten Produkte) durch Vergleich mit den Daten einer Referenzsubstanz identifiziert (Abbildung 7.17). Die Nebenkomponten, die 24%, 17% und 9% der gebildeten Oxidationsprodukte repräsentieren, konnten bisher nicht identifiziert. Wie für  $\gamma$ -Terpinen hat eine Aromatisierung durch die SIPXG stattgefunden (Abbildung 4.25).



**Abbildung 4.25** Oxidation von  $\alpha$ -Thujen zu *p*-Cymol durch die SIPXG.

$\alpha$ -Pinen, 3-Caren und (S)-(+)-Carvon zählen ebenfalls zur Gruppe der zyklischen Monoterpene. Sie wurde auf Oxidation durch die SIPXG untersucht. Bei keinem dieser drei Substrate konnte jedoch ein Oxidationsprodukt detektiert werden.  $\alpha$ -Pinen, 3-Caren und (S)-(+)-Carvon scheinen demnach keine Substrate für die SIPXG zu sein.

Nerol und Geraniol sind azyklische Monoterpene, welche als mögliche Substrate der SIPXG analysiert wurden. Beide Verbindungen sind isomer zu einander: die 2,3-Doppelbindung liegt bei Nerol in *cis*-, bei Geraniol in *trans*-Konfiguration vor. Ein Oxidationsprodukt konnte nur bei Nerol festgestellt werden (Anhang Abbildung 7.19). Das Massenspektrum des Oxidationsproduktes wurde mit Massenspektren der Literatur (Saladino 2003) und der Datenbank verglichen und als Nerol-2,3-epoxid identifiziert (Abbildung 4.26). Die Tatsache,

dass Geraniol nicht epoxidiert wurde, hängt mit der Präferenz der PXG für *cis*-Doppelbindungen zusammen (Blée und Schubert 1990).

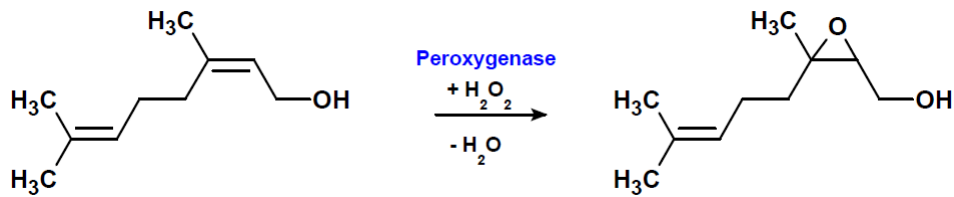


Abbildung 4.26 Epoxidierung von Nerol zu Nerol-2,3-epoxid.

Aus der Gruppe der Sesquiterpene wurde  $\alpha$ -Bisabolol durch die SIPXG oxidiert,  $\beta$ -Caryophyllen hingegen nicht. Auch das Norisoprenoid  $\alpha$ -Ionon wurde nicht umgesetzt. Aus  $\alpha$ -Bisabolol entstanden drei Oxide (Anhang Abbildung 7.20). Die Massenspektren wurden mit Literaturangaben verglichen.  $\alpha$ -Bisabolol wurde durch die SIPXG vermutlich zu 3,4-Dihydroxy-bisabolol (40% der gebildeten Produkte; Miyazawa et al. 1995) und Bisabololoxid B (35% der gebildeten Produkte; Schilcher et al. 1975) umgewandelt (Abbildung 4.27). Ein Nebenprodukt (25 % der gebildeten Produkte) mit einer Elutionszeit von 18,45 Minuten konnte nicht identifiziert werden.

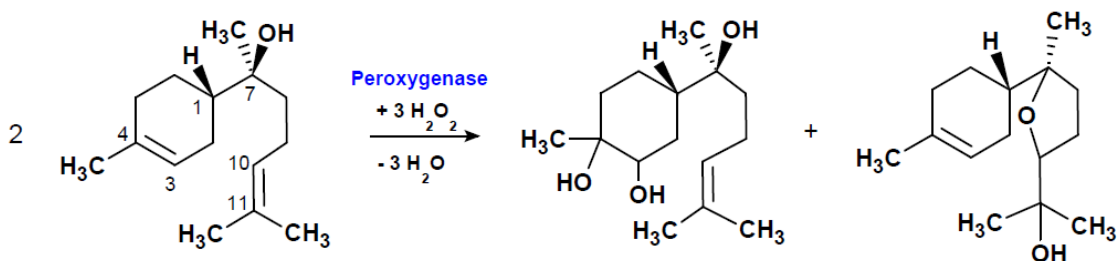
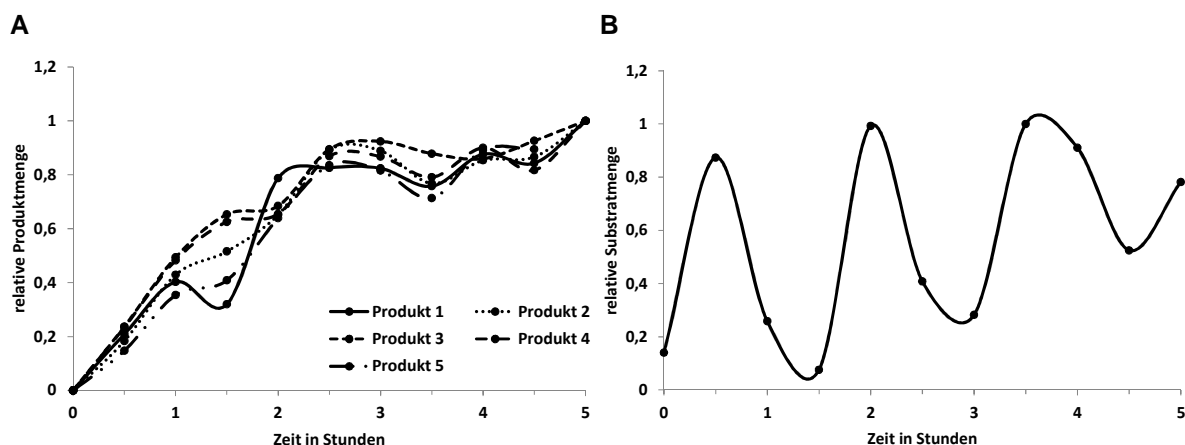


Abbildung 4.27 Oxidation von  $\alpha$ -Bisabolol zu 3,4-Dihydroxy-bisabolol und Bisabololoxid B.

### 4.3.2 Identifizierung unbekannter Oxidationsprodukte durch NMR-Spektroskopie

Für eine Identifizierung durch NMR-Spektroskopie wurden die Oxidationsprodukte von (RS)- $\alpha$ -Phellandren,  $\alpha$ -Terpinen und Terpinolen in einem großen Reaktionsansatz hergestellt. Der Reaktionsverlauf wurde durch mehrmalige Probenentnahme verfolgt (Kapitel 3.4.15). Im Falle der Oxidation von (RS)- $\alpha$ -Phellandren nahmen die fünf Produkte in der fünfstündigen Synthese kontinuierlich zu. Im Gegensatz dazu zeigte das Substrat (RS)- $\alpha$ -Phellandren ein zu- und abnehmendes Verhalten, welches durch Substratzufuhr von außen und Substratumsatz durch die SIPXG verursacht wurde (Abbildung 4.28).



**Abbildung 4.28 Reaktionsverlauf der Oxidation von (RS)- $\alpha$ -Phellandren durch SIPXG.** In einem 100 ml-Reaktionsansatz wurden 10 mg Proteinrohextrakt (mit überexprimierter SIPXG) in Natriumacetatpuffer (10 mmol/l, pH 6) 5 Stunden gerührt. Nach 0, 1,5 und 3 Stunden wurden jeweils 100  $\mu$ mol (RS)- $\alpha$ -Phellandren hinzugegeben, halbstündig wurden je 250  $\mu$ mol Wasserstoffperoxid zugefügt. Produkte (A) und Substrat (B) wurden aus dem Reaktionsansatz extrahiert und mit GC-MS gemessen.

Für  $\alpha$ -Terpinen und Terpinolen zeichnete sich ein ähnliches Bild ab was die Produktsynthese angeht.

Für die Extraktion der Oxidationsprodukte von  $\alpha$ -Phellandren und Terpinolen aus wässrigem Puffer war Dichlormethan am effektivsten, für das Oxidationsprodukt von  $\alpha$ -Terpinen Diethylether. Für die säulenchromatographische Trennung von Terpenen und ihren Oxidationsprodukten wurde ein Fließmittelgemisch bestehend aus n-Hexan:Essigsäureethylester (3:2) verwendet (Kapitel 3.5.1 und 3.5.2). Das Oxidationsprodukt von  $\alpha$ -Terpinen fand sich nach der Chromatographie in den Elutionsfraktionen 5 bis 8 wieder. Das Total-Ionen-Chromatogramm (TIC) wies nur den Peak des Oxidationsproduktes auf und deutete auf eine hohe Reinheit hin. Zwei vermutlich isomere Oxidationsprodukte von  $\alpha$ -Phellandren mit gleichem Massenspektrum wurden in den Fraktionen 18 und 19 gesammelt. Ein weiteres Produkt konnte über die Kieselgelsäule gereinigt werden und befand sich in den Fraktionen 24 bis 28. Die anderen Oxidationsprodukt von  $\alpha$ -Phellandren und das Oxidationsprodukt von Terpinolen konnten nicht vollständig gereinigt werden und waren deshalb für eine NMR-spektroskopische Untersuchung ungeeignet. Die Elutionsfraktionen mit den jeweiligen gereinigten Produkten wurden vereint und das Fließmittel bei Raumtemperatur abgedampft. Die Rückstände wurden für die Aufnahme eines NMR-Spektrums vorbereitet (Kapitel 3.5.7).

Durch Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von  $\alpha$ -Terpinen mit dessen Oxidationsprodukt wurden relativ große Verschiebungen der Signale an den Kohlenstoffatomen 1, 2, 3 und 4 festgestellt (Tabelle 4.3; Anhang Abbildung 7.34 bis Abbildung 7.39). Das konjugierte  $\pi$ -System des Substrats war im Oxidationsprodukt nicht mehr vorhanden. Vermutlich befand sich zwischen C2 und C3 nun eine Doppelbindung. Die chemischen Verschiebungen von 67,25 und 71,58 ppm an C1 bzw. C4 deuteten auf das Vorliegen von Hydroxygruppen an diesen Positionen hin. Durch Literaturvergleich des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums (Cavalli et al. 2004) als auch des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrums (Suzuki et al. 1989) konnte das Oxidationsprodukt von  $\alpha$ -Terpinen als 1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en bestätigt werden. Nach zusätzlichem Vergleich des Massenspektrums des enzymatisch gebildeten 1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en mit Literaturdaten (Rücker und Molls 1980) wurde festgestellt, dass die zwei Hydroxygruppen in *cis*-Konfiguration vorlagen. Folglich hydroxylierte die SIPXG  $\alpha$ -Terpinen zu *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en (Abbildung 4.29).

Tabelle 4.3  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  NMR-Signale von  $\alpha$ -Terpinen und *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en.

C-Atom	$^{13}\text{C}$ NMR		$^1\text{H}$ NMR			
	Substrat $\delta$ [ppm]	Produkt $\delta$ [ppm]	Substrat $\delta$ [ppm]	Substrat Kopplung; $J$ [Hz]	Produkt $\delta$ [ppm]	Produkt Kopplung; $J$ [Hz]
1	132,89	67,25	---	---	---	---
2	119,69	135,46	5,61	dq; 1,3, 5,3	5,75	dd; 1,5, 10,0
3	116,58	133,46	5,58	d; 5,4	5,65	dd; 1,5, 10,0
4	142,25	71,58	---	---	---	---
5	25,33	27,09	2,05-2,18	m	1,74-1,80	m
6	29,06	33,5	2,05-2,18	m	1,56-1,62	m
7	22,89	29,69	1,79	s	1,36	s
8	34,55	37,44	2,27	sept; 6,8	1,85-1,95	m
9, 10	21,18	16,37, 17,55	1,04	d; 6,8	0,92-1,00	2d; 6,9

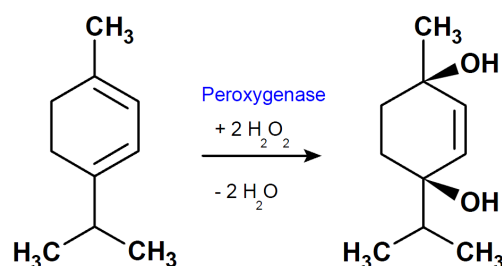


Abbildung 4.29 Hydroxylierung von  $\alpha$ -Terpinen zu *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en durch SIPXG.

Die Oxidation von (RS)- $\alpha$ -Phellandren durch die SLPXG ergab fünf Produkte. Die beiden Produkte mit den GC-Retentionszeiten 26,8 und 27,2 Minuten eluierten in einer Fraktion. Da sie wegen gleicher Massenspektren vermutlich isomer zueinander sind, wurde dieses Elutionsgemisch ohne weitere Trennung NMR-spektroskopisch untersucht. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren war im Vergleich zum Spektrum des Substrates an den Kohlenstoffatomen 1 und 2 die größten Veränderungen zu erkennen (Tabelle 4.4; Anhang Abbildung 7.40 bis Abbildung 7.45). Die Signale dieser zwei Kohlenstoffatome des Produkts lagen zwischen 69,1 und 73,7 ppm und deuteten auf eine Bindung mit Sauerstoff hin. Auf Grund einer deutlichen Änderung des  $^1\text{H}$ -Signals des Wasserstoffatoms, welches am Kohlenstoffatom 2 gebunden ist, wird die Vermutung einer Sauerstoffbindung an dieser Position bestärkt (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4**  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  NMR-Signale von (RS)- $\alpha$ -Phellandren und 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en.

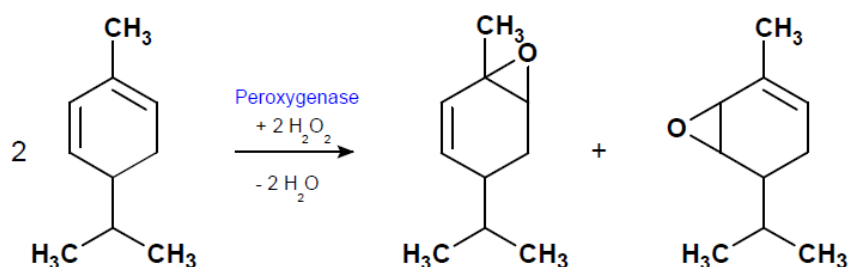
C-Atom	$^{13}\text{C}$ NMR		$^1\text{H}$ NMR			
	Substrat $\delta$ [ppm]	Produkt $\delta$ [ppm]	Substrat $\delta$ [ppm]	Substrat Kopplung; J [Hz]	Produkt $\delta$ [ppm]	Produkt Kopplung; J [Hz]
1	131,13	69,13	---	---	---	---
2	120,47	73,65	5,46-5,49	m	3,45-3,50	m
3	25,82	25,91	1,95-2,15	m	1,75-1,82	m
4	39,68	42,58	2-2,07	m	2,05-2,1	m
5	130,13	134,04	5,70-5,76	m	5,65-5,72	m
6	127,96	132,09	5,77-5,84	m	5,65-5,72	m
7	21,04	30,17	1,74	s	1,34	s
8	31,25	31,49	1,63-1,73	m	1,62-1,68	m
9, 10	19,84	19,00	0,89-0,91	2d; 6,8,	0,85-0,95	2d; 6,8

Das Produkt mit der GC-Retentionszeit 27,7 Minuten wurde NMR-spektroskopisch untersucht. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wies an den Kohlenstoffatomen 5 und 6 die größten Veränderungen im Vergleich zum Spektrum des Substrates auf (Tabelle 4.5; Anhang Abbildung 7.46 bis Abbildung 7.49). Die Signale dieser zwei Kohlenstoffatome des Produkts lagen zwischen 69,4 und 71,1 ppm und deuteten auf eine Bindung mit Sauerstoff hin. Ein weiterer Anhaltspunkt dafür war die deutliche Änderung der  $^1\text{H}$ -Signale jener Wasserstoffatome, welche an den Kohlenstoffatomen 5 und 6 gebunden waren (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$  NMR-Signale von (RS)- $\alpha$ -Phellandren und 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en.

C-Atom	$^{13}\text{C}$ NMR		$^1\text{H}$ NMR			
	Substrat $\delta$ [ppm]	Produkt $\delta$ [ppm]	Substrat $\delta$ [ppm]	Substrat Kopplung; $J$ [Hz]	Produkt $\delta$ [ppm]	Produkt Kopplung; $J$ [Hz]
1	131,13	139,13	---	---	---	---
2	120,47	128,75	5,46-5,49	m	5,46-5,48	m
3	25,82	26,39	1,95-2,15	m	2,12-2,16	m
4	39,68	48,10	2,00-2,07	m	2,00-2,05	m
5	130,13	69,37	5,70-5,76	m	3,46-3,51	m
6	127,96	71,05	5,77-5,84	dt; 1,6, 9,5	3,74	q; 7,0
7	21,04	18,49	1,74	s	1,80	s
8	31,25	31,77	1,63-1,73	m	1,55-1,65	m
9, 10	19,84	16,61	0,89-0,91	2d; 6,8,	0,86-1,00	2d; 7,0

Zusätzlich zur NMR-Spektroskopie wurde mit den Oxidationsprodukten des (RS)- $\alpha$ -Phellandrens eine GC-MS-Analyse mit chemischer Ionisation durchgeführt (Kapitel 3.5.5.3). Bei dieser „sanften“ Ionisation treten weniger Fragmentierungen auf, wodurch die Bestimmung des möglichen Molekulargewichts erleichtert wird. Die Massenspektren aller Oxide zeigten jeweils ein Pseudomolekül-Ion bei  $m/z$  153. Daraus lies sich das Molekulargewicht der Oxide mit 152 g/mol bestimmen. Dies korrelierte mit der Vermutung, dass die untersuchten Oxidationsprodukte des (RS)- $\alpha$ -Phellandrens Monoepoxide sind und bestätigt die NMR-Messungen. Zwei der fünf Produkte wurden als 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en und 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en identifiziert (Abbildung 4.30).

Abbildung 4.30 Epoxidierung von  $\alpha$ -Phellandren zu 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en und 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en durch SIPXG.

Das weitere Oxidationsprodukt des  $\alpha$ -Phellandrens hat laut GC-MS (CI) ebenfalls ein Molekulargewicht von 152 g/mol. Die genaue Struktur konnte jedoch auf Grund der geringen

synthetisierten Menge nicht eindeutig bestimmt werden. Die Tatsache, dass je zwei der fünf Produkte gleiche Massenspektren, jedoch eine unterschiedliche Retentionszeit bei der GC-MS-Messung haben, lässt vermuten, dass zwei Diastereomerenpaare entstanden sind. Ein Paar hat die Struktur des 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en (26 und 13 % der gebildeten Produkte) und das andere die des 5,6-Epoxy-*p*-Menth-1-en (26 und 17 % der gebildeten Produkte).

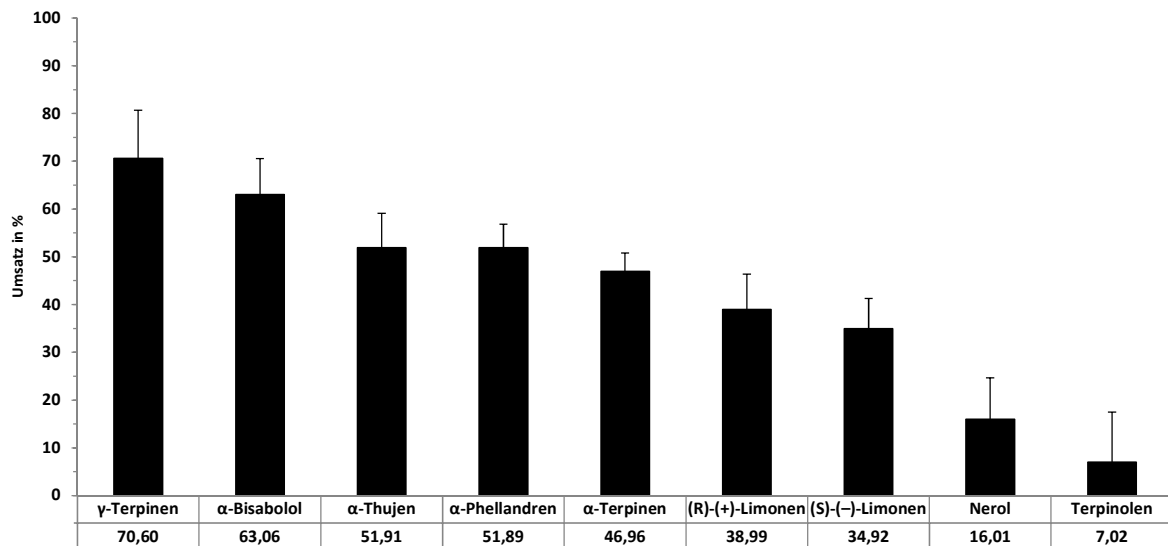
### 4.3.3 Überblick des Substratscreening

Terpene wurden durch die SIPXG unterschiedlich oxidiert. Neben den bereits erwähnten Epoxidierungen konnten auch Hydroxylierungen und Aromatisierungen beobachtet werden. Insbesondere der Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten *p*-Menthene zeigt, dass die SIPXG Substrate mit sehr ähnlicher Molekülstruktur auf verschiedene Weise oxidierte. Limonen und  $\alpha$ -Phellandren wurden epoxidiert,  $\alpha$ -Terpinen hydroxyliert und  $\gamma$ -Terpinen und  $\alpha$ -Thujen aromatisiert.

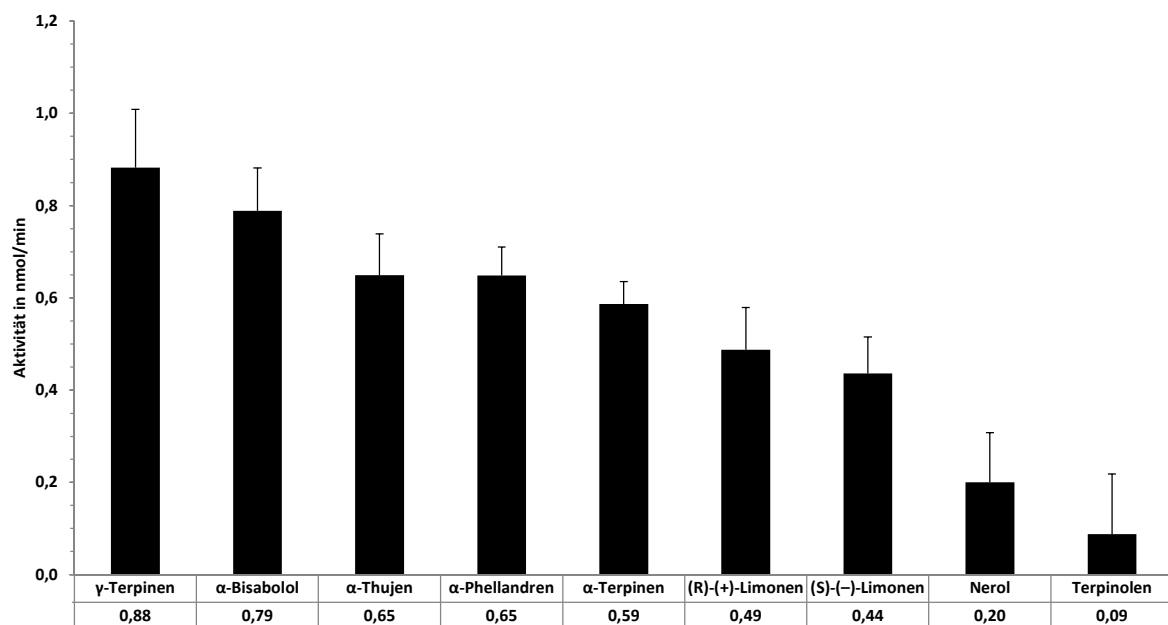
Im Falle von  $\alpha$ -Bisabolol wurde klar, dass ein und dasselbe Substrat verschieden oxidiert werden kann. Die SIPXG führte einmal eine Hydroxygruppe, einmal eine Sauerstoffbrücke in das  $\alpha$ -Bisabolol ein.

### 4.3.4 Aktivitätsmessungen

Neben der qualitativen Untersuchung der SIPXG in Bezug auf die Oxidation von Terpenen wurde auch die Aktivität der SIPXG bei den jeweiligen Terpenen gemessen. Hierfür wurden die Substrate nach erfolgter Enzymreaktion mittels Festphasen-Mikroextraktion (SPME) extrahiert und mittels GC-MS gemessen (Kapitel 3.4.13.2). Anhand erstellter Eichkurven konnten die von der SIPXG nicht umgesetzten Substratmengen quantifiziert werden (Eichkurven siehe Anhang Kapitel 7.7.2). Die Differenz zwischen 50 nmol eingesetzter Stoffmenge und der restlichen Stoffmenge bezeichnete den Substratumsatz (Abbildung 4.31). Die Aktivität errechnete sich aus Substratumsatz pro Minute (Abbildung 4.32). Ein Substratabbau anderer mikrosomaler Enzyme wurde parallel für alle untersuchten Substrate durch Leervektorkontrollen gemessen und vom Substratumsatz der SIPXG subtrahiert.



**Abbildung 4.31 Umsätze von Terpenen durch die SIPXG.** Eingesetzt wurden 50 µg mikrosomale SIPXG, 50 nmol Substrat und 1250 nmol Wasserstoffperoxid, die Reaktionszeit betrug 40 Minuten. Die Extraktion der Terpene fand aus der Gasphase mittels SPME für 20 Minuten statt, gemessen wurde durch GC-MS. Quantifiziert wurde der Verbrauch an Terpenen im Vergleich zu einer Leervektorkontrolle.



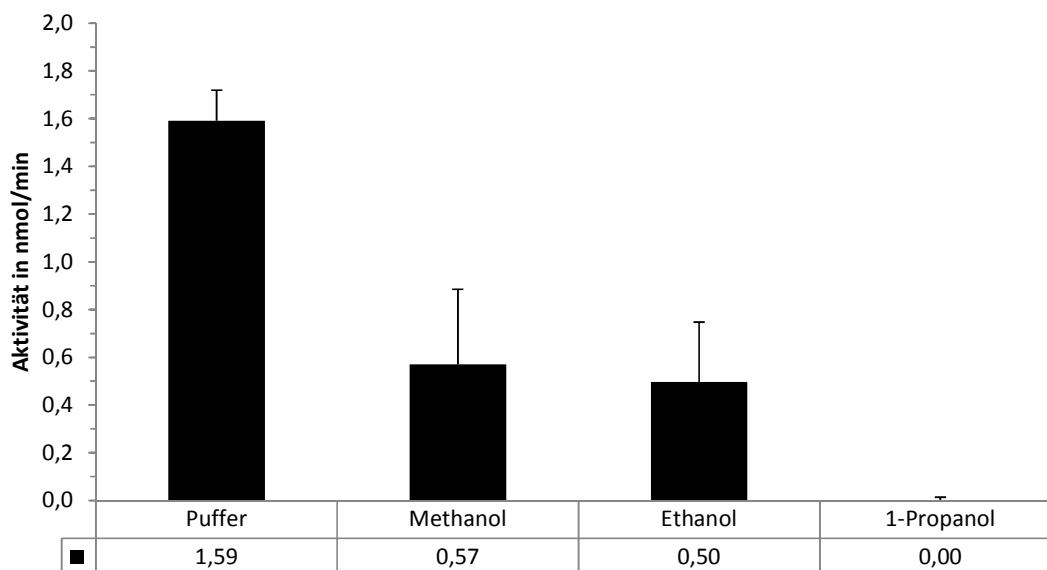
**Abbildung 4.32 Aktivität der SIPXG für die Oxidation von Terpenen.** Versuchsbedingungen wie in Abbildung 4.31.



#### 4.3.5 Oxidation in organischen Lösungsmitteln

Die meisten enzymatischen Reaktionen finden in wässriger Lösung statt. Dies liegt u.a. an der Eigenschaft des Wassers, welches über Wasserstoffbrücken die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine stabilisiert und sie in einer biochemisch optimalen Position hält. Ein organisches Lösungsmittel neigt dazu, diese dreidimensionale Proteinstruktur aufzubrechen, wodurch das Protein meist denaturiert und inaktiviert wird. In einigen Fällen wurden jedoch enzymatische Reaktionen in organischen Lösungsmitteln durchgeführt. So kann in alkoholischen Lösungen die Oxidation von Thioanisol durch eine Peroxidase katalysiert werden (Ryu und Dordick 1992). Der Vorteil eines organischen Lösungsmittels ist die höhere Löslichkeit eines lipophilen Substrats und/oder eines lipophilen Produktes. Eine höhere Substratlöslichkeit ermöglicht dem Substrat besser zum aktiven Zentrum des Enzyms zugewandert zu gelangen. Auf der anderen Seite kann ein besser gelöstes Produkt schneller aus dem aktiven Zentrum entweichen und das chemische Gleichgewicht zu Gunsten der Produktbildung verschieben.

In diesem Teil wurde versucht eine SIPXG katalysierte Oxidation von  $\gamma$ -Terpinen in verschiedenen Alkoholen zu erreichen. Das Protein wurde zusammen mit 100 nmol Substrat in Methanol, Ethanol, 1-Propanol oder Natriumacetatpuffer (Positivkontrolle) gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 2500 nmol Wasserstoffperoxid gestartet. Insgesamt betrug der wässrige Anteil im organischen Reaktionsansatz etwa 2,3 % (v/v) (Kapitel 3.4.14). Die Extraktion und Messung der  $\gamma$ -Terpinen-Abnahme fanden durch SPME in Kombination mit GC-MS statt. Zur Quantifizierung wurden in jedem der drei Alkohole sowie im wässrigen Puffer Eichkurven von  $\gamma$ -Terpinen erstellt (Anhang Kapitel 7.7.3). Anhand der Eichkurven wurden die Substratkonzentration und Substratstoffmenge nach erfolgter Enzymreaktion bestimmt. Daraus konnte die Aktivität als Substratumsatz pro Zeit berechnet werden. Ein Substratabbau anderer mikrosomaler Enzyme wurde parallel für alle untersuchten Substrate durch Leervektorkontrollen gemessen und vom Substratumsatz der SIPXG subtrahiert (Abbildung 4.33).



**Abbildung 4.33 Aromatisierung von  $\gamma$ -Terpinen durch die SIPXG in Puffer und Alkoholen.** 100  $\mu$ g mikrosomale SIPXG wurden in Natriumacetatpuffer (10 mmol/l, pH 6), Methanol, Ethanol oder 1-Propanol zusammen mit 100 nmol  $\gamma$ -Terpinen und 2500 nmol Wasserstoffperoxid inkubiert. Die Extraktion fand mittels SPME, die Messung mittels GC-MS statt. Eichkurven wurden mit  $\gamma$ -Terpinen in Puffer und den drei Alkoholen erstellt.

Bei Verwendung der Alkohole Methanol und Ethanol konnte eine enzymatische Aromatisierung von  $\gamma$ -Terpinen zu *p*-Cymol beobachtet und quantifiziert werden. Sie war jedoch deutlich niedriger als die Aktivität der PXG in Natriumacetat-Puffer und lag bei 35,9 bzw. 31,2 % der Aktivität im Puffersystem. In 1-Propanol konnte fast keine Aktivität festgestellt werden. Die drei untersuchten Alkohole begünstigten bei Einsatz als Lösungsmittel nicht die Oxidation von  $\gamma$ -Terpinen zu *p*-Cymol durch die SIPXG. Stattdessen war eine Aktivitätsabnahme der SIPXG bei abnehmender Polarität des Lösungsmittels zu erkennen.

## 4.4 Oxidation weiterer Naturstoffe

Zusätzlich zu den Terpenen wurden weitere flüchtige Lipide des Sekundärstoffwechsels der Pflanzen als potentielle Substrate für die SIPXG eingesetzt (Kapitel 3.4.10.2).

### 4.4.1 Substratscreening

Von den drei Verbindungen *cis*-Jasmon, Jasmonsäure und Jasmonsäuremethylester konnte nur für *cis*-Jasmon eine Oxidation festgestellt werden (Anhang Abbildung 7.21). Das

Massenspektrum des Produkts wurde anhand von Literaturangaben (Pinheiro et al. 2009) und Datenbank-Abgleich als *cis*-Jasmon-7,8-epoxid identifiziert. SIPXG epoxidierte *cis*-Jasmon an der 7,8-Position (Abbildung 4.34).

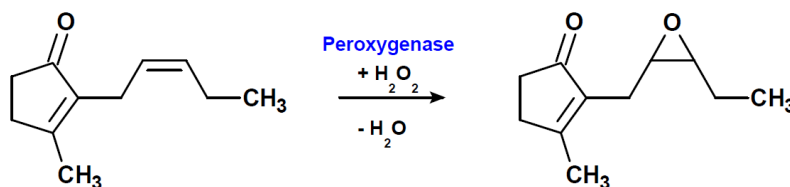


Abbildung 4.34 Epoxidierung von *cis*-Jasmon zu *cis*-Jasmon-7,8-epoxid durch SIPXG.

Die beiden aromarelevanten Stoffe Eugenol und Isoeugenol stellten keine Substrate der SIPXG dar. Es konnten keine Oxidationsprodukte detektiert werden.

*Cis*-Stilben besitzt zwischen den beiden Phenylresten eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung in *cis*-Konfiguration und stellt ein mögliches Substrat für eine Oxidation durch die PXG dar. Tatsächlich konnte eine Epoxidierung zu *cis*-Stilbenoxid durch Vergleich mit einer Referenzsubstanz festgestellt werden (Abbildung 4.35, Anhang Abbildung 7.22).

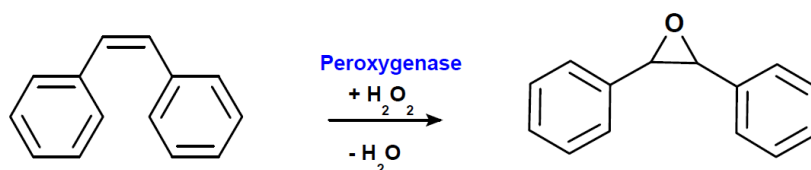


Abbildung 4.35 Epoxidierung von *cis*-Stilben zu *cis*-Stilbenoxid durch SIPXG.

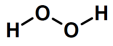

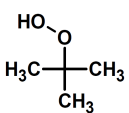
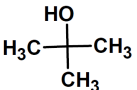
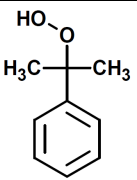
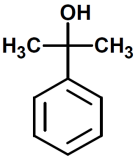
#### 4.4.2 Aktivitätsmessungen

Die Aktivität der PXG in Bezug auf die Epoxidierung von *cis*-Jasmon und *cis*-Stilben wurde durch Messung der Substratabnahme bestimmt. Hierfür wurden die Substrate nach erfolgter Enzymreaktion mittels SPME extrahiert und durch GC-MS gemessen (Kapitel 3.4.13). Anhand erstellter Eichkurven konnten die restlichen Substratmengen quantifiziert werden (Eichkurven siehe Kapitel 7.7.2). Die Differenz zwischen 50 nmol eingesetzter Stoffmenge und der restlichen Stoffmenge bezeichnet den Substratumsatz. Die Aktivität errechnet sich aus Substratumsatz pro Minute. Ein Substratabbau anderer mikrosomaler Enzyme wurde parallel durch Leervektorkontrollen gemessen und vom Substratumsatz der SIPXG subtrahiert. SIPXG setzte 11,2 und 9,8% an *cis*-Jasmon bzw. *cis*-Stilben um, wobei Aktivitäten von 0,14 bzw. 0,12 nmol/min erhalten wurden.

## 4.5 Einsatz verschiedener Hydroperoxide als Oxidationsmittel

Für die Oxidation eines Substrates durch eine PXG wird grundsätzlich ein Oxidationsmittel benötigt. Natürliche Oxidationsmittel für die PXG sind Fettsäurehydroperoxide, die aus der Reaktion einer Fettsäure mit molekularem Sauerstoff durch eine Lipoxygenase entstehen. Im Falle einer Epoxidierung oder Hydroxylierung wird vom Fettsäurehydroperoxid ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und das Fettsäurehydroperoxid wird zu einem Alkohol reduziert. Neben den Fettsäurehydroperoxiden wurden bereits alternative Hydroperoxide für eine Oxidation durch die PXG untersucht und eine Epoxidierung oder Sulfoxidation festgestellt (Blée et al. 1985; Blée et al. 1993). In dieser Arbeit wurde bisher Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel für verschiedene Substrate verwendet (Kapitel 4.2.5, 4.3.3 und 4.4). Im folgenden Teil wurden tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid als Oxidationsmittel für die Oxidation durch SIPXG untersucht (Tabelle 4.6).

**Tabelle 4.6 Hydroperoxide als Oxidationsmittel der SIPXG.**

Substrat	Produkt
 Wasserstoffperoxid	 Wasser
 tertiäres Butylhydroperoxid	 tertiäres Butanol
 Cumolhydroperoxid	 1-Hydroxycumol

### 4.5.1 Epoxidierung, Hydroxylierung und Aromatisierung durch tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid

Tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid wurden als alternative Oxidationsmittel für die Umsetzung von Ölsäure, (S)-(-)-Limonen,  $\alpha$ -Terpinen und  $\gamma$ -Terpinen verwendet (Kapitel 3.4.11).

Eine Epoxidierung der Ölsäure konnte sowohl bei Verwendung von tertiärem Butylhydroperoxid als auch Cumolhydroperoxid beobachtet werden. Das Produkt ist wie bei der Oxidation durch Wasserstoffperoxid die 9,10-Epoxy-octadecansäure. In Kontrollversuchen (Leervektorkontrolle, ohne Protein, ohne Hydroperoxid) entstand kein Epoxid.

(S)-(-)-Limonen wurde durch tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid jeweils zu (S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid oxidiert, die Reaktion glich jener mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel.

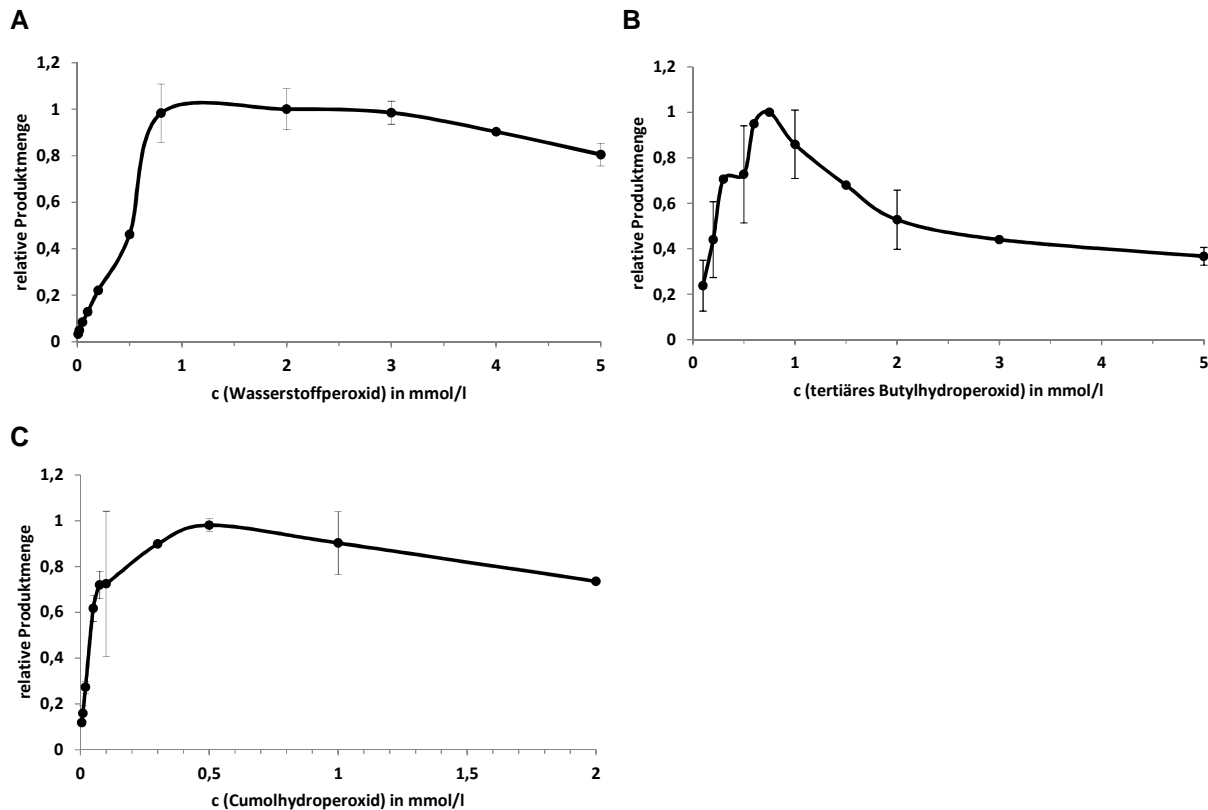
Eine Hydroxylierung konnte bei  $\alpha$ -Terpinen als Substrat festgestellt werden. Durch die beiden Hydroperoxide wurde  $\alpha$ -Terpinen zu *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en oxidiert.

Auf  $\gamma$ -Terpinen wurde durch die SIPXG kein Sauerstoffatom übertragen, stattdessen wurde es zu *p*-Cymol aromatisiert. Diese Reaktion fand mit tertiärem Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid als Oxidationsmittel statt.

Zusammenfassend wurden die vier untersuchten Substrate nicht nur durch Wasserstoffperoxid sondern auch durch tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid durch die SIPXG oxidiert. Bei jedem Oxidationsmittel entstanden die gleichen Oxidationsprodukte.

#### 4.5.2 Enzymsättigungen durch Hydroperoxide

Sättigungskurven der PXG in Bezug auf die Epoxidierung von Ölsäure wurden für Wasserstoffperoxid, tertiäres Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid erstellt (Tabelle 4.6). Proteinmenge und Konzentration der Ölsäure blieben konstant, die Konzentration der Hydroperoxide wurde variiert (Kapitel 3.4.12). Da zur Zeit der Messung keine Referenzsubstanz für das Oxidationsprodukt 9,10-Epoxy-octadecansäure vorlag, konnten die absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten nicht berechnet werden. Deshalb wurden die jeweiligen relativen Mengen des Produkts gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 4.36).



**Abbildung 4.36 Hemmung der Produktbildung der SIPXG bei zunehmenden Konzentrationen an Hydroperoxid.** Untersucht wurde die Epoxidierung von Ölsäure mit verschiedenen Hydroperoxiden. Das methylierte Oxidationsprodukt 9,10-Epoxy-octadecansäure wurde mit GC-MS gemessen und dessen relative Mengen bei ansteigender Hydroperoxidkonzentration dargestellt. Folgende Hydroperoxide wurden verwendet: **A** Wasserstoffperoxid, **B** tertiäres Butylhydroperoxid, **C** Cumolhydroperoxid.

Bei niedrigen Hydroperoxidkonzentrationen stieg die Menge des Epoxidproduktes zunächst steil an. Das Maximum der Produktbildung wurde bei 1 mmol/l Wasserstoffperoxid, 0,75 mmol/l tertiäres Butylhydroperoxid bzw. 0,5 mmol/l Cumolhydroperoxid erreicht. Das Produktmaximum bei Wasserstoffperoxid zeigte ein kleines Plateau, was vermutlich als Sättigung zu sehen ist. Mit zunehmender Hydroperoxidkonzentration sank die Produktkurve und verhielt sich wie beim tertiärem Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid. Die Hydroperoxide scheinen somit die Aktivität der SIPXG bei höheren Konzentrationen zu hemmen. Eine Produkthemmung durch die gebildete 9,10-Epoxy-octadecansäure kann ausgeschlossen werden. Die gleiche Ausgangskonzentration der Ölsäure von 0,5 mmol/l führte nicht zu einer inhibierenden Konzentration an 9,10-Epoxy-octadecansäure (Abbildung 4.18). Die Hemmkurven der SIPXG bei Einsatz verschiedener Hydroperoxidkonzentrationen ermöglichten die Bestimmung der jeweiligen  $K_m$ -Werte (Tabelle 4.7). Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit auf Grund von zum Zeitpunkt der Messung fehlender 9,10-Epoxy-

octadecansäure als Referenzsubstanz nicht berechnet werden konnte, wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit einer relativen Produktmenge von 1 gleichgesetzt.

**Tabelle 4.7  $K_m$ -Werte der SIPXG für Hydroperoxide.**

<b>Hydroperoxid</b>	<b><math>K_m</math>-Wert in mmol/l</b>
Wasserstoffperoxid	0,6
Tertiäres Butylhydroperoxid	0,25
Cumolhydroperoxid	0,05

#### **4.5.3 Vergleich von Wasserstoffhydroperoxid, Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid als Oxidationsmittel**

Die drei Hydroperoxide wurden untereinander verglichen, um herauszufinden, mit welchem Hydroperoxid die SIPXG die größtmögliche Produktmenge synthetisieren kann. Es wurden diejenigen Konzentrationen eingesetzt, welche entweder im gesättigten Bereich der Produktkurve lagen oder eine maximale Syntheseleistung an 9,10-Epoxy-octadecansäure erbrachten. Diese waren 2,5 mmol/l Wasserstoffperoxid, 0,75 mmol/l tertiäres Butylhydroperoxid und 0,5 mmol/l Cumolhydroperoxid (Abbildung 4.36). Als Reaktion zum Vergleich der drei Hydroperoxide wurde die Epoxidierung von Ölsäure gewählt (Kapitel 3.4.10.1 und 3.4.11). Der Vergleich zeigte, dass mit Wasserstoffperoxid die maximale Menge am Epoxidprodukt durch die SIPXG synthetisiert wurde. Dagegen wurden mit tertiärem Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid nur 0,43 bzw. 0,32 dieser Maximalmenge erreicht. Die relativen Produktmengen korrelierten mit den eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Hydroperoxide: 2,5 mmol/l Wasserstoffperoxid, 0,75 mmol/l tertiäres Butylhydroperoxid und 0,5 mmol/l Cumolhydroperoxid stehen im Verhältnis von 1:0,3:0,2. Obwohl die Konzentrationen vom tertiärem Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid geringer als die Konzentration vom Wasserstoffperoxid waren, führten höhere Konzentrationen jener beiden Hydroperoxide nicht zu einer Steigerung der Syntheseleistung. Der Grund liegt in einer Hemmung der SIPXG bei Hydroperoxidkonzentrationen, die über die Konzentration der maximalen Produktbildung hinausgehen (Abbildung 4.36).

## 4.6 Expressionsmuster der *SIPXG*

Die Aufgabe der Peroxygenase innerhalb der Pflanzenzelle ist vermutlich die Epoxidierung ungesättigter Fettsäuren. Die Enzymprodukte sind Vorstufen von Cutin, ein wichtiger Bestandteil der pflanzlichen Cuticula, mit der sich die Pflanze vor Pathogenbefall und großem Wasserverlust schützt. Zu den Produkten der Peroxygenase zählen aber auch Vorstufen der Oxylipine und Phytoalexine, die in Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen eine Rolle spielen (Blée 1998b). Die Bedeutung der Peroxygenase für diese ökologischen Funktionen konnte in diversen Stresstests auf Ebene der Genexpression als auch auf Ebene der Proteinsynthese in *A. thaliana* gezeigt werden (Partridge und Murphy 2009).

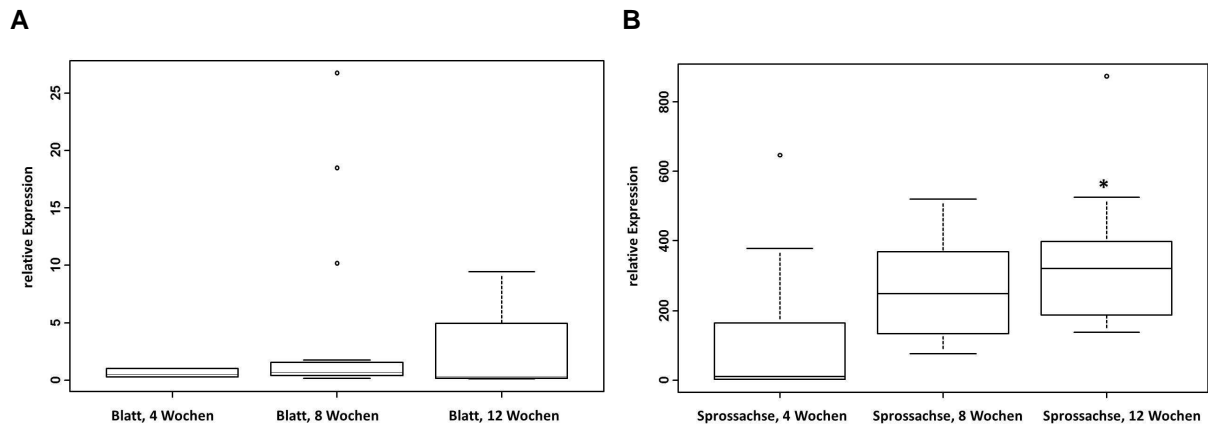
Eine Untersuchung der Expression des Gens, welches die Peroxygenase in *Solanum lycopersicum* (Tomate) kodiert, wurde bisher nicht durchgeführt. In diesem Teil der Arbeit wurde die Genexpression in vegetativen Pflanzenteilen wie Sprossachse und Blatt sowie in Tomatenfrüchten bestimmt.

### 4.6.1 Vegetative Pflanzenorgane

Die Expression der *SIPXG* wurde in vier, acht und zwölf Wochen alten Blättern und Sprossachsen untersucht. Für die vierwöchigen Entwicklungsstufen von Blatt und Sprossachse lagen je drei, für die acht- und zwölfwöchigen lagen je fünf Pflanzenproben vor. Die RNA wurde aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und von genomischer DNA durch DNase-Verdau gereinigt (Kapitel 3.3.1 und 3.3.4). Zum Quantifizieren wurde von jeder Pflanzenmaterialprobe 0,3 µg Gesamt-RNA eingesetzt, um sie in cDNA umzuschreiben (Kapitel 3.3.5). Die cDNA wurde in einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) eingesetzt. Ein Oligonukleotid-Paar war spezifisch für die *SIPXG*, ein zweites Oligonukleotid-Paar war spezifisch für die Spacer-Region zwischen den 16S- und 23S-rRNA-Abschnitten und wurde als interner Standard verwendet (Kapitel 3.3.6). Die RNA, die die *SIPXG* kodiert, konnte quantifiziert und die Expression des Gens der jeweiligen Pflanzenorgane in Relation zu einander gestellt werden.

In den Blättern konnte keine signifikante Änderung der *SIPXG*-RNA-Synthese im Verlauf der Zeit festgestellt werden (Abbildung 4.37 A). In der Sprossachse wurde eine Zunahme der *SIPXG*-Expression beobachtet. Nach zwölf Wochen war die Expression signifikant höher (6,7fach) als nach vier Wochen (Wilcoxon–Mann–Whitney U-Test, p-Wert = 0,014; Abbildung 4.37 B).





**Abbildung 4.37 Relative Expression der *SIPXG* in *S. lycopersicum* 4, 8 und 12 Wochen nach Aussaat.** Für die vierwöchigen Entwicklungsstufen lagen je drei, für die acht- und zwölfwöchigen lagen je fünf Proben von Blättern (A) und Sprossachsen (B) vor. Die RNA-Synthese wurde mittels qPCR untersucht. Der Wilcoxon–Mann–Whitney U-Test diente der statistischen Analyse (\*  $p < 0,05$ ).

Ein Vergleich von Blatt und Sprossachse machte deutlich, dass die Expression in der Sprossachse vier Wochen nach Aussaat 2,5fach, acht Wochen nach Aussaat 58fach und zwölf Wochen nach Aussaat 130fach so hoch wie in den Blättern zum gleichen Zeitpunkt war. Nach acht und zwölf Wochen konnte eine signifikant höhere Expression in den Sprossachsen im Vergleich zur Expression in den Blättern festgestellt werden (Wilcoxon–Mann–Whitney U-Test, beide p-Werte = 0,0009).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die *SIPXG* in Blatt und Sprossachse unterschiedlich exprimiert wurde. Die Expression war im Blatt zu jedem der untersuchten Zeitpunkte sehr niedrig.

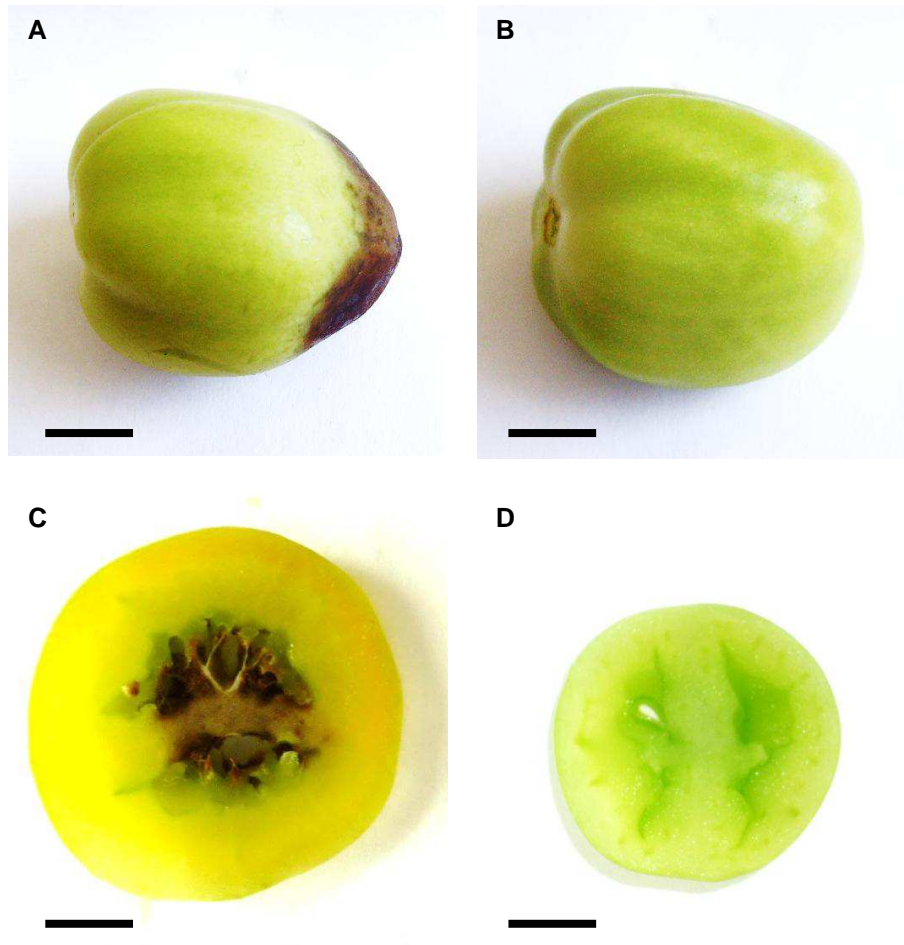
#### 4.6.2 Generative Pflanzenorgane

Während der Fruchtentwicklung wiesen einige noch unreife Früchte dunkle Flecken im unteren Fruchtbereich auf. Es handelt sich dabei um eine Blütenendfäule (Abbildung 4.38). Die Blütenendfäule ist eine Stoffwechselerkrankung, deren Ursache in einem Calciummangel vermutet wird (Saure 2001). Die faulenden Stellen verfärbten sich im Laufe der Fruchtentwicklung teilweise schwarz und blieben bis zum Reifestadium erhalten.



**Abbildung 4.38 Blütenendfäule an einer grünen, unreifen Frucht an einer Tomatenpflanze.** Die dunklen Stellen im unteren Teil der Frucht rühren von Nekrose her.

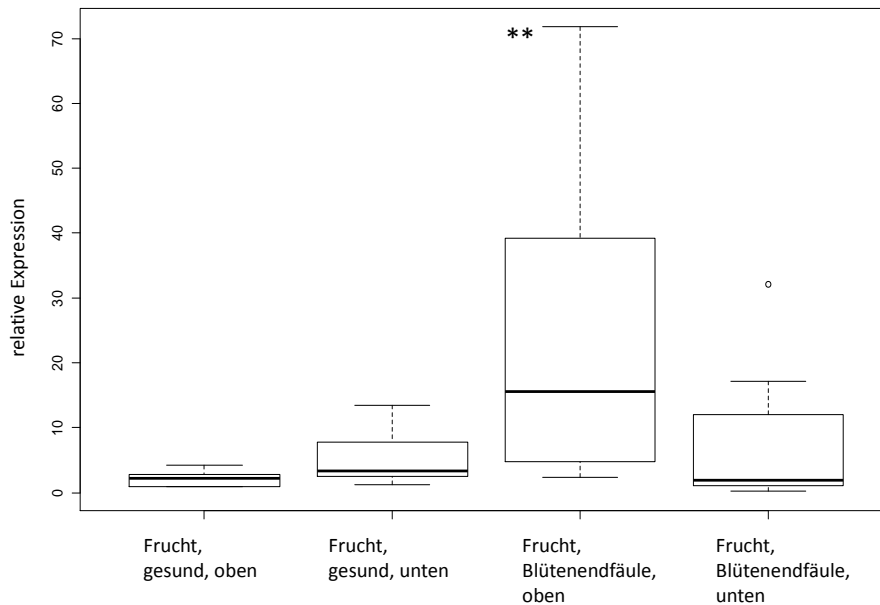
Betroffen war in jedem Entwicklungsstadium der untere Fruchtteil, der der ehemaligen Narbe zugewandt war. Das untere Viertel, teilweise auch das untere Drittel wiesen eine deutliche dunkelbraune bis schwarze Färbung auf (Abbildung 4.39 A). Anhand eines Querschnitts konnte gezeigt werden, dass die Fäule im Inneren der Frucht weiter fortgeschritten war als von außen sichtbar. Stellenweise reichte die Blütenendfäule bis zur Plazenta, während das Perikarp verschont blieb (Abbildung 4.39 C).



**Abbildung 4.39 Blütenendfäule an Tomate: Vergleich befallener und gesunder Früchte.** Maßstab 1 cm. **A** Frucht mit Blütenendfäule, **B** gesunde Frucht, **C** Querschnitt einer Frucht mit Blütenendfäule, **D** Querschnitt einer gesunden Frucht.

Neben der Untersuchung der Expression der *SIPXG* in Früchten mit und ohne Blütenendfäule wurde die Expression im oberen und unteren Teil der Früchte miteinander verglichen.

Je drei gesunde und kranke Früchte wurden im unreifen Stadium und mit einem Gewicht von etwa 50 g geerntet. Von jeder Frucht wurde aus den oberen, dem Stielansatz zugewandten Zweidrittel und dem unteren Drittel der Frucht die Gesamt-RNA getrennt extrahiert, gereinigt (Kapitel 3.3.1 und 3.3.4) sowie die RNA, die die *SIPXG* kodiert, quantifiziert (Kapitel 3.3.5 und 3.3.6, Abbildung 4.40).



**Abbildung 4.40 Relative Expression der *SIPXG* in Früchten von *S. lycopersicum*.** Unter dem Aspekt der Blütenendfäule wurde die Expression in den oberen Zweidritteln der Früchte mit der Expression im unteren Drittel verglichen. Die RNA wurde aus je drei gesunden und kranken Früchten extrahiert und mittels qPCR gemessen. Der Wilcoxon–Mann–Whitney U-Test diente der statistischen Analyse (\*\* p < 0,01).

Ein Vergleich der Expression in gesunden Früchten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen oberen und unteren Fruchtabschnitt (Wilcoxon–Mann–Whitney U-Test, p-Wert = 0,093). Im Gegensatz dazu unterschied sich die Expression der *SIPXG* in Früchten, die mit Blütenendfäule befallen waren. Im oberen Fruchtabschnitt war die Expression signifikant höher als im unteren Fruchtabschnitt, dessen Expressionsstufe auf der Höhe einer gesunden Frucht lag (p-Wert = 0,024).

Ein Vergleich der Expression in gesunden und befallenen Früchten im jeweils oberen Fruchtabschnitt ergab eine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,002. Die Expression der *SIPXG* ist in Früchten, die mit Blütenendfäule befallen sind, um das 11fache höher als in gesunden Früchten.

Zwischen den unteren Fruchtabschnitten von gesunden und befallenen Früchten gab es keinen signifikanten Unterschied der Expression (p-Wert = 0,667).

Zusammenfassend zeigt das Expressionsmuster der *SIPXG* in Früchten, dass die *SIPXG* gleichmäßig verteilt in der gesunden Frucht exprimiert wurde. Der Befall mit der Blütenendfäule erhöhte die Expression in oberen Fruchtabschnitten signifikant, während die Expression in unteren Abschnitten in der Größenordnung der gesunden Früchte lag.

## 5 Diskussion

Mit dem Schwinden der Erdgas- und Erdölvorkommen werden langfristig die wichtigsten Rohstoffquellen für die organisch-chemische Industrie verloren gehen. Für die Herstellung organischer Produkte sind jedoch kohlenstoffhaltige Ausgangsstoffe unverzichtbar. Industriepflanzen liefern pflanzliche Rohstoffe wie Kohlenhydrate, fette Öle und Terpene, die auch heute schon eine wichtige Rolle bei Synthesen innerhalb der „Grünen Chemie“ spielen. Diese Rohstoffe werden auf Grund ihrer regenerativen Herkunft als nachwachsende Rohstoffe bezeichnet. Sie sind eine alternative Kohlenstoffquelle und können die Lücke schließen, die durch den Wegfall der fossilen Rohstoffe entstehen wird (Bader et al. 2009). Nachwachsenden Rohstoffe können entweder direkt genutzt oder durch chemische und/oder biotechnologische Modifikationen umgewandelt werden (Corma et al. 2007). Gerade die biotechnologische Behandlung von Naturstoffen durch Mikroorganismen und Enzyme hat sich wegen ihrer Umweltverträglichkeit und gezielten enantioselektiven Synthese in den letzten Jahren mehr und mehr etabliert (Schmid 2006; Bader et al. 2009).

### 5.1 Expression einer rekombinanten PXG aus *S. lycopersicum*

In dieser Arbeit wurde eine Peroxygenase aus *S. lycopersicum* (Tomate; SIPXG) als Biokatalysator für eine biotechnologische Funktionalisierung diverser Naturstoffe erforscht. Im Gegensatz zu anderen Studien, bei welchen eine Peroxygenase (PXG) aus *A. sativa* isoliert und auf Einsatzmöglichkeiten einer biotechnologischen Anwendung untersucht wurde (Piazza et al. 2000, 2001, 2003), wurde hier mit einem rekombinanten Enzym gearbeitet. In der Literatur wurde bisher nur zweimal von rekombinanten PXGs berichtet; sie stammten aus *A. sativa* und *A. thaliana* und wurden in *E. coli*, *P. pastoris* bzw. *S. cerevisiae* heterolog exprimiert (Meesapyodsuk und Qiu 2011; Hanano et al. 2006). Diese Art der Enzymherstellung ist unabhängig von Pflanzenmaterial, verläuft rasch und ermöglicht außerdem die Herstellung von Proteinen, die nach einer gerichteten Mutation eine veränderte Aktivität, Substrat- oder Wirkungsspezifität aufweisen können (Hanano et al. 2006).

Da die PXG ein Membranprotein des ERs und der Ölkörperchen ist (Hanano et al. 2006), sind eukaryotische Zellen mit einem Endomembransystem für eine heterologe Expression der PXG vorteilhaft. Deswegen wurde *S. cerevisiae* zur Überexpression der SIPXG ausgewählt. Hierfür wurde das kodierende Gen (*SIPXG*) in den Hefeexpressionsvektor pYES2 kloniert. Das offene Leseraster der *SIPXG* (Unigene-ID SGN-U567002) stammte von der Datenbank

<http://solgenomics.net/index/pl>. Durch eine Proteinsequenzanalyse und ein Vergleich der SIPXG mit anderen PXGs wurde eine Transmembrandomäne im mittleren Bereich der SIPXG festgestellt, welche für die Integration in die ER-Membran verantwortlich ist (Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6). Tatsächlich konnte in gefällten und abgetrennten Hefemikrosomen, die ein Relikt des ERs sind, die überexprimierte SIPXG im SDS-Gel und in einem Aktivitätstest identifiziert werden. Zusätzlich dazu wurde die Aktivität der SIPXG in den isolierten Mikrosomen gesteigert, indem nach Zugabe des Detergenz Tween® 20 homogenisiert wurde. Auf diese Weise wurde das Protein aus der mikrosomalen Membran gelöst (Kapitel 4.1.4 und Abbildung 4.8). Hanano et al. (2006) und Meesapyodsuk und Qiu (2011) kamen zu einem vergleichbaren Ergebnis. Sie überexprimierten eine PXG in *S. cerevisiae* bzw. *P. pastoris* und konnten das Protein mit höchster Enzymaktivität in der Mikrosomenfraktion nachweisen. Statt durch eine PEG-Fällung wie hier durchgeführt wurden dabei die Hefemikrosomen durch eine Ultrazentrifugation von den restlichen Zellorganellen getrennt.

Neben einer Transmembrandomäne besitzt eine PXG auch ein EF-Hand-Motiv zur Bindung von Calciumionen. Die PXG zählt deshalb zur Gruppe der Calciosine (Hanano et al. 2006). Das EF-Hand-Motiv ist ein sehr konservierter Abschnitt des Proteins und liegt in der SIPXG wie bei den anderen PXGs in der vorderen Hälfte der Proteinsequenz (Abbildung 4.6). Durch die vergleichende Proteinsequenzanalyse konnten auch die zwei Histidinreste identifiziert werden, welche das Häm im aktiven Zentrum binden. Das Eisenion des Hämmoleküls ist an der Übertragung eines Sauerstoffatoms vom Hydroperoxid auf ein Substrat maßgeblich beteiligt (Blée et al. 1993). Natriumazid oder das Organophosphorothioat Terbufos binden irreversibel an das Hämeisen der prosthetischen Gruppe und hemmen dadurch die PXG. Der  $IC_{50}$  von Terbufos beträgt  $20 \mu\text{mol/l}$  (Blée und Durst 1986; Lequeu et al. 2003). In die Liste der Inhibitoren reiht sich Tetcyclacis ein, welches für die SIPXG einen  $IC_{50}$  von  $2,6 \mu\text{mol/l}$  aufweist (Kapitel 4.1.5). Tetcyclacis ist ein Wachstumsregulator, der an die prosthetischen Gruppen der Monooxygenasen innerhalb der Biosynthese von Gibberellinsäure bindet und dadurch zu einer Hemmung dieser Enzyme führt (Rademacher et al. 1987). Da eine PXG wie eine Monooxygenase auch ein Hämoprotein ist, ist eine Bindung von Tetcyclacis an die prosthetische Gruppe der PXG wahrscheinlich.

## 5.2 Epoxidierung von Fettsäuren und Fettsäurederivaten

Fettsäuren werden aus pflanzlichen Ölen durch Hydrolyse der Triglyceride gewonnen. Sie können funktionalisiert und in der Industrie zur Synthese von verschiedenen Oleochemikalien

herangezogen werden. Eine von vielen Fettsäurefunktionalisierungen ist die Epoxidierung ungesättigter Fettsäuren zu Fettsäureepoxiden. Diese Verbindungen sind zum einen wichtige Bestandteile von Schmier- und Flammschutzmitteln, zum anderen dienen sie als Plattformchemikalien (Corma et al. 2007). Durch eine Epoxidhydrolyse entstehen beispielsweise Diole, die zur Synthese von Polyurethankunststoffen herangezogen werden können (Gruber et al. 1987). In der industriellen Anwendung werden ungesättigte Fettsäuren und Fettsäurederivate durch die Prileschajew-Reaktion an ihren Kohlenstoffdoppelbindungen chemisch epoxidiert (Prileschajew 1909; Abbildung 1.1). Um die Racematbildung einer solchen chemischen Epoxidierung zu umgehen, können ungesättigte Kohlenstoffverbindungen auch durch Mikroorganismen oder Enzyme in enantiomerenreine Epoxide umgewandelt werden (Besse und Veschambre 1994). Speziell mit einer enzymatischen Epoxidierung von Fettsäuren und Fettsäurederivaten im biotechnologischen Sinne haben sich bisher nur wenige Studien beschäftigt. Die in dieser Arbeit untersuchte rekombinante SIPXG stellt eine weitere Möglichkeit der enzymatischen Fettsäureepoxidierung dar. Dieses Enzym vermag verschiedene ungesättigte Fettsäuren und deren Derivate an ihren Doppelbindungen zu epoxidieren. Das dafür verwendete Wasserstoffperoxid fungiert als umweltfreundliches Oxidationsmittel, das während der Epoxidierung zu Wasser reduziert wird. Die Epoxidierungen von Ölsäure und Ölsäuremethylester durch die SIPXG resultierten in den entsprechenden 9,10-Monoepoxiden (Abbildung 4.13), wie es auch für eine PXG aus *G. max* (Blée et al. 1993) und *A. sativa* (Hamberg und Hamberg 1996; Piazza et al. 2003; Meesapyodsuk und Qiu 2011) der Fall ist. Der  $K_m$ -Wert für Ölsäure beträgt 0,071 mmol/l und bestätigt damit Literaturdaten (0,02 mmol/l, Blée und Schuber 1990). Während SIPXG Ölsäure und Ölsäuremethylester jeweils zu Epoxiden mit Erhalt der *cis*-Konfiguration umwandelte, oxidierte mCPBS die beiden Substrate jeweils zum *cis*-Epoxid als Hauptprodukt und zum *trans*-Epoxid als Nebenprodukt (Abbildung 4.12). Obwohl eine Isomerisierung der Kohlenstoff-Doppelbindung für eine Oxidation mit mCPBS nicht bekannt ist (Besse und Veschambre 1994), haben die Reaktionsbedingungen dieser Arbeit teilweise eine Isomerisierung von *cis* zu *trans* hervorgerufen, woraus letztendlich zwei Monoepoxide resultierten. Neben Ölsäure wurden auch Oleylalkohol und Eicosensäure mittels SIPXG zu Monoepoxiden umgesetzt (Abbildung 4.13 und Abbildung 4.16). Dass Erucasäuremethylester nicht oder nur in nicht detektierbaren Mengen epoxidiert wurde, hängt vermutlich mit der Kettenlänge der Fettsäure zusammen. Meesapyodsuk und Qiu (2011) stellten fest, dass Fettsäuren mit Kettenlängen über C18 hinaus mit geringerer Aktivität von einer PXG aus *A. sativa* epoxidiert wurden. Die

Aktivität zur Epoxidierung von Erucasäure lag bei diesem Enzym bei etwa 54 % im Vergleich zur Epoxidierung von Ölsäure.

Unter den mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurden konjugierte (10 *trans*, 12 *cis*) Linolsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure durch die SIPXG epoxidiert. Da die PXG *cis*-Doppelbindungen gegenüber den *trans*-Doppelbindungen bevorzugt (Blée und Schuber 1990a; Meesapyodsuk und Qiu 2011), epoxidierte SIPXG die konjugierte (10 *trans*, 12 *cis*) Linolsäure ausschließlich zu 12,13-Epoxy-10-octadecensäure (Abbildung 4.15). Dadurch konnte sogar innerhalb eines Moleküls die Präferenz der SIPXG für die Epoxidierung einer *cis*-Doppelbindung gezeigt werden. Eine chemische Epoxidierung mit mCPBS lieferte zusätzlich zur 12,13-Epoxy-10-octadecensäure ein zweites Produkt mit einem unterschiedlichen Massenspektrum. Da die Epoxidierung mit mCPBS zwischen *cis*- und *trans*-Doppelbindungen nicht unterscheidet, kann es sich bei diesem Produkt um die 10,11-Epoxy-12-octadecensäure oder auch um die 10,11-12,13-Diepoxyoctadecensäure handeln (Anhang Abbildung 7.25). Im Falle der Linolsäure konnte keine Regioselektivität für die Epoxidierung durch die SIPXG festgestellt werden. Die beiden entstandenen Monoepoxide lagen im Verhältnis von etwa 1:1 vor. Dies unterscheidet die SIPXG von einer PXG aus *G. max*, bei welcher mit mehr als 72 % die 9,10-Epoxy-12-octadecensäure das Hauptprodukt ist (Blée und Schuber 1990a). Im Gegensatz zu diesen beiden PXGs epoxidiert eine Variante aus *A. sativa* Linolsäure sowohl zu Monoepoxiden als auch zu Diepoxiden (9,10-Epoxyd/12,13-Epoxyd/Diepoxyd mit 25:23:47 %) (Piazza et al. 2003). Weitere Unterschiede liegen bei der Epoxidierung von  $\alpha$ -Linolensäure vor. Während SIPXG 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäure als Hauptprodukt bildet (68 %; Abbildung 4.17), entsteht durch eine PXG aus *A. sativa* mit 92 % die 9,10-15,16-Diepoxy-12-octadecensäure. Sowohl bei der SIPXG als auch bei einer PXG aus *A. sativa* führt eine Erhöhung der zugesetzten Hydroperoxidmenge nicht zu einer Vermehrung der Epoxidgruppen innerhalb der Linolensäure. Die Regioselektivität der jeweiligen PXG bleibt trotzdem erhalten (Piazza et al. 2003). Diese Vergleiche der qualitativen Untersuchung der Epoxide zeigen deutlich, dass die PXGs verschiedener Pflanzengattungen Fettsäuren regioselektiv epoxidieren. Die verschiedenen Enzyme eröffnen somit die Möglichkeit, definierte Epoxide mit gewünschter Selektivität zu synthetisieren.

Durch die SIPXG konnte für alle untersuchten Fettsäuren keine vollständige Umsetzung erreicht werden (Abbildung 4.20). Die Ausbeute kann vermutlich dadurch verbessert werden, indem für einen längeren Zeitraum sowie mit mehrmaliger Zufuhr des Hydroperoxids inkubiert wird (Piazza et al. 2003). Für die Oxidation der  $\alpha$ -Linolensäure konnte bereits eine vermehrte Produktbildung in einem großen Reaktionsansatz gezeigt werden (Anhang



Abbildung 7.2). Die relativen Aktivitäten der SIPXG in Bezug auf die Epoxidierung von Fettsäuren und Fettsäurederivate unterscheiden sich von anderen PXGs. Während die SIPXG  $\alpha$ -Linolensäure und Eicosensäure am besten und Ölsäure und Ölsäuremethylester mit 42 bzw. 38 % jener Aktivität umsetzte (Abbildung 4.20), epoxidiert eine PXG aus *A. sativa* in umgekehrter Reihenfolge. Ölsäure und Ölsäuremethylester werden am besten epoxidiert, Eicosensäure mit 75 % und Linol- und  $\alpha$ -Linolensäure mit etwa 50 % der Aktivität für Ölsäure (Meesapyodsuk und Qiu 2011).

Neben der PXG und der zu oxidierenden Fettsäure ist auch die Wahl des Hydroperoxids ausschlaggebend für die Umsatzrate. Sowohl mit Wasserstoffperoxid als auch mit tert-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid als Oxidationsmittel entstand aus Ölsäure 9,10-Epoxy-octadecansäure. Der  $K_m$ -Wert für Cumolhydroperoxid entspricht mit 0,05 mmol/l in etwa dem  $K_m$ -Wert, der mit einer PXG aus *G. max* ermittelt wurde (0,063 mmol/l) (Blée und Schuber 1990a). Die  $K_m$ -Werte für Wasserstoffperoxid und tertiärem Butylhydroperoxid liegen eine Größenordnung höher (0,6 bzw. 0,25 mmol/l). Die relativen Mengen des entstandenen Epoxids waren hydroperoxidabhängig. Die Ausbeute war mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel am größten, mit tert-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid war sie deutlich geringer. Ein komplett entgegengesetztes Ergebnis wurde mit einer PXG aus *A. sativa* erhalten. Hierbei epoxidierte tert-Butylhydroperoxid Ölsäure am besten, Cumolhydroperoxid und Wasserstoffperoxid ergaben 0,7 bzw. 0,2 jener Menge an 9,10-Epoxy-octadecansäure (Piazza et al. 2000).

Schlussfolgernd machen diese Ergebnisse zur Oxidation von Fettsäuren deutlich, dass die SIPXG bei Anwesenheit eines Hydroperoxids an Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren und Fettsäurederivate Epoxidgruppen einfügen kann. Die Versuche machen anschaulich, dass es Unterschiede unter den verschiedenen Isoformen der PXG in Bezug auf Substratspezifität und Umsatzraten sowohl für die Fettsäure als auch das Hydroperoxid gibt. Abweichende Regioselektivitäten der PXGs ermöglichen die gezielte Epoxidierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

### 5.3 Oxidationen von Terpenen und anderen flüchtigen Naturstoffen

Zu den Terpenen zählen lipophile Moleküle, welche unterschiedliche, oft ökologische Funktionen in der Pflanze erfüllen. Kleine Terpene mit einem  $C_{10}$ -Kohlenstoffgerüst (Monoterpene) sind leicht flüchtige, oft geruchsintensive Verbindungen. Zu ihnen zählen Abwehrstoffe gegenüber Pathogenen, Harzbestandteile und Monomere für die

Ligninbiosynthese. Unter den Terpenen mit einem Gerüst aus 15 oder 20 Kohlenstoffatomen (Sesqui- bzw. Diterpene) gibt es Phytoalexine und Phytohormone. Tri- und Tetraterpene besitzen ein Kohlenstoffgerüst mit 30 bzw. 40 Kohlenstoffatomen; darunter befinden sich u. a. Photosynthesepigmente wie Carotine und Xanthophylle (Heldt und Heldt 2003; Taiz und Zeiger 2006). In Bezug auf diese Vielfalt stellen Terpene die größte Klasse an sekundären Pflanzenstoffen dar. Sie können entweder direkt oder nach Umwandlung der Molekülstruktur kommerziell genutzt werden. Vor allem die Terpene, die in der Natur mengenmäßig häufig vorkommen (z. B. Limonen der Zitrus-Industrie oder Pinene der Holzindustrie), werden in Industrie und Technik verschiedenen Anwendungen unterzogen (Corma et al. 2007). Neben den chemischen stehen auch biotechnologische Methoden auf Grund ihrer Stereoselektivität im Fokus der Terpenumwandlung. Die Tatsache, dass Terpene oft eine oder mehrere Kohlenstoffdoppelbindungen enthalten und die PXG solche grundsätzlich zu epoxidieren vermag, veranlasste eine Untersuchung der Epoxidierung von Terpenen (und auch weiteren Naturstoffen) durch die rekombinante SIPXG.

### 5.3.1 Epoxidierungen

Für die beiden untersuchten Limonenisomere (R)-(+)-Limonen und (S)-(-)-Limonen wurde eine regioselektive und stereoselektive Epoxidierung durch die SIPXG nachgewiesen. Die Produkte sind die beiden Diastereomere (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid bzw. (S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid (Abbildung 4.22). Die Bildung von (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid wurde bereits von (Saladino 2003) durch Oxidation von (R)-(+)-Limonen mit Wasserstoffperoxid und einem Methylrheniumtrioxid-Katalysator erzielt. Bhattacharjee et al. (2004) synthetisierten (R)-(+)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid mit molekularem Sauerstoff und einem manganhaltigen Katalysator. Die Umsätze beider chemischer Oxidationen lagen bei 75 bzw. 97 % und somit deutlich höher als die Epoxidierung durch die SIPXG (39 %). Im Gegensatz dazu besteht das enzymatische Epoxid zu 97 % aus einem Diastereomer und ist reiner als die chemischen Epoxide (max. 89 % bei Saladino 2003, max. 93 % bei Bhattacharjee et al. 2004). Im Vergleich mit anderen biotechnologischen Epoxidierungen arbeitet die SIPXG deutlich selektiver. Eine rekombinante Monooxygenase aus *Bacillus licheniformis* oxidierte (R)-(+)-Limonen und (S)-(-)-Limonen zu (R)-(+)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid bzw. (S)-(-)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid, welches jedoch nur 32 % bzw. 43 % unter vielen anderen Produkten ausmachte.

In Zellkulturen von Pilzen oder Pflanzen wurden bisher keine Epoxidierungen, sondern nur Hydroxylierungen des Limonens beobachtet (Pinheiro und Marsaioli 2007; Vaněk et al. 1999).

Epoxide können jedoch als Zwischenprodukte entstanden sein und wurden anschließend womöglich hydrolysiert.

Die durch die SIPXG gebildeten diastereomerreinen Limonen-1,2-Epoxide können als Duftstoffe verwendet werden (Corma et al. 2007) oder als Monomere für eine alternierende Copolymerisation mit Kohlenstoffdioxid zur Herstellung von Polycarbonaten dienen (Byrne et al. 2004).

Nerol, *cis*-Jasmon und *cis*-Stilben wurden durch die SIPXG zu Nerol-2,3-epoxid, *cis*-Jasmon-7,8-epoxid bzw. *cis*-Stibenoxid epoxidiert (Abbildung 4.26, Abbildung 4.34 bzw. Abbildung 4.35). Da das *cis*-Stilbenmolekül spiegelsymmetrisch zur Doppelbindung ist, spielt die Konfiguration der Epoxidgruppe im *cis*-Stibenoxid keine Rolle. Die Umwandlung von *cis*-Stilben zu *cis*-Stibenoxid durch SIPXG ist stereoselektiv. Im Gegensatz dazu liefert die chemische Epoxidierung von *cis*-Stilben mit einem Ruthenium-Katalysator *trans*-Stilbenoxid als Haupt- und *cis*-Stilbenoxid als Nebenprodukt (Chatterjee 2008). Eine Radikalbildung und eine Drehung um eine Kohlenstoff-Kohlenstoffeinfachbindung erklärt die Konfigurationsänderung der chemischen *cis*-Stilben-Oxidation. Der Mechanismus der enzymatischen Epoxidierung verläuft ohne Radikalbildung (Blée et al. 1993), wodurch die Ausgangskonfiguration des *cis*-Stilbens erhalten bleibt. Einige Stilbene wie das Viniferin haben eine fungizide Wirkung (Heldt und Heldt 2003). Die Epoxidierung von Stilbenen durch die SIPXG öffnet die Möglichkeit für Synthesen neuer Verbindungen, die vielleicht ein erweitertes Spektrum von antimikrobiellen Eigenschaften aufweisen.

Bei Nerol-2,3-epoxid und *cis*-Jasmon-7,8-epoxid blieb auf Grund fehlender Standardverbindungen die exakte Analyse der jeweiligen Epoxidkonfiguration aus. Über die Epoxide von *cis*-Jasmon und Nerol wird in der Literatur nur wenig berichtet. *Cis*-Jasmon-7,8-epoxid entsteht beispielsweise in einer Zellkultur des Hefepilzes *Trichosporon cutaneum* und weist eine *cis*-Konfiguration der Epoxidgruppe auf (Pinheiro und Marsaioli 2007). Eine chemische Oxidation von Nerol liefert verschiedene Neroloxide, wovon das Nerol-2,3-epoxid nur etwa 9 % und das Hauptprodukt Nerol-6,7-epoxid 85 % ausmacht (Saladino et al. 2009). In einer Biotransformation von Nerol durch die beiden Pilze *Aspergillus niger* und *Penicillium sp.* entstehen dagegen keine Nerolepoxide. Stattdessen liegt ein Gemisch verschiedener Stoffe mit Linalool und  $\alpha$ -Terpineol als Hauptprodukte vor (Demyttenaere et al. 2000).

Obwohl die SIPXG an den bisherigen Substraten überwiegend eine bestimmte Doppelbindung epoxidierte, verläuft die Epoxidierung von (RS)- $\alpha$ -Phellandren und (R)- $\alpha$ -Phellandren nicht regioselektiv. Unter den insgesamt fünf Produkten liegen zwei Diastereomerpaare vor. Die

Diastereomere eines Paares besitzen ein gleiches Massenspektrum, jedoch eine unterschiedliche Retentionszeit (Anhang Abbildung 7.12, Abbildung 7.13 und Abbildung 7.14). Die Diastereomerpaare wurden als 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en und als 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en identifiziert (Abbildung 4.30). Da aus (RS)- $\alpha$ -Phellandren und (R)- $\alpha$ -Phellandren jeweils die gleichen Produkte entstanden sind, kann ihre Entstehung auf zwei Arten erklärt werden. Die erste wäre, dass die SIPXG nicht das S- $\alpha$ -Phellandren, sondern nur das (R)- $\alpha$ -Phellandren des racematischen Substrats oxidierte. Die Epoxidgruppen der Produkte 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en und 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en liegen sowohl in *cis*- als auch in *trans*-Konfiguration vor, wodurch letztendlich zwei Diastereomerpaare entstanden sind. Die zweite Erklärung wäre, dass (R)- $\alpha$ -Phellandren und (S)- $\alpha$ -Phellandren jeweils zu zwei Diastereomerpaaren (insgesamt 8 Konfigurationen) epoxidiert wurden. Da darunter wiederum vier Enantiomerenpaare vorliegen, die sich mittels einer einfachen GC-Kapillarsäule nicht trennen lassen, sind nur vier Peaks im Chromatogramm zu sehen. Versuche mit enantiomerreinem (S)- $\alpha$ -Phellandren als Substrat oder eine gaschromatographische Trennung der Produkte mit Hilfe einer chiralen Säule können die Sachlage klären und zu einer genauen Identifizierung der Produktkonfiguration beitragen.

### 5.3.2 Hydroxylierungen

$\alpha$ -Terpinen besteht wie das  $\alpha$ -Phellandren aus einem *p*-Menthanring. Der Unterschied beider Isomere liegt lediglich in der unterschiedlichen Lage der zwei Doppelbindungen innerhalb des Ringes. Trotz dieser Ähnlichkeit wird  $\alpha$ -Terpinen durch die SIPXG nicht epoxidiert, sondern zu *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en hydroxyliert (Abbildung 4.29). Als Zwischenstufe dieser Hydroxylierung wird das Endoperoxid Ascaridol vermutet (Abbildung 5.1). Dass Ascaridol aus  $\alpha$ -Terpinen gebildet werden kann, wurde mit einer Iodid-Peroxidase aus *Chenopodium ambrosioides* gezeigt (Johnson und Croteau 1984). Ascaridol ist eine instabile Verbindung und kann rasch zu *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en reduziert werden (Rücker und Molls 1980). Als Reaktionsverlauf der Hydroxylierung von  $\alpha$ -Terpinen wird postuliert, dass  $\alpha$ -Terpinen durch die SIPXG mit Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel zunächst zu Ascaridol oxidiert wird. Das Ascaridol wird im Anschluss durch ein Reduktionsmittel (z. B. aus den Hefemikrosomen stammend oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zu 1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en reduziert. Da die Endoperoxidgruppe des Ascaridols auf einer Seite des Ringes lokalisiert ist, liegen nach deren Reduktion die beiden Hydroxygruppen in *cis*-Konfiguration vor (Abbildung 5.1).

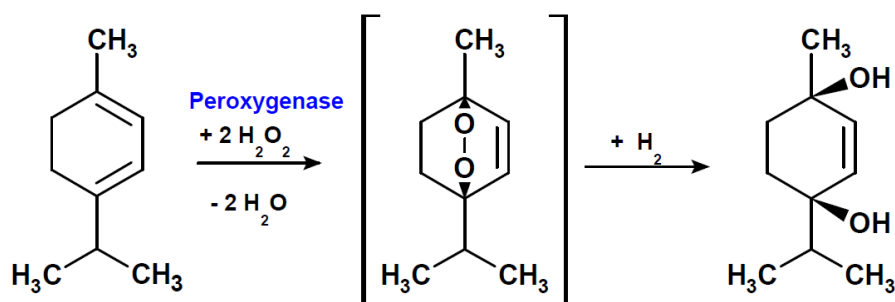


Abbildung 5.1 Postulierter Reaktionsverlauf der Hydroxylierung von  $\alpha$ -Terpinen durch die SIPXG.

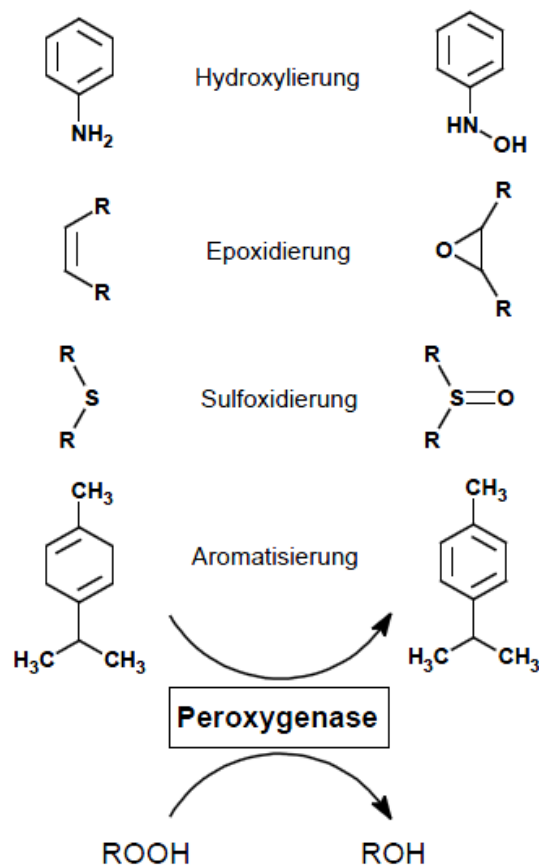
Außer  $\alpha$ -Terpinen konnte  $\alpha$ -Bisabolol durch die SIPXG hydroxyliert werden. Der Umsatz lag bei etwa 63 % und war im Vergleich mit anderen Terpenen sehr hoch. Zwei der drei Produkte sind 3,4-Dihydroxy-bisabolol und Bisabololoxid B (Abbildung 4.27). Für die Produkte wird das 3,4-Epoxid bzw. das 10,11-Epoxid als Zwischenstufe angenommen (Miyazawa et al. 1995). Aus dem 3,4-Epoxid entsteht nach anschließender Hydrolyse das 3,4-Dihydroxy-bisabolol. Innerhalb des 10,11-Epoxids greift die 7-Hydroxy-Gruppe das 10,11-Epoxid nukleophil an und es entstehen darauf das 7,10-Epoxid und die 11-Hydroxy-Gruppe. Diese beiden Verbindungen entstanden auch aus  $\alpha$ -Bisabolol in einer Zellkultur des Pilzes *Glomerella cingulata*, wobei sie in Folgereaktionen zu weiteren Produkten reagierten (Miyazawa et al. 1995).  $\alpha$ -Bisabolol und dessen Oxide sind wichtige Bestandteile des ätherischen Öls aus Kamille (*Matricaria chamomilla*) (Heuskin et al. 2009). Sie zählen zu den wirksamen Inhaltsstoffen des Öles und wirken entzündungshemmend, krampflösend und bakterizid (Arzneipflanzenporträts 2006). Ausgehend von  $\alpha$ -Bisabolol kann durch die SIPXG Bisabololoxid B als pharmazeutisch wirksame Substanz synthetisiert werden.

### 5.3.3 Aromatisierungen

$\gamma$ -Terpinen und  $\alpha$ -Thujen zählen zwar auch zu den *p*-Menthanen, jedoch unterscheiden sich deren Oxidationsprodukte von den bisher beschriebenen. Die SIPXG katalysierte nicht den Sauerstofftransfer vom Hydroperoxid auf die Substrate, sondern die Dehydrierung dieser zum aromatischen *p*-Cymol (Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25). Die Oxidation von  $\gamma$ -Terpinen und  $\alpha$ -Thujen zu *p*-Cymol durch SIPXG ist demnach eine Aromatisierung. Sie findet mit Wasserstoffperoxid, tert-Butylhydroperoxid und Cumolhydroperoxid als Oxidationsmittel statt (Tabelle 4.6). Dies ist ein neuer Reaktionstyp, der durch die SIPXG katalysiert wird (Abbildung 5.2). Eine Aromatisierung von  $\gamma$ -Terpinen zu *p*-Cymol wurde bereits von Poulou und Croteau (1978) durch eine Inkubation mit Blättern von *Thymus vulgaris* (Thymian) entdeckt. Für diese Reaktion ist vermutlich ein Cytochrom P450 verantwortlich (Crocoll

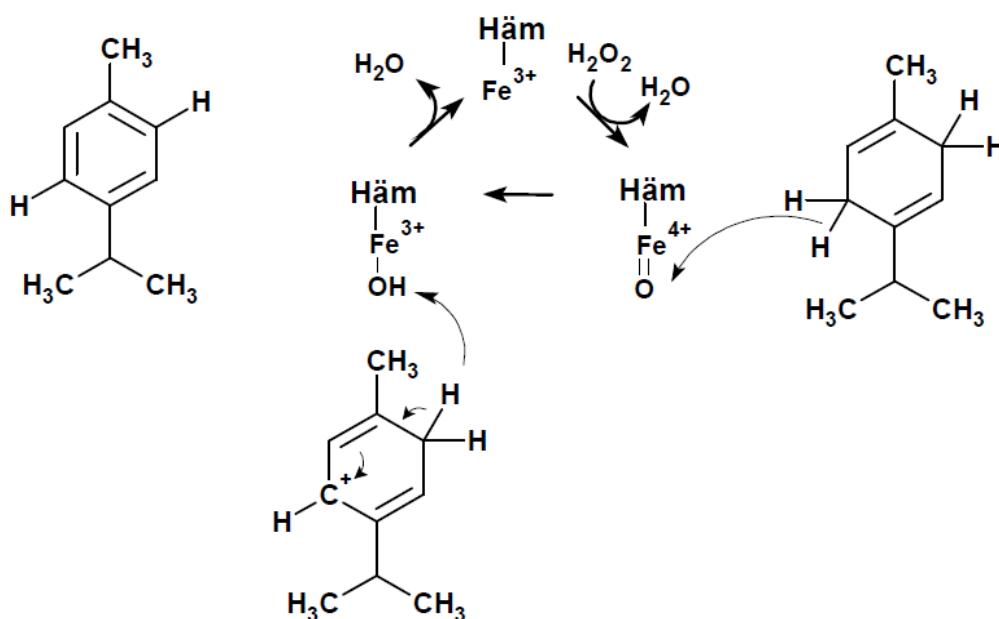
2011). Die aromatisierenden Eigenschaften der SIPXG sind somit mit denen von anderen Monoxygenasen vergleichbar (z. B. des Shikimatwegs (Heldt und Heldt 2003)).

Die chemische Umwandlung eines *p*-Menthens zu *p*-Cymol wurde bereits mehrfach beschrieben. Limonen und Pinen werden in Anwesenheit eines Metall-Katalysators und hohen Temperaturen (100 bis 300 °C) zu *p*-Cymol umgewandelt (Buhl et al. 1999; Roberge et al. 2001; Colonna et al. 2011). Eine Temperatur von bereits 0 °C und Kaliumpermanganat reichen für die Aromatisierung von  $\gamma$ -Terpinen, 1,4-Cyclohexadien und 1-Methyl-1,4-cyclohexadien zu *p*-Cymol, Benzol bzw. Toluol aus (McBride et al. 1999). Cyclohexadiene mit Doppelbindungen in 1,4-Position aromatisieren gut, weil der aromatische Ring des Produkts in einem energetisch günstigerem Zustand ist und dadurch die Reaktion antreibt. Dieser Antrieb spiegelt sich auch in der Umsetzung von *p*-Cymol durch die SIPXG wider, welche bei über 70 % sehr hoch im Vergleich zu anderen Terpenen liegt (Abbildung 4.31). Mit Ausnahme von  $\gamma$ -Terpinen aromatisierte SIPXG 1,4-Cyclohexadien und 1-Methyl-1,4-cyclohexadien nicht.



**Abbildung 5.2** Die SIPXG katalysiert in Anwesenheit eines Hydroperoxids (ROOH) Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Sulfoxidierungen und Aromatisierungen von Substraten.

Da bei der Aromatisierung durch die SIPXG im Gegensatz zu einer Epoxidierung, Hydroxylierung oder Sulfoxidierung kein Sauerstoff übertragen wird, wird ein vom sonstigen Verlauf zumindest teilweise abweichender Reaktionsmechanismus angenommen. Eine Hilfestellung zur Klärung des Mechanismus liefert die Oxidation von 1,4-Cyclohexadien zu Benzol (Ikeshita et al. 2007). Wie von Blée et al. (1993) beschrieben wurde, wird wahrscheinlich auch in der Aromatisierungsreaktion zuerst das Hydroperoxidmolekül heterolytisch gespalten und ein Sauerstoffatom auf das Hämeisen übertragen. Das Eisenion wird dabei oxidiert. Im Anschluss erfolgt dann nicht wie üblich der Transfer dieses Sauerstoffatoms auf ein weiteres Substrat, sondern die Übertragung eines Hydridanions vom  $\gamma$ -Terpinen auf den Ferryl-Oxo-Komplex.  $\gamma$ -Terpinen wird dabei zu einem Carbeniumion oxidiert und das Eisen des Häms reduziert. Schließlich reagiert das Hydroxidion, welches an den Ferryl-Oxo-Komplex gebunden ist, mit einem Proton des  $\gamma$ -Terpinens zu Wasser, das Terpinen wird zu *p*-Cymol oxidiert (Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3** Postulierter Mechanismus der Aromatisierung von  $\gamma$ -Terpinen zu *p*-Cymol durch die SIPXG. Zur Vereinfachung ist schematisch nur das Hämmolekül des Enzyms dargestellt.

Alkohole haben sich als Lösungsmittel zur Aromatisierung von *p*-Cymol durch die SIPXG als ungeeignet herausgestellt. Die Umsetzungen sind deutlich niedriger als in Puffer (Abbildung 4.33). Das Substrat löst sich zwar besser in diesen organischen Lösungsmitteln, jedoch wird vermutlich das Enzym in seiner Sekundär- und/oder Tertiärstruktur negativ beeinflusst. Die Ergebnisse, die mit einer Peroxidase und Wasserstoffperoxid in 2-Propanol zur Sulfoxidation von Thioanisol führten (Dai und Klivanov 2000), konnten nicht auf die

Aromatisierung durch die SIPXG übertragen werden. Da die jeweilige Reaktionsart ausschlaggebend für die Oxidation in organischen Lösungsmitteln ist (Dai und Klibanov 2000), können vielleicht andere Oxidationen durch die SIPXG – Epoxidierung oder Hydroxylierung – zu einer besseren Umsatzrate als in Puffer führen.

In dieser Arbeit ist das erste Mal eine Aromatisierung von Terpenen, katalysiert durch eine PXG, gezeigt worden. Das entstandene *p*-Cymol ist ein wichtiges Produkt und Intermediat der chemischen Industrie mit einer Reihe von Anwendungsmöglichkeiten. Es dient als Lösungsmittel für Farben und Lacke und als Duftstoff in Parfüm. Außerdem kann *p*-Cymol das aus Erdöl stammende Toluol ersetzen und als Edukt für die Synthese weiterer aromatischer Stoffen wie Kresol und *p*-Cymolsulfonsäure fungieren (Clark et al. 2012). *p*-Cymolsulfonsäure kann in Carvacrol (2-Hydroxy-*p*-Cymol) umgewandelt werden (Hixson und McKee Ralph H. 1918), welches sowohl als Aromastoff dient (Lieberei et al. 2007) als auch antimikrobielle Eigenschaften besitzt (Arzneipflanzenporträts 2006). Eine Oxidation von *p*-Cymol zu Terephthalsäure ermöglicht die Synthese von Polyethylenterephthalat-Kunststoffe (PET) (Colonna et al. 2011).

#### 5.4 Untersuchung der Genexpression in *S. lycopersicum*

Die PXG ist ein Enzym des pflanzlichen Oxylinweges, welcher für die Synthese oxidiertes Fettsäuren verantwortlich ist. Stromaufwärts der PXG befindet sich eine Lipoxygenase (LOX), welche aus Fettsäuren Fettsäurehydroperoxide bildet, stromabwärts der PXG hydrolysiert eine Epoxidhydrolase (EH) die von der PXG synthetisierten Fettsäureepoxide zu Diolen.  $\omega$ -Hydroxylasen können an das hinterste Kohlenstoffatom der Fettsäure zusätzlich eine Hydroxygruppe einfügen. Durch die Kombination der beteiligten Enzyme und durch unterschiedliche Fettsäuren als Substrate entsteht eine Vielfalt an oxidierten Fettsäuren, den so genannten Oxylipinen (Blée und Schuber 1993). Oxylipine erfüllen innerhalb der Pflanze zwei Aufgaben: zum einen sind sie Monomere für die Cutinbiosynthese zum Aufbau der Cuticula (Blée und Schuber 1993; Taiz und Zeiger 2006), zum anderen sind sie an der biotischen und abiotischen Stressabwehr beteiligt (Blée 1998b, 2002). Wie sich die Expression des SIPXG kodierenden Gens im Verlauf der zeitlichen Entwicklung vegetativer Pflanzenorgane verhält, wurde durch eine qPCR untersucht. Die Expression der *SIPXG* in der Sprossachse ist deutlich höher als in den Blättern und nimmt im Laufe der Entwicklung stark zu. Die Expression der *SIPXG* in den Blättern bleibt dagegen konstant auf niedriger Ebene (Abbildung 4.37). Dieser deutliche Unterschied der Genexpression zwischen Sprossachse und



Blatt liegt bei einem Caleosin mit PXG-Funktion aus *A. thaliana* nicht vor; sowohl die Genexpression in der Sprossachse als auch im Blatt ist dort sehr niedrig (Partridge und Murphy 2009). In *A. sativa* konnte eine Expression des PXG kodierenden Gens nur während der Samenentwicklung festgestellt werden (Meesapyodsuk und Qiu 2011). Ob die verstärkte Expression der *SIPXG* in der Sprossachse mit einer erhöhten Synthese von Cutinmonomeren und folglich von Cutin einhergeht, bleibt offen. Die PXG ist zwar indirekt an deren Synthese beteiligt (Lequeu et al. 2003), in dieser Arbeit wurde jedoch die Expression des Gens und nicht die Enzymaktivität oder die synthetisierten Fettsäureepoxide innerhalb der Pflanze gemessen. Die Regulation der Translation sowie posttranslationale Modifikationen der *SIPXG* können letztendlich auch eine Rolle für die Cutinsynthese spielen. Es bleibt auch offen, ob die erhöhte Expression der *SIPXG* in der natürlichen Entwicklung der Sprossachse vorgesehen oder sie durch äußeren Stresseinfluss verursacht worden ist.

Zusätzlich zu den generativen Organen wurde die Expression der *SIPXG* in Früchten untersucht, welche eine Blütenendfäule im unteren Fruchtbereich aufwiesen. Diese Stoffwechselkrankheit verursachte eine Erhöhung der Expression der *SIPXG* um mehr als das 10fache im Vergleich zu gesunden Früchten (Abbildung 4.40). Interessanter Weise beschränkt sich diese Expressionssteigerung nur auf den oberen, nicht von Nekrose gezeichneten Fruchtabschnitt. Der untere, erkrankte Teil, weist – vermutlich wegen dem bereits abgestorbenen Gewebe – eine niedrigere Expression als in gesunden Früchten auf. Die Ursache der Blütenendfäule liegt in einem Calciummangel (Raleigh und Chucka 1944), welcher zu einem Zusammenfall der Zellwände und in Folge darauf zu Nekrosen führt. Neuere Forschungen sehen den Calciummangel nicht als primäre Ursache an. Den Gibberellinen, die während des Fruchtwachstums aktiv sind, wird ein großer Einfluss auf die Entstehung der Blütenendfäule nachgesagt. Durch Beteiligung von Calciumionen an der Signaltransduktion dieser Phytohormone kann der Calciumhaushalt des Fruchtgewebes beeinträchtigt werden (Saure 2001; Taiz und Zeiger 2006). Unabhängig davon verursachen auch Wassermangel, Salinität und eine hohe Ammoniumkonzentration im Boden einen Stress für die Pflanze, welcher sich auch auf die Stabilität der Fruchtzellwände negativ auswirkt (Saure 2001). Welcher dieser Faktoren letztendlich auf die Expression der *SIPXG* am meisten Einfluss hat, kann nicht geklärt werden. Fest steht, dass stattgefundenen Stress die Expression der *SIPXG* hochreguliert hat. Eine stressbedingte Induktion einer PXG konnte sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene beobachtet werden (Partridge und Murphy 2009). Die *SIPXG* kann auf Enzymebene zur Synthese von Oxylipinen beitragen. Diese schützen die Pflanze vor gegenwärtigem abiotischen Stress oder bereiten sie auf eine mögliche mikrobielle

Sekundärinfektion des anfälligen Gewebes vor. Eine zusätzliche Bestimmung des Expressionsmuster der LOX kodierenden Gene sowie eine Messung der SIPXG-Enzymaktivität und der Oxylipine in den gesunden und kranken Früchten können das Ergebnis vervollständigen. Ob ein Calciummangel in der Frucht Einfluss auf die Aktivität der calciumbindenden SIPXG hat, stellt eine interessante Fragestellung dar, die in zukünftigen Versuchen erforscht werden kann.

## 6 Literatur

- Abelló, S., Medina Francesc, Tichit, D., Pérez-Ramírez, J., Groen, J.C., Sueiras, J.E., Salagre P., Ceteros Y.** (2005): Aldol Condensations Over Reconstructed Mg-Al Hydrotalcites: Structure-Activity Relationships Related to the Rehydration Method. *Chem. Eur. J.* 11 (2), S. 728–739.
- Aguedo, M., Ly, M., Huong, Belo, I., Teixeira, J.A., Belin, J.-M., Waché, Y.** (2004): The Use of Enzymes and Microorganisms for the Production of Aroma Compounds from Lipids. *Food Technology and Biotechnology* 42, S. 327–336.
- Allain, E.J., Hager, L.P.** (1993): Highly Enantioselective Epoxidation of Disubstituted Alkenes with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Chloroperoxidase. *Journal of the American Chemical Society* 115, S. 4415–4416.
- Arzneipflanzenporträts** (2006). *Heilpflanzenpraxis heute*, S. 49–460.
- Bader, H., Joachim, Horn, S., Fehrenbacher, U., Grosshardt, O., Kowollik, K., Pohnsner, U. et al.** (2009): Informationsserie Nachwachsende Rohstoffe. *Fonds der Chemischen Industrie im Verband der Chemischen Industrie e.V.*
- Bähr, M., Bitto, A., Mühlaupt, R.** (2012): Cyclic limonene dicarbonate as a new monomer for non-isocyanate oligo- and polyurethanes (NIPU) based upon terpenes. *Green Chemistry* 14, S. 1447–1454.
- Banthorpe, D.V., Bucknall, G.A., Gutowski, J.A., Rowan, M.G.** (1977): Epoxidation and Hydration of Prenyl Pyrophosphates by Plant Extracts. *Phytochemistry* 16, S. 355–358.
- Besse, P., Veschambre, H.** (1994): Chemical and Biological Synthesis of Chiral Epoxides. *Tetrahedron* 50 (30), S. 8885–8927.
- Bhattacharjee, S., Dines, T.J., Anderson, J.A.** (2004): Synthesis and application of layered double hydroxide-hosted catalysts for stereoselective epoxidation using molecular oxygen or air. *Journal of Catalysis* 225 (2), S. 398–407.
- Biswas, A., Adhvaryu, A., Gordon, S.H., Erhan, S.Z., Willett, J.L.** (2005): Synthesis of Diethylamine-Functionalized Soybean Oil. *J. Agric. Food Chem* 53 (24), S. 9485–9490.
- Blair, M., Andrews, P.C., Fraser, B.H., Forsyth, C.M., Junk, P.C., Massi, M., Tuck, K.L.** (2007): Facile Methods for the Separation of the cis- and trans-Diastereomers of Limonene 1,2-Oxide and Convenient Routes to Diequatorial and Diaxial 1,2-Diols. *Synthesis* (10), S. 1523–1527
- Blée, E.** (1998a): Biosynthesis of phytooxylipins: the Peroxygenase pathway. *Fett/Lipid* 100, S. 121–127.
- Blée, E.** (1998b): Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress Lipid research* 37 (1), S. 33–72.
- Blée, E.** (2002): Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* 7 (7), S. 315–322.
- Blée, E., Casida, J.E., Durst, F.** (1985): Sulfoxidation of methiocarb in higher plants. *Biochemical Pharmacology* 34 (3), S. 389–390.
- Blée, E., Durst, F.** (1986): Oxidation of an Organosulfur Xenobiotic by Microsomes from Soybean Cotyledons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 135, S. 922–927.

- Blée, E., Durst, F.** (1987): Hydroperoxide-Dependent Sulfoxidation Catalyzed by Soybean Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 254 (1), S. 43–52.
- Blée, E., Schuber, F.** (1989): Mechanism of S-Oxidation Reactions Catalyzed by a Soybean Hydroperoxide-Dependent Oxygenase. *Biochemistry* 28 (12), S. 4962–4967.
- Blée, E., Schuber, F.** (1990a): Efficient Epoxidation of Unsaturated Fatty Acids by Hydroperoxide-dependent Oxygenase. *Journal of Biological Chemistry* 265 (22), S. 12887–12894.
- Blée, E., Schuber, F.** (1990b): Stereochemistry of the Epoxidation of Fatty Acids catalysed by the Soybean Peroxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173 (3), S. 1354–1360.
- Blée, E., Schuber, F.** (1993): Biosynthesis of cutin monomers: involvement of a lipoyxygenase/ peroxygenase pathway. *The Plant Journal* 4 (1), S. 113–123.
- Blée, E., Wilcox, A.L., Marnett, L.J., Schuber, F.** (1993): Mechanism of Reaction of Fatty Acid Hydroperoxides with Soybean Peroxygenase. *The Journal of biological Chemistry* 268 (3), S. 1708–1715.
- Bradford, M.M.** (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, S. 248–254.
- Buhl, D., Roberge, D., Hölderich, W.** (1999): Production of p-cymene from  $\alpha$ -limonene over silica supported Pd catalysts. *Applied Catalysis A: General* 188, S. 287–299.
- Byrne, C.M., Allen, S.D., Lobkovsky, E.B., Coates, G.W.** (2004): Alternating Copolymerization of Limonene Oxide and Carbon Dioxide. *J. Am. Chem. Soc* (37), S. 11404–11405.
- Cahoon, E.B., Ripp, K.G., Hall, S.E., McGonigle, B.** (2002): Transgenic Production of Epoxy Fatty Acids by Expression of a Cytochrome P450 Enzyme from *Euphorbia lagascae* Seed. *Plant Physiology* 128, S. 615–624.
- Cavalli, J.-F., Tomi, F., Bernardini, A.-F., Casanova, J.** (2004): Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Phytochem. Anal.* 15 (5), S. 275–279.
- Chatterjee, D.** (2008): Kinetics and mechanism of epoxidation of olefins by a novel ruthenium(IV)-oxo complex. *Inorganica Chimica Acta* 361 (8), S. 2177–2182.
- Choo, Y.-M., Ooi, K.-E., Ooi, I.-H., Tan, D.D.H** (1996): Synthesis of a Palm-based Star-shaped Hydrocarbon via Oleate Metathesis. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73.
- Christen, P., Jaussi, R.** (2005): Biochemie. Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten. Berlin [u. a.]: Springer.
- Chua, S.-C., Xu, X., Guo, Z.** (2012): Emerging sustainable technology for epoxidation directed toward plant oil-based plasticizers. *Process Biochemistry* 47 (10), S. 1439–1451.
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J.** (2009): Molekulare Biotechnologie. Grundlagen und Anwendungen. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.
- Clark, J.H., Fitzpatrick, E.M., Macquarrie, D.J., Pfalzgraff, L.A., Sherwood, J.** (2012): p-Cymenesulphonic acid: An organic acid synthesised from citrus waste. *Catalysis Today* 190, S. 144–149.

- Colonna, M., Berti, C., Fiorini, M., Binassi, E., Mazzacurati, M., Vannini, M., Karanam, S.** (2011): Synthesis and radiocarbon evidence of terephthalate polyesters completely prepared from renewable resources. *Green Chemistry* 13, S. 2543–2548.
- Colonna, S., Gaggero, N., Manfredi, A., Casella L., Gulotti, M., Carrea G., Pasta P.** (1990): Enantioselective Oxidations of Sulfides Catalyzed by Chloroperoxidase. *Biochemistry* 29, S. 10445–10468.
- Corma, A., Iborra, S., Velty, A.** (2007): Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals. *Chem. Rev* 107 (6), S. 2411–2502.
- Crocoll, C.** (2011): Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Cui, P.H., Duke, R.K., Duke, C.C.** (2008): Monoepoxy octadecadienoates and monoepoxy octadecatrienoates. *Chemistry and Physics of Lipids* 152 (2), S. 122–130.
- Dai, L., Klibanov, A.M.** (2000): Peroxidase-catalyzed asymmetric sulfoxidation in organic solvents versus in water. *Biotechnology and Bioengineering* 70 (3), S. 353–357.
- Demyttenaere, J.C.R., Herrera, M.del Carmen, Kimpe, N. de** (2000): Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. *Phytochemistry* 55, S. 363–373.
- Dietrich, M., Eiben, S., Asta, C., Do, T.Anh, Pleiss, J., Urlacher, V.B.** (2008): Cloning, expression and characterisation of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 79 (6), S. 931–940.
- Eierdanz, H.** (1996): Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie. Weinheim, New York: VCH.
- Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe e.V.:** Basisinfo nachwachsende Rohstoffe <http://www.nachwachsenderohstoffe.de/index.php?id=2293&spalte=3>
- Felse, P.Arthur, Shah, V., Chan, J., Rao, K.J., Gross, R.A.** (2007): Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2), S. 316–323.
- Geigert, J., Neidleman, S.L., Liu, T.-N.E., DeWitt, S.K., Panscher, B.M., Dallietos, D.J., Siegel, E.R.** (1983): Production of Epoxides from  $\alpha,\beta$ -Halohydrins by *Flavobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 45, S. 1148–1149.
- Gorin, P.A. J., Spencer, J.F. T., Tulloch, A.P.** (1961): Hydroxy Fatty Acid Glycosides of Sophorose From *Torulopsis magnoliae*. *Canadian Journal of Chemistry* 39, S. 846–855.
- Gruber, B., Höfer, R., Kluth, H., Meffert, A.** (1987): Polyole auf Basis fettchemischer Rohstoffe. *Fat science technology* 89 (4), S. 147–151.
- Guidotti, M., Ravasio, N., Psaro, R., Gianotti, E., Marchese, L., Coluccia, S.** (2003): Heterogeneous catalytic epoxidation of fatty acid methyl esters on titanium-grafted silicas. *Green Chem* 5 (4), S. 421.
- Hamberg, M., Hamberg, G.** (1990): Hydroperoxide-Dependent Epoxidation of Unsaturated Fatty Acids in the Broad Bean (*Vicia faba* L.). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 283, S. 409–416.
- Hamberg, M., Hamberg, G.** (1996): Peroxygenase-Catalyzed Fatty Acid Epoxidation in Cereal Seeds: Sequential Oxidation of Linoleic Acid into 9(S),12(S),13(S)-Trihydroxy-10(E)-Octadecenoic Acid. *Plant Physiology* 110, S. 807–815.

- Hanano, A., Burcklen, M., Flenet, M., Ivancich, A., Louwagie, M., Garin, J., Blée, E.** (2006): Plant Seed Peroxygenase Is an Original Heme-oxygenase with an EF-hand Calcium Binding Motif. *Journal of Biological Chemistry* 281 (44), S. 33140–33151.
- Harry-O'kuru, R., Holser, R., Abbott, T., Weislder, D.** (2002): Synthesis and characteristics of polyhydroxy triglycerides from milkweed oil. *Industrial Crops and Products* 15, S. 51–58.
- Hart, H.; Craine, L.E.; Hart, D. J.; Hadad, C.M.** (2007): Organische Chemie. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Hasan, F., Shah, A.Ali, Hameed, A.** (2006): Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2), S. 235–251.
- Heidbreder, A., Höfer, R., Grützmacher, R., Westfechtel, A., Blewett, C.William** (1999): Oleochemical products as building blocks for polymers. *European Journal of Lipid Science and Technology* 101, S. 418–424.
- Heldt, H. W., Heldt, F.** (2003): Pflanzenbiochemie. 3. Aufl. Heidelberg [u. a.]: Spektrum [u. a.].
- Hemler, M., Lands, W.E. M.** (1976): Purification of the Cyclooxygenase that forms Prostaglandins. *Journal of Biological Chemistry* 251, S. 5575–5579.
- Herrmann, W.A., Fischer, R.W., Marz, D.W.** (1991): Methyltrioxorhenium als Katalysator für die Olefin-Oxidation. *Angewandte Chemie* 103 (12), S. 1706–1709.
- Heuskin, S., Godin, B., Leroy, P., Capella, Q., Wathélet, J.-P., Verheggen, F. et al.** (2009): Fast gas chromatography characterisation of purified semiochemicals from essential oils of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae) and *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae). *Journal of Chromatography A* 1216 (14), S. 2768–2775.
- Hixson, A.W., McKee Ralph H.** (1918): A Study of the Conditions essential for the commercial Manufacture of Carvacrol. *The Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 10, S. 982–992.
- Huang, F.-C., Schwab, W.** (2011): Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. *BMC Biotechnol* 11 (1), S. 30.
- Ikeshita, K., Kihara, N., Sonoda, M., Ogawa, A.** (2007): Lewis acid-catalyzed reduction of dithioacetals by 1,4-cyclohexadiene. *Tetrahedron Letters* 48, S. 3025–3028.
- Ishimaru, A., Yamazaki, I.** (1977): Hydroperoxide-dependent Hydroxylation Involving "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>" reducible Hemoprotein" in Microsomes of Pea Seeds. A new type enzyme acting on hydroperoxide and a physiological role of seed lipoxygenase. *The Journal of biological Chemistry* 252 (17), S. 6118–6124.
- Jie, M.S.F Lie Ken, Zheng, Y.** (1988): Synthesis and physical properties of some 2,3- and 2,2'-epithio C18 fatty acid derivatives. *Chemistry and Physics of Lipids* 49, S. 167–178.
- Johnson, M.A., Croteau, R.** (1984): Biosynthesis of Ascaridol: Iodide Peroxidase-Catalysed Synthesis of a Monoterpen Endoperoxide in Soluble Extracts of *Chenopodium ambrosioides* Fruit. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 235 (1), S. 254–266.
- Katsuki, T., Sharpless, K.Barry** (1980): The First Practical Method for Asymmetric Epoxidation. *Journal of the American Chemical Society*, S. 5974–5976.
- Kiljunen, E., Kanerva, L.T.** (2000): Chloroperoxidase-catalysed oxidation of alcohols to aldehyde. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9, S. 163–172.

- Lequeu, J., Fauconnier, M.-L., Chammaï, A., Bronner, R., Blée, E.** (2003): Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxygenase pathway. *The Plant Journal* 36, S. 155–164.
- Lieberei, R., Reisdorff, C., Franke, W.** (2007): *Nutzpflanzenkunde*. 7. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D.** (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct Method. *Methods* 25, S. 402–408.
- Lligadas, G., Ronda, J.C., Galià, M., Biermann, U., Metzger, J.O.** (2006): Synthesis and characterization of polyurethanes from epoxidized methyl oleate based polyether polyols as renewable resources. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem* 44 (1), S. 634–645.
- Matthäus, B.** (Hg.) (2009): *Warenkunde Ölpflanzen, Pflanzenöle*. Inhaltsstoffe, Analytik, Reinigung, Trocknung, Lagerung, Vermarktung, Verarbeitung, Verwendung. 1. Aufl. [Clenze]: Agrimedia.
- May, S.W., Schwartz, R.D.** (1974): Stereoselective Epoxidation of Octadiene Catalyzed by an Enzyme System of *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of the American Chemical Society* 96, S. 4031–4032.
- McBride, C.M., Chrisman, W., Harris, C.E., Singaram, B.** (1999): Efficient Synthesis of Substituted Benzenes From 1,3-Dienes or 1,4-Cyclohexadienes With  $\text{KMnO}_4$  Under Mild Conditions. *Tetrahedron Letters* 40, S. 45–48.
- Meesapyodsuk, D., Qiu, X.** (2011): A Peroxygenase Pathway Involved in the Biosynthesis of Epoxy Fatty Acids in Oat. *Plant Physiology* 157 (1), S. 454–463.
- Metzger, J.O., Bornscheuer, U.** (2006): Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl Microbiol Biotechnol* 71 (1), S. 13–22.
- Metzger, J.O., Fürmeier, S.** (1999): New Type of Skipped Oligoaziridines: Synthesis of New Fatty Acid Derivatives Containing Aziridine Functions. *European Journal of Organic Chemistry*, S. 661–664.
- Miyazawa, M., Nankai, H., Kameoka, H.** (1995): Biotransformation of (–)- $\alpha$ -Bisabolol by Plant Pathogenic Fungus, *Glomerella cingulata*. *Pergamon* 39 (5), S. 1077–1080.
- Miyazawa, M., Shimizu, K.** (2012): Stereoselective biocatalytic reduction of  $\alpha$ -ionone by *Glomerella cingulata*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74 (1-2), S. 6–8.
- Mol, J.C.** (2002): Application of olefin metathesis in oleochemistry: an example of green chemistry. *Green Chem* 4 (1), S. 5–13.
- Montellano, O. Paul R. de** (1992): Catalytic Sites of Hemoprotein Peroxidases. *Annual Reviews Pharmacology and Toxicology* 32, S. 89–107.
- Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I.** (2009): Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (6), S. 511–517.
- Murphy, D.J.** (2001): The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid research* 40, S. 325–438.
- Ohta, H., Tetsukawa, H.** (1978): Microbial epoxidation of long-chain terminal olefins. *J. Chem. Soc., Chem. Commun* (19), S. 849.
- Ozawa, T., Hayakawa, M., Takamura, T., Sugiyama, S., Suzuki, K., Iwata, M. et al.** (1986): Biosynthesis of Leukotoxin, 9, 10-Epoxy-12 Octadecenoate, by Leukocytes in Lung

- Lavages of Rat After Exposure to Hyperoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 137 (3), S. 1071–1078.
- Partridge, M., Murphy, D.J.** (2009): Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (9), S. 796–806.
- Partridge, M., Murphy, D.J.** (2009): Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (9), S. 796–806.
- Piazza, G.J., Foglia, T.A., Nuñez, A.** (2000): Epoxidation of fatty acids with membrane-supported peroxygenase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 22, S. 217–221.
- Piazza, G.J., Foglia, T.A., Nuñez, A.** (2001): Optimizing reaction parameters for the enzymatic synthesis of epoxidized oleic acid with oat seed peroxygenase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78 (6), S. 589–592.
- Piazza, G.J., Nuñez, A., Foglia, T.A.** (2003): Epoxidation of fatty acids, fatty methyl esters, and alkenes by immobilized oat seed peroxygenase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 21, S. 143–151.
- Pinheiro, L., Marsaioli, A.J.** (2007): Microbial monooxygenases applied to fragrance compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 44 (2), S. 78–86.
- Pinheiro, L., Oliveira, L.G. de, Marsaioli, A. J.** (2009): Assessing the absolute configuration of (7S,8R)-(-)-epoxyjasnone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 60 (3-4), S. 133-137
- Poulose, A., Croteau, R.** (1978): Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 187 (2), S. 307–314.
- Prileschajew, N.** (1909): Oxydation ungesättigter Verbindungen mittels organischer Superoxyde. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 42, S. 4811–4815.
- Pryde, E., Frankel, E., Cowan, J.** (1972): Reactions of carbon monoxide with unsaturated fatty acids and derivatives: A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 49, S. 451–456.
- Rademacher, W., Fritsch, H., Graebe, J.E., Sauter, H., Jung, J.** (1987): Tetracyclis and Triazole-type Plant Growth Retardants: Their Influence on the Biosynthesis of Gibberellins and Other Metabolic Processes. *Pest Management Science* 21, S. 241–252.
- Raleigh, S.M., Chucka, J.A.** (1944): Effect of Nutrient Ration and Concentration on Growth and Composition of Tomato Plants and the Occurrence of Blossom-End Rot of the Fruit. *Plant Physiology* 19, S. 671–678.
- Roberge, D.M., Buhl, D., Niederer, J.P. M., Hölderich, W.F.** (2001): Catalytic aspects in the transformation of pinenes to *p*-cymene. *Applied Catalysis A: General* 215, S. 111–124.
- Rücker, G., Molls, U.** (1980): Über die Reaktionsprodukte der jodometrischen Gehaltsbestimmung von Ascaridol. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* 313 (3), S. 237–243.
- Rüsch, M., Warwel, S.** (1997): Lipase-catalyzed preparation of peroxy acids and their use for epoxidation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 117, S. 311–319.
- Ryu, K., Dordick, J.S.** (1992): How Do Organic Solvents Affect Peroxidase Structure and Function? *Biochemistry* 31, S. 2588–2598.
- Saladino, R.** (2003): Selective epoxidation of monoterpenes with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and polymer-supported methylrhodiumtrioxide systems. *Tetrahedron* 59 (37), S. 7403–7408.



- Saladino, R., Bernini, R., Neri, V., Crestini, C.** (2009): A novel and efficient catalytic epoxidation of monoterpenes by homogeneous and heterogeneous methyltrioxorhenium in ionic liquids. *Applied Catalysis A: General* 360 (2), S. 171–176.
- Saure, M.C.** (2001): Blossom-end rot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) - a calcium- or stress-related disorder? *Scientia Horticulturae* 90, S. 193–208.
- Schewe, H., Mirata, M. A., Holtmann, D., Schrader, J.** (2011): Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases. *Process Biochemistry* 46 (10), S. 1885–1899.
- Schilcher, H., Novotny, L., Ubik, K., Motl, O., Herout, V.** (1975): Strukturaufklärung eines dritten Bisabololoxides aus *Matricaria Chamomilla* L. und massenspektrometrischer Vergleich der Bisabololoxide A, B und C. *Archiv der Pharmazie* 309 (76), S. 189–196.
- Schmid, R.** (2006): Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. 2. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Schörken, U., Kempers, P.** (2009): Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 111 (7), S. 627–645.
- Sharpless, K. Barry, Michaelson, R.C.** (1973): High Stereo- and Regioselectivities in the Transition Metal Catalyzed Epoxidations of Olefinic Alcohols by tert-Butyl Hydroperoxide. *Journal of the American Chemical Society*, S. 6136–6137.
- Smet, M.-J. de, Kingma, J., Wynberg, H., Withold, B.** (1983): *Pseudomonas oleovorans* as a tool in bioconversions of hydrocarbons: growth, morphology and conversion characteristics in different two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology* 5, S. 352–360.
- Sobczak, J.M., Ziółkowski, J.J.** (2003): Molybdenum complex-catalysed epoxidation of unsaturated fatty acids by organic hydroperoxides. *Applied Catalysis A: General* 248 (1-2), S. 261–268.
- Suzuki, M., Ohtake, H., Kameya, Y., Hamanaka, N., Noyori, R.** (1989): Ruthenium(II)-catalyzed reactions of 1,4-epiperoxides. *J. Am. Chem. Soc* 54 (22), S. 5292–5302.
- Taiz, L., Zeiger, E.** (2006): Plant physiology. 4. Aufl. Sunderland, Mass: Sinauer Associates.
- Takashi, Y., Tanaka, T., Funabiki, T., Yoshida, S.** (1998): Acidic Property of FSM-16. *Journal of Physical Chemistry B* 102, S. 5830–5839.
- Vaněk, T., Valterová, I., Vaisar, T.** (1999): Biotransformation of (S)-(–)- and (R)-(+)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* plant cells. *Phytochemistry* 50, S. 1347–1351.
- Yadav, M.Kr, Chudasama, C.D., Jasra, R.V.** (2004): Isomerisation of  $\alpha$ -pinene using modified montmorillonite clays. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 216 (1), S. 51–59.
- Yamamoto, T., Matsuyama, T., Tanaka, T., Funabiki, T., Yoshida, S.** (2000): Silica-supported ytterbium oxide characterized by spectroscopic methods and acid-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 155, S. 43–58.
- Zaks, A., Dodds, D.R.** (1995): Chloroperoxidase-Catalyzed Asymmetric Oxidations: Substrate Specificity and Mechanistic Study. *Journal of the American Chemical Society* 117, S. 10419–10424.
- Zimmermann, D.C., Coudron, C.A.** (1979): Identificatin of Traumatins, a Wound Hormone, as 12-Oxo-trans-10-dodecenoic Acid. *Plant Physiology* 63, S. 536–541.

## 7 Anhang

### 7.1 Oligonukleotide

5'-Fragment der *SIPXG*

SIPXG\_f: 5'-TCT GGA TCC AAC ACA ATG TCT ATT GCT GGG GTT- 3'

SIPXG\_mr: 5'-GCC TCT CTG TTG CCT TCA GTC A-3'

3'-Fragment der *SIPXG*

SIPXG\_mf: 5'-CAT GGA AGT GAT ACT CAC ACC-3'

SIPXG\_r: 5'-CGG CGG CTC GAG CTA TTC TTC CTT CAA CCA TC-3'

Interner Standard für qPCR

IS\_f: 5'-ACC GTT GAT TCG CAC AAT TGG TCA TCG-3'

IS\_r: 5'-TAC TGC GGG TCG GCA ATC GGA CG-3'.

T7-Promotor (Sequenzier-Oligonukleotid)

T7\_f: 5'-TAC CTC TAT ACT TTA ACG TC-3'

### 7.2 Effekte von pH-Wert und Lösungsmittel auf die Extraktion

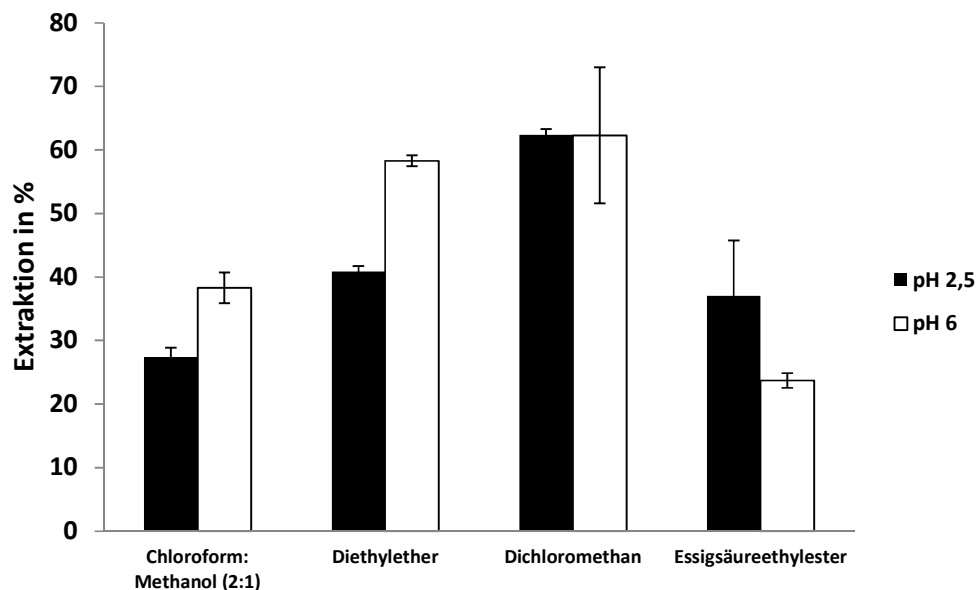
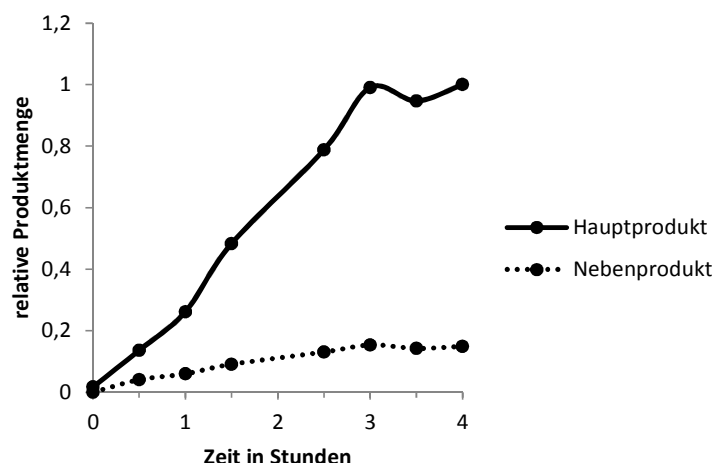


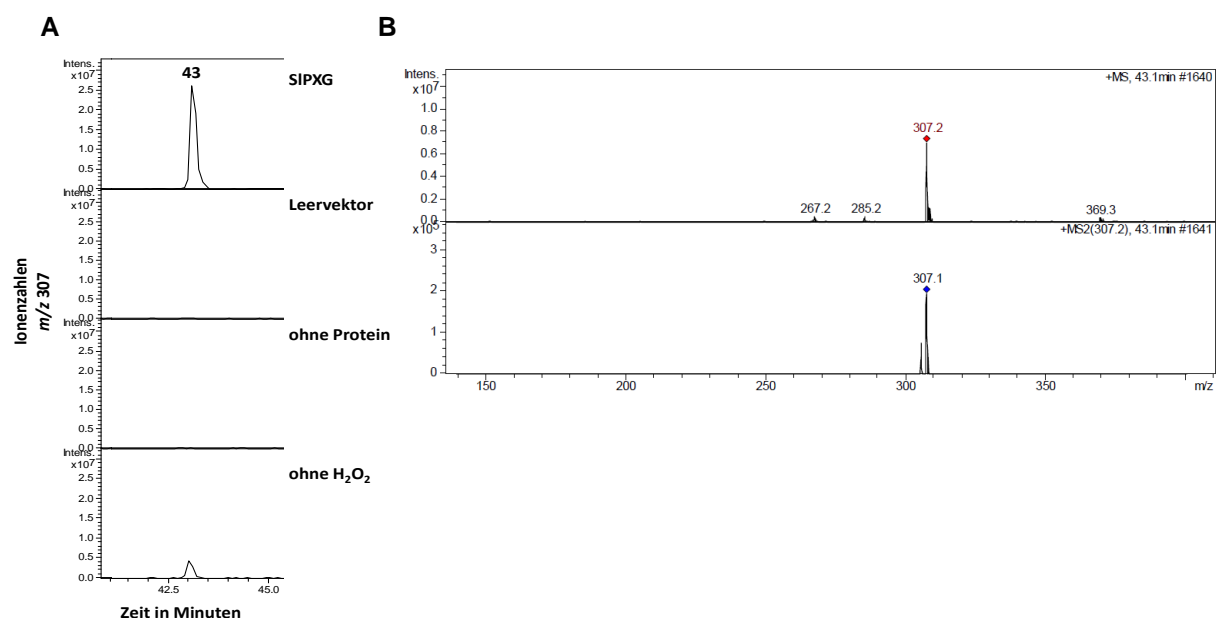
Abbildung 7.1 Extraktion von 9-HPOD aus wässriger Lösung in Abhängigkeit von pH-Wert und Lösungsmittel. Gemessen wurde das extrahierte 9-HPOD mittels HPLC-UV.

### 7.3 Synthese der $\alpha$ -Linolensäureoxide für eine Analyse mittels NMR

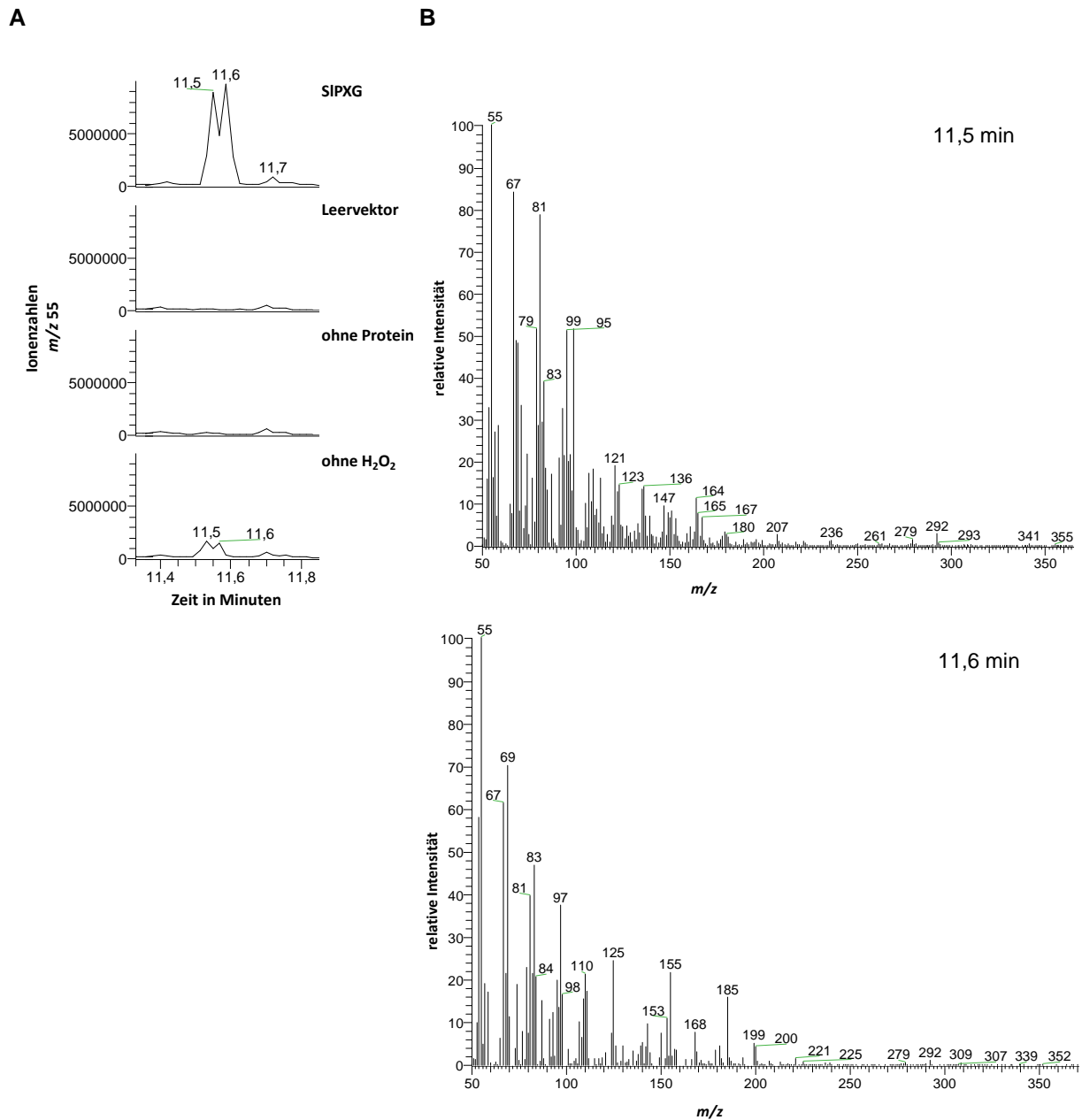


**Abbildung 7.2 Reaktionsverlauf der Oxidation von  $\alpha$ -Linolensäure durch die SIPXG in vierstündiger Synthese.** In einem 100 ml-Reaktionsansatz wurden 10 mg Proteinrohextrakt (mit überexprimierter SIPXG) und 180  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -Linolensäure in Natriumacetatpuffer (10 mmol/l, pH 6) 4 Stunden gerührt. Halbstündig wurden je 250  $\mu\text{mol}$  Wasserstoffperoxid zugefügt. Ebenfalls halbstündig wurden Proben des Hauptproduktes und eines der beiden Nebenprodukte aus dem Reaktionsansatz extrahiert und mit GC-MS gemessen. Das zweite Nebenprodukt lag in sehr geringen Mengen vor.

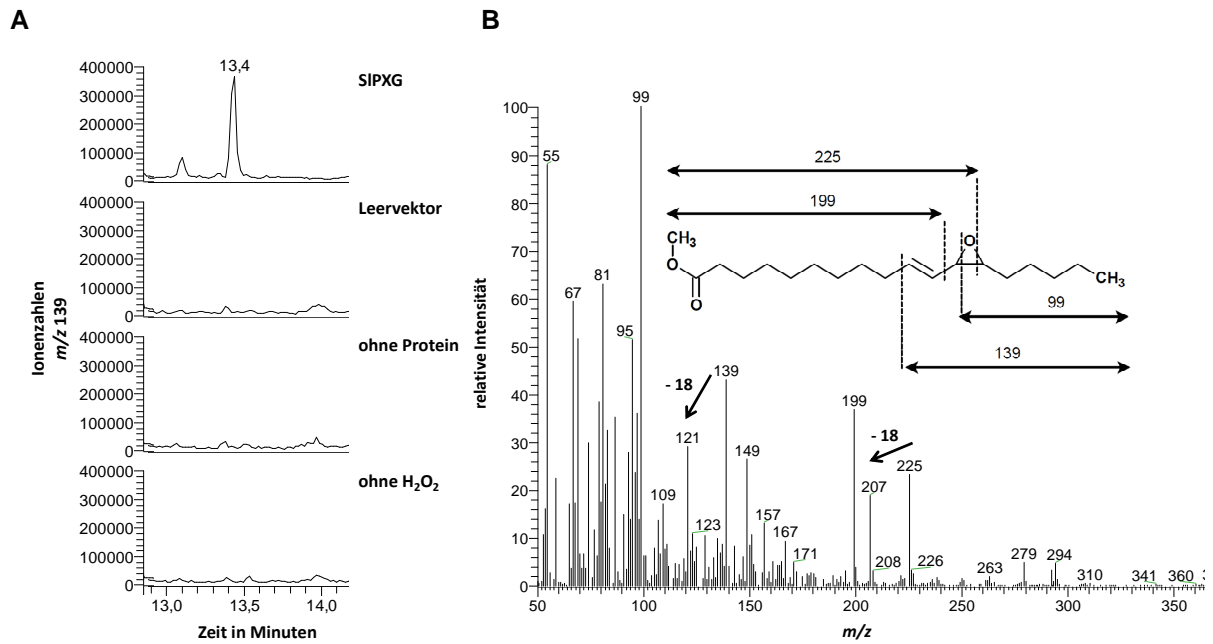
### 7.4 Chromatogramme des Substratscreening



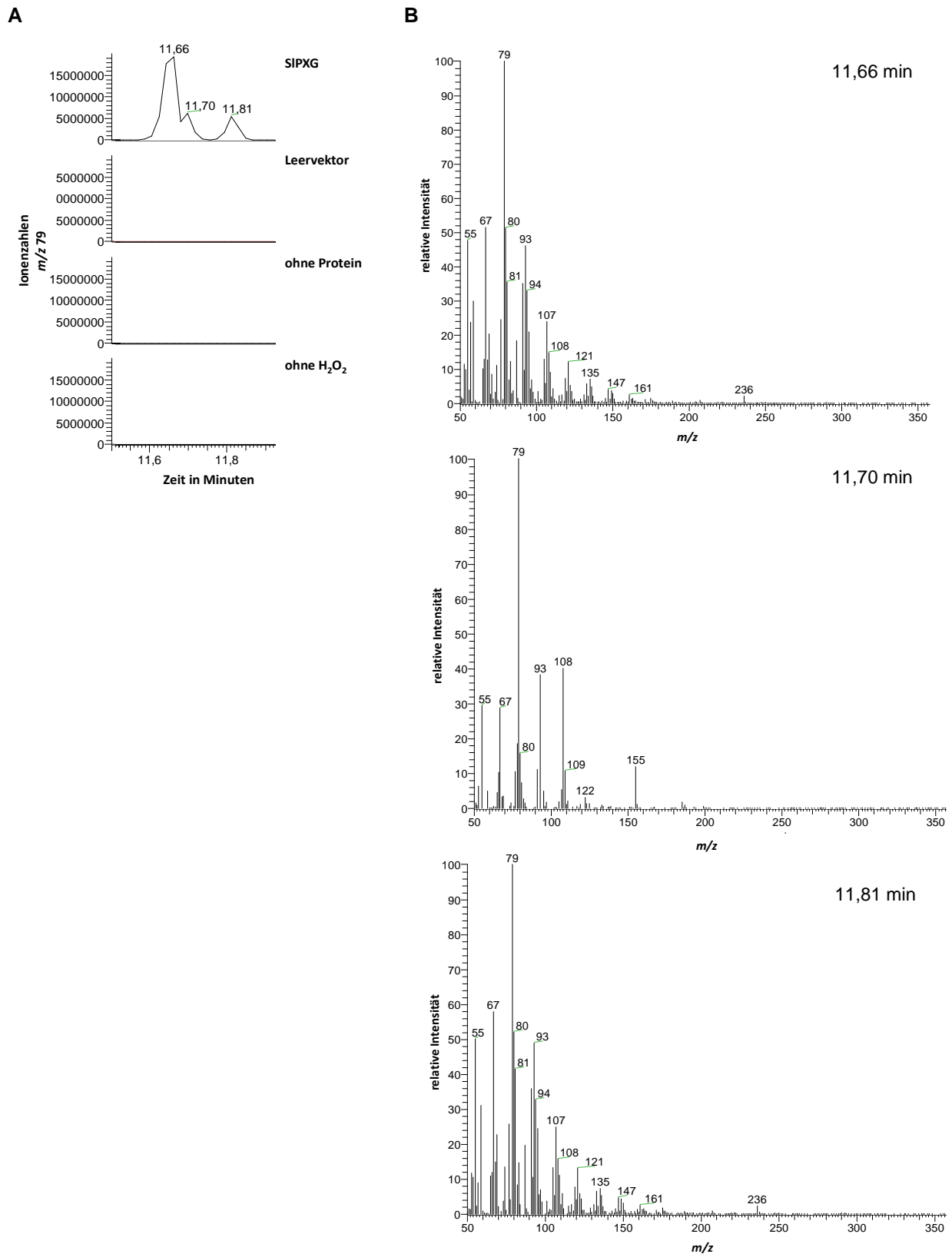
**Abbildung 7.3 Epoxidierung von Oleylalkohol zu 9,10-Epoxyoctadecanol durch SIPXG.** Das Epoxid wurde mittels LC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** LC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum und Tochterionenspektrum von 9,10-Epoxy-steaoctadecanol (43 Minuten).



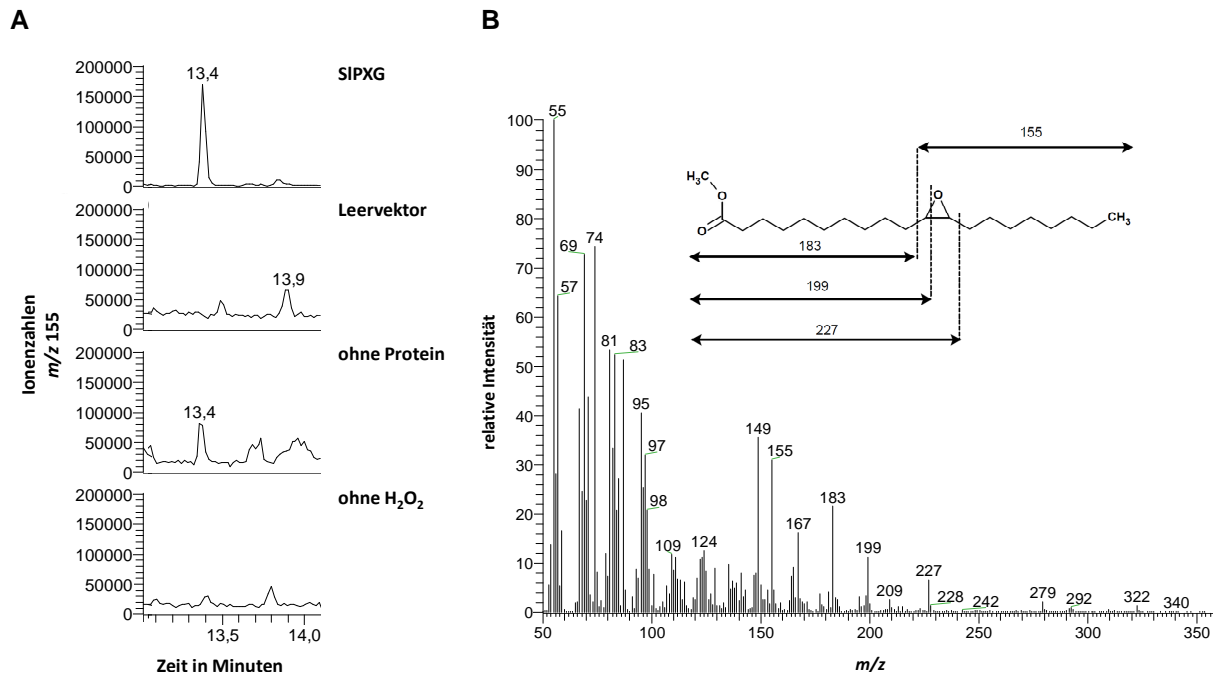
**Abbildung 7.4** Epoxidierung von Linolsäure zu 12,13-Epoxy-9-octadecensäure (11,5 min) und 9,10-Epoxy-12-octadecensäure (11,6 min) durch SIPXG. Die Epoxide wurden nach der Reaktion methyliert und mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektren von 12,13-Epoxy-9-octadecensäure (11,5 Minuten) und 9,10-Epoxy-12-octadecensäure (11,6 Minuten) im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit der SIPXG.

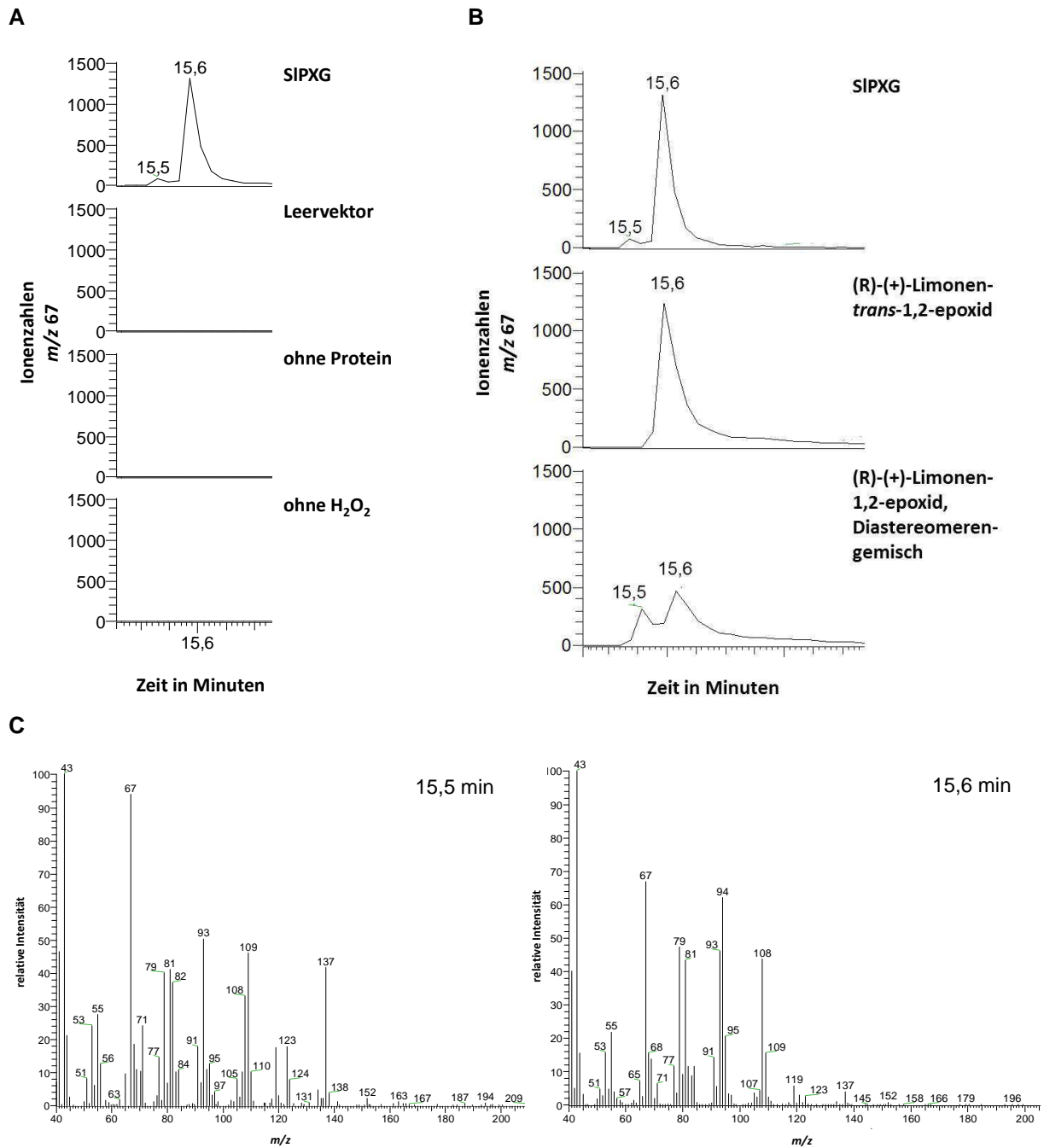


**Abbildung 7.5** Epoxidierung von konjugierter (10 *trans*, 12 *cis*) Linolsäure zu 12,13-Epoxy-10-octadecensäure durch SIPXG. Das Epoxid wurde nach der Reaktion methyliert und mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum der 12,13-Epoxy-10-octadecensäure (13, 4 Minuten).



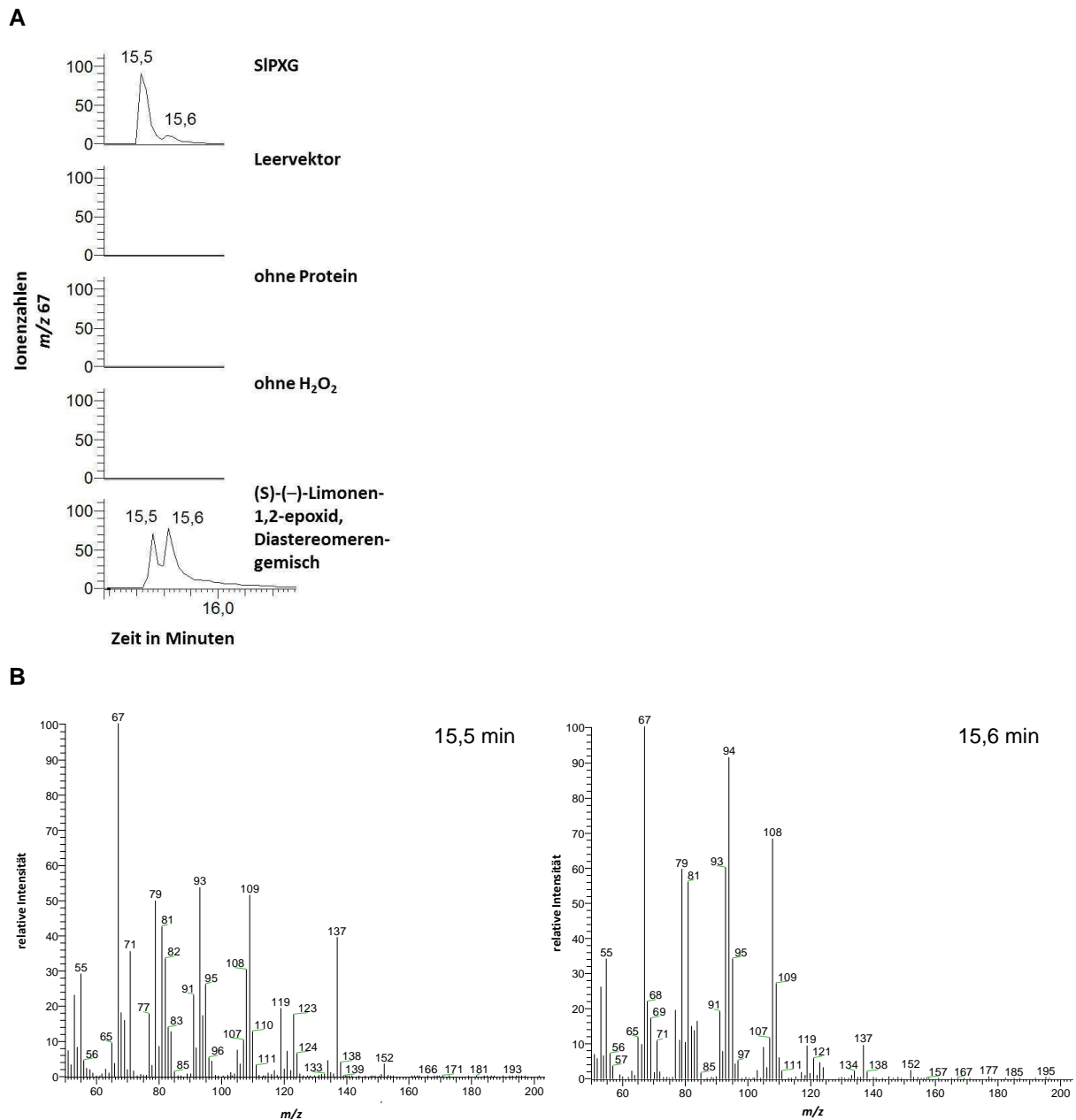
**Abbildung 7.6** Epoxidierung von  $\alpha$ -Linolensäure durch SIPXG. Die Epoxide wurden nach der Reaktion methyliert und mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektren von 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäure (11,66 Minuten) und Produkte bei 11,70 und 11,81 Minuten im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit der SIPXG.



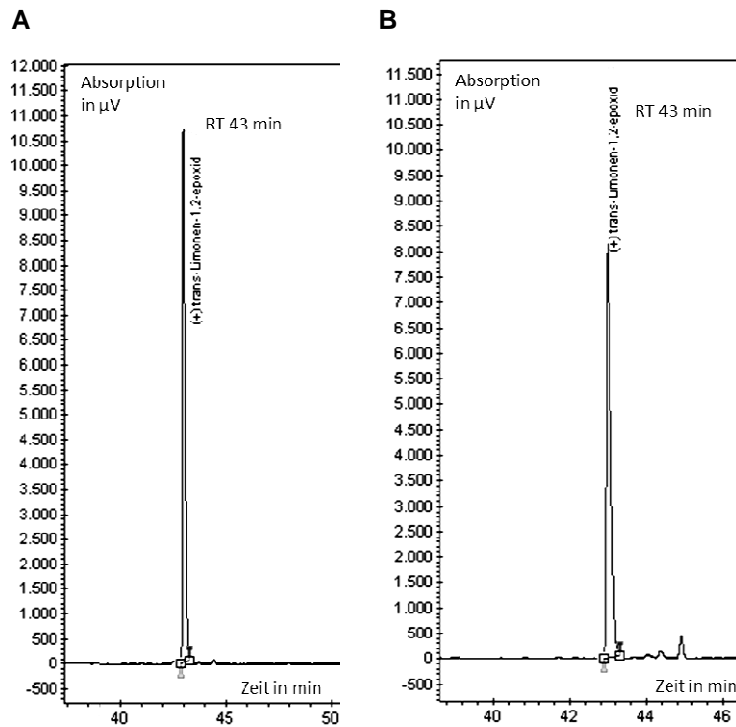


**Abbildung 7.8** Oxidierung von (R)-(+)-Limonen zu (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid durch SIPXG. Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm des Enzymprodukts mit Kontrollen, **B** Vergleich der Retentionszeiten des enzymatisch gebildeten (R)-(+)-Limonen-1,2-epoxids mit den Referenzsubstanzen, **C** Massenspektren der enzymatisch gebildeten (R)-(+)-Limonen-1,2-epoxide (15,5 Minuten und 15,6 Minuten) sowie von (R)-(+)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid (15,5 Minuten) und (R)-(+)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid (15,6 Minuten).



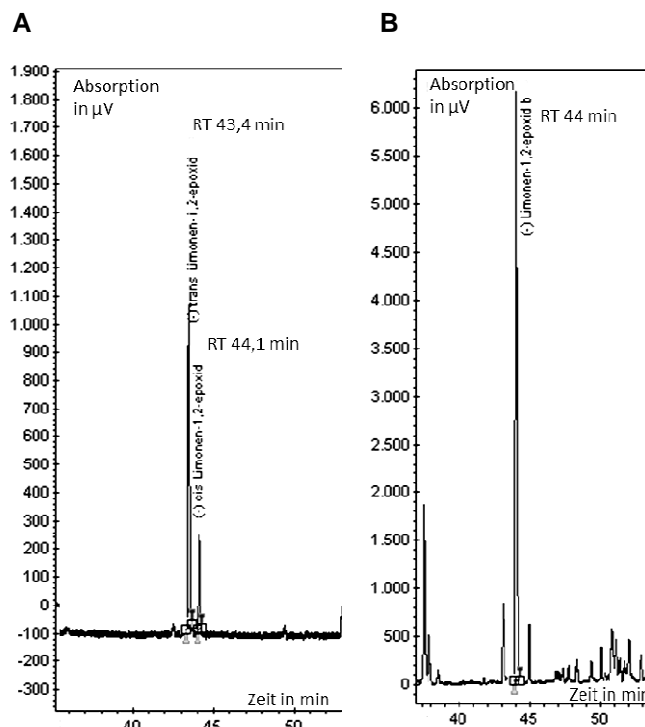


**Abbildung 7.9** Oxidierung von (S)-(-)-Limonen zu (S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid durch SIPXG. Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen. **A** GC-Chromatogramm des Enzymprodukts mit Kontrollen und dem Diastereomeren-gemisch (S)-(-)-Limonen-1,2-epoxid, **B** Massenspektren der enzymatisch gebildeten (S)-(-)-Limonen-1,2-epoxide (15,5 Minuten und 15,6 Minuten) sowie des Diastereomeren-gemisch ((S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid (15,5 Minuten) und (S)-(-)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid (15,6 Minuten)).



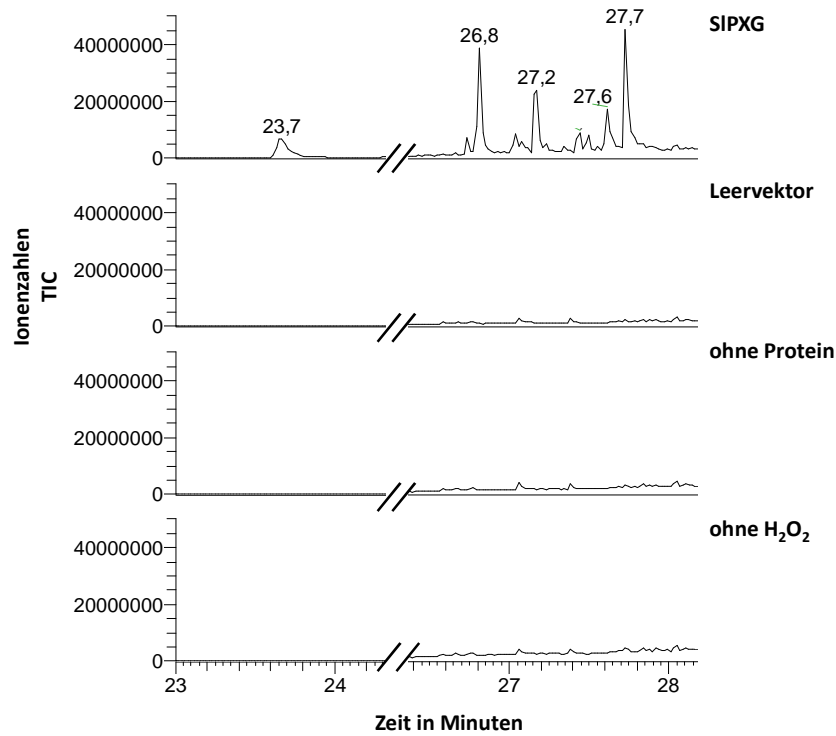
**Abbildung 7.10** GC-FID mit chiraler Kapillarsäule zur Trennung von (R)-(+)-Limonen-1,2-epoxiden.

**A** diastereomerenreine Referenzsubstanz (R)-(+)-Limonen- *trans*-1,2-epoxid, **B** (R)-(+)-Limonen-1,2-epoxid, durch SIPXG synthetisiert.

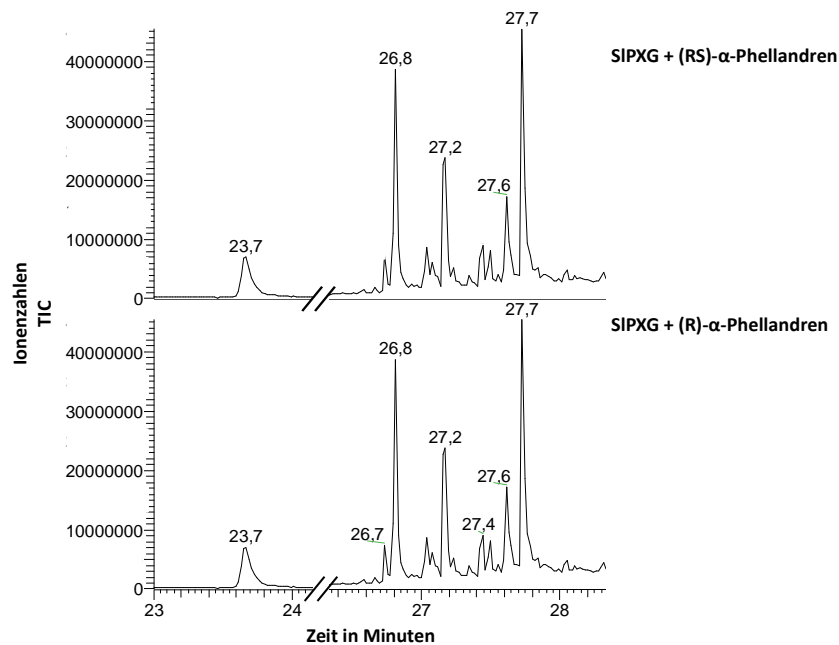


**Abbildung 7.11** GC-FID mit chiraler Kapillarsäule zur Trennung von (S)-(-)-Limonen-1,2-epoxiden.

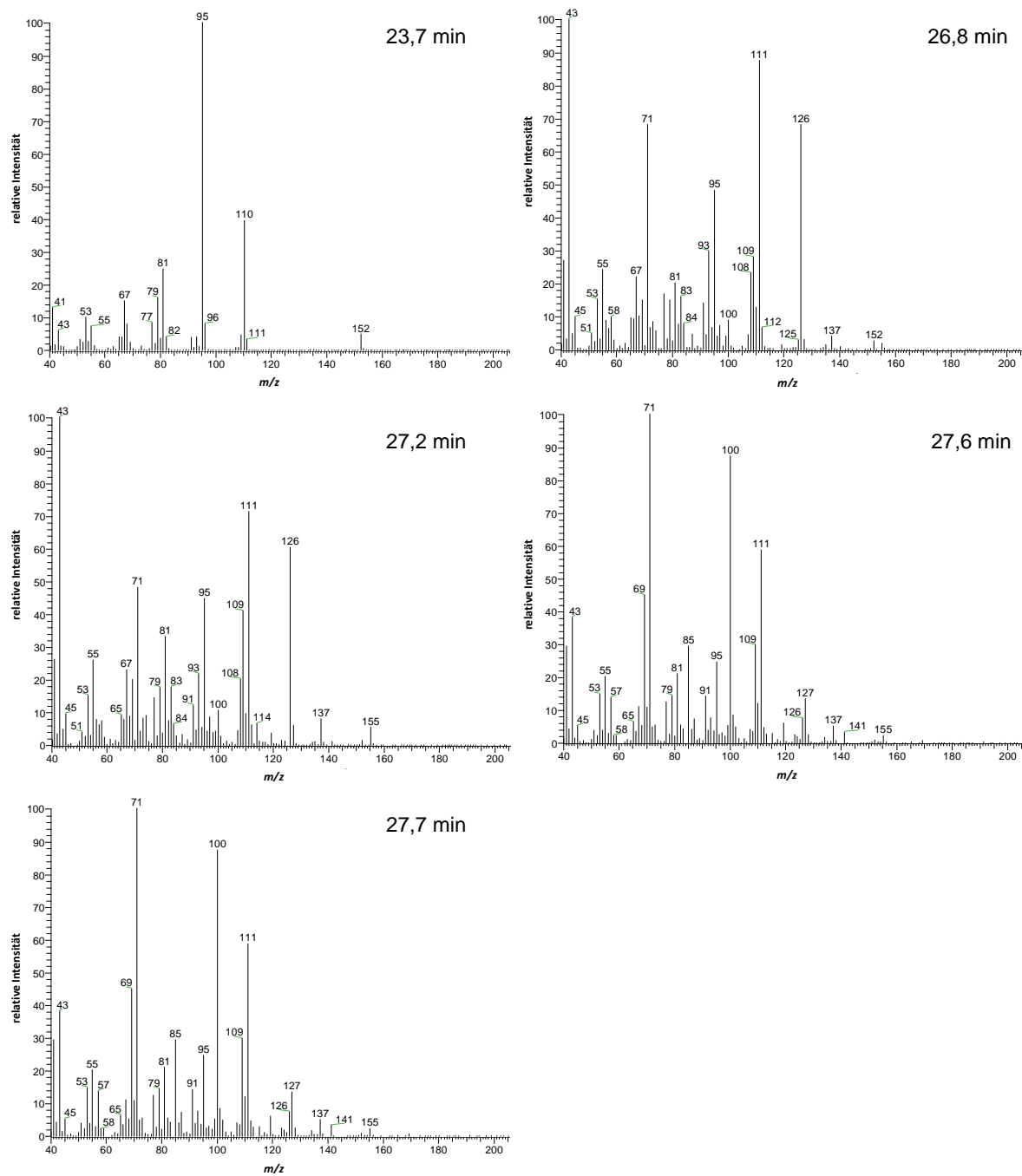
**A** Racemat von (S)-(-)-Limonen-1,2-epoxiden, angereichert durch chemisch synthetisiertes (S)-(-)-Limonen-*trans*-1,2-epoxid (43,4 Minuten), (S)-(-)-Limonen-*cis*-1,2-epoxid (44,1 Minuten), **B** (S)-(-)-Limonen-1,2-epoxid (44 Minuten), durch SIPXG synthetisiert.



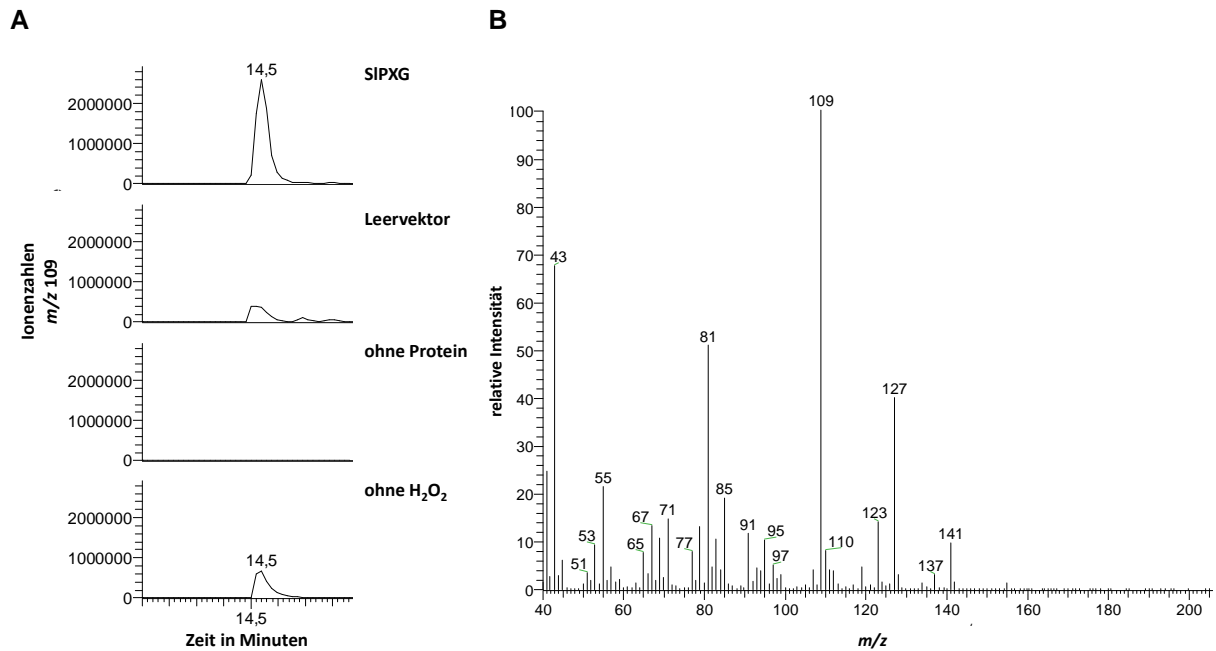
**Abbildung 7.12 Oxidierung von (RS)- $\alpha$ -Phellandren durch SIPXG: GC-Chromatogramme.** Die Oxide wurden mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid).



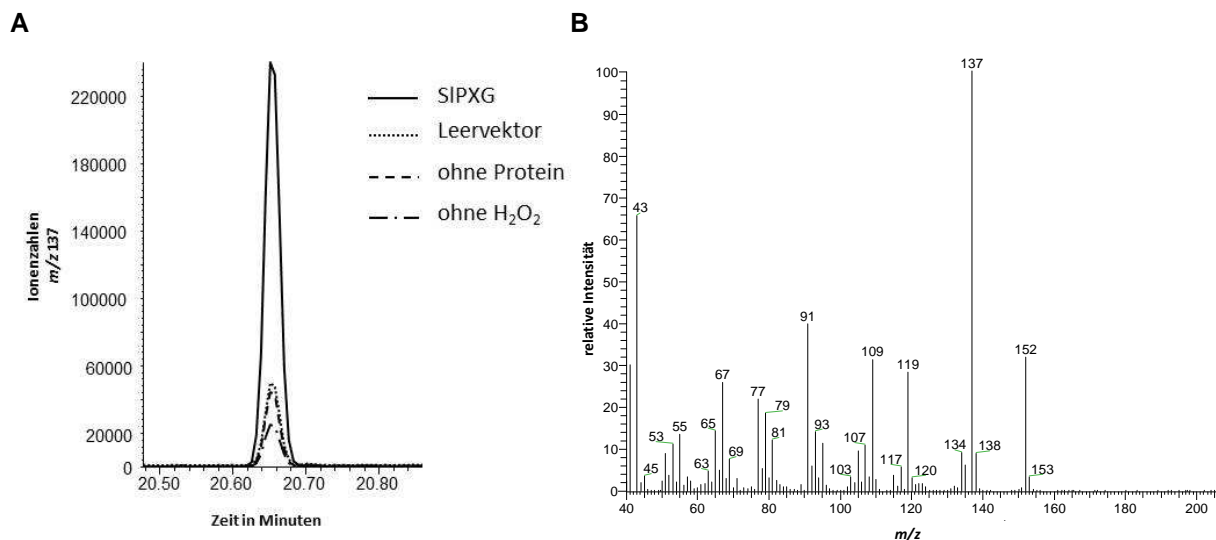
**Abbildung 7.13 Oxidierung von (RS)- $\alpha$ -Phellandren und (R)- $\alpha$ -Phellandren durch SIPXG: GC-Chromatogramme.** Die Oxide wurden mittels GC-MS gemessen.



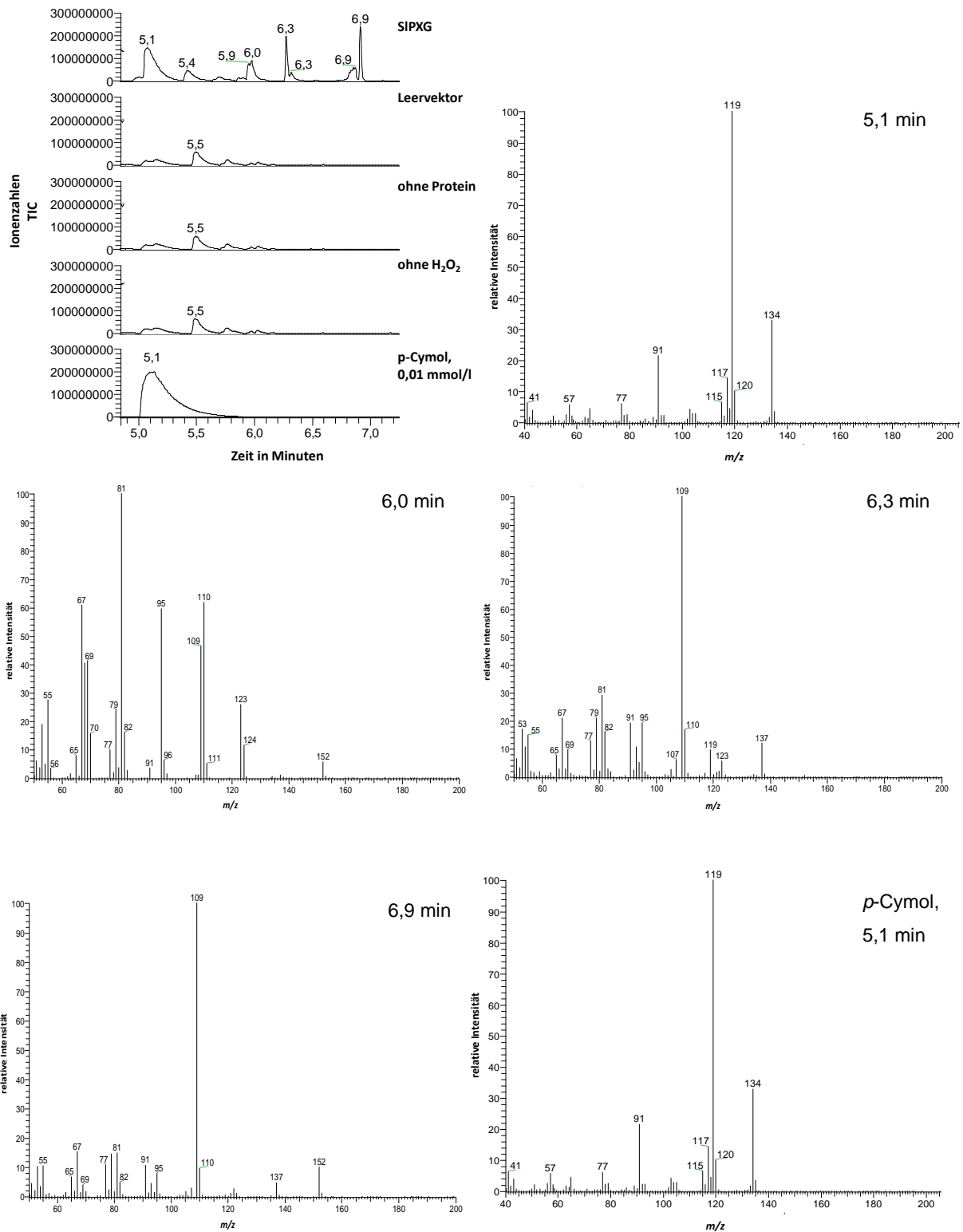
**Abbildung 7.14 Oxidierung von (RS)- $\alpha$ -Phellandren durch SIPXG: Massenspektren.** Unbekanntes Produkt (23,7 Minuten), 1,2-Epoxy-p-menth-5-en (26,8 und 27,2 Minuten) und 5,6-Epoxy-p-menth-1-en (27,6 und 27,7 Minuten) (siehe auch Chromatogramme in Abbildung 7.12 und Abbildung 7.13)



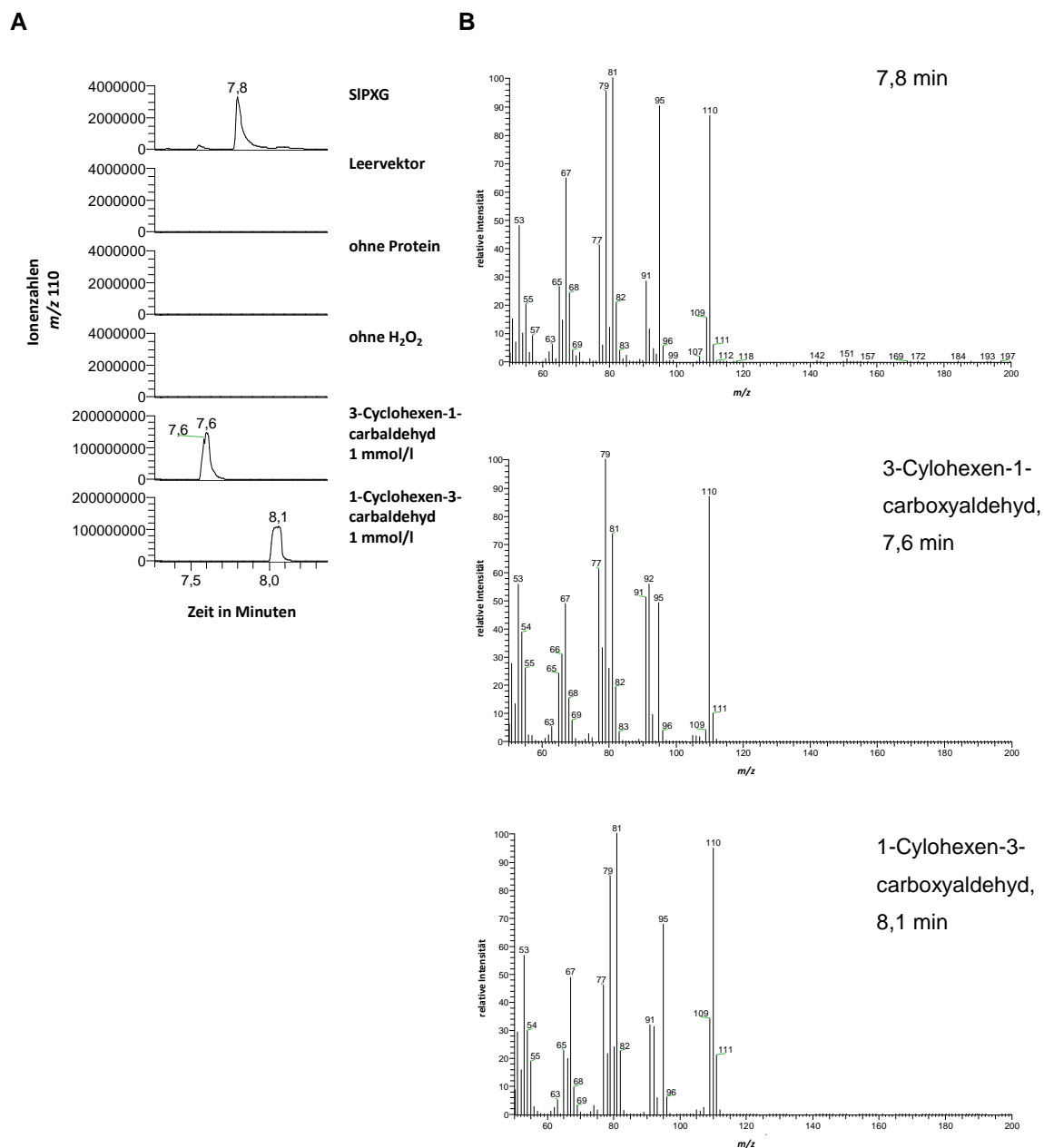
**Abbildung 7.15** Oxidierung von  $\alpha$ -Terpinen zu *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en durch SIPXG. Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum von *cis*-1,4-Dihydroxy-*p*-menth-2-en (14,5 Minuten) im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit der SIPXG.



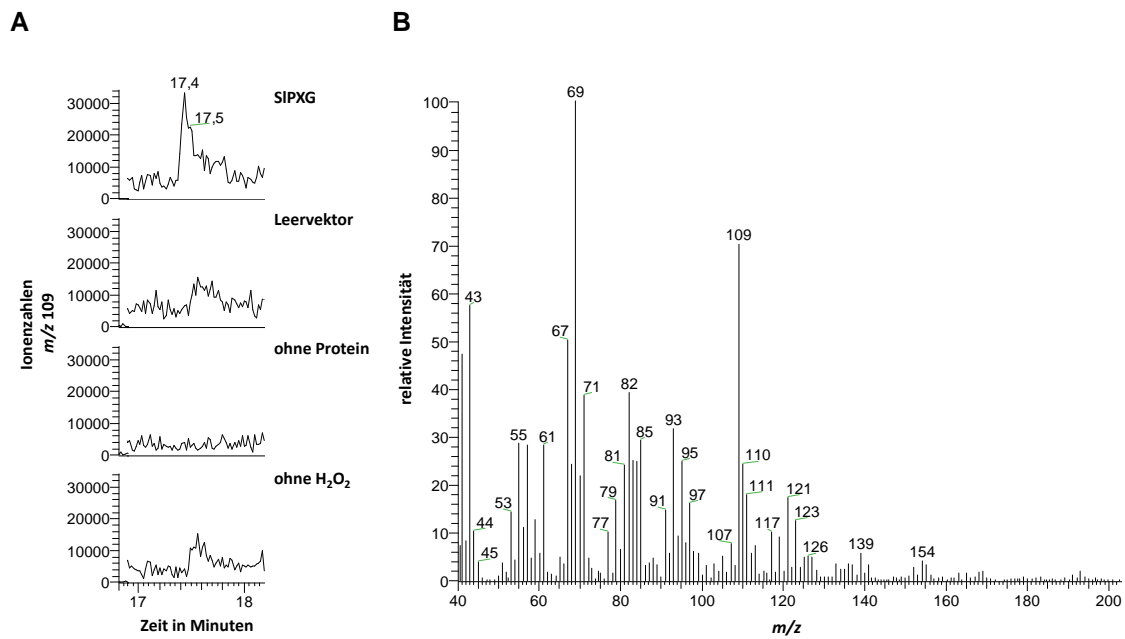
**Abbildung 7.16** Oxidierung von Terpinolen durch SIPXG. Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum bei 20,6 Minuten im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit der SIPXG.



**Abbildung 7.17 Oxidierung von  $\alpha$ -Thujen durch SIPXG.** Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen.  $p$ -Cymol diente als Referenzsubstanz. Gezeigt sind das GC-Chromatogramm (oben links) und die Massenspektren von  $p$ -Cymol (5,1 Minuten) und bei 6,0 6,3 und 6,9 Minuten im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit der SIPXG. Referenz-Massenspektrum von  $p$ -Cymol (unten rechts).



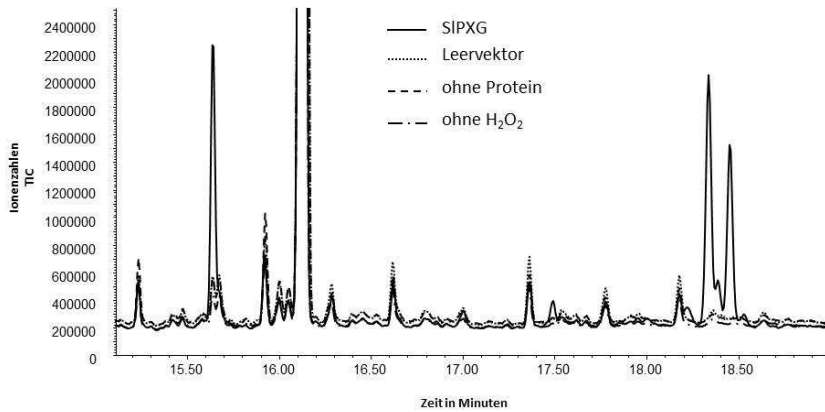
**Abbildung 7.18 Oxidierung von 1-Methyl-1,4-cyclohexadien durch SIPXG.** Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen. **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum bei 7,8 Minuten im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit der SIPXG und Massenspektren von 3-Cyclohexen-1-carbaldehyd und 1-Cyclohexen-3-carbaldehyd.



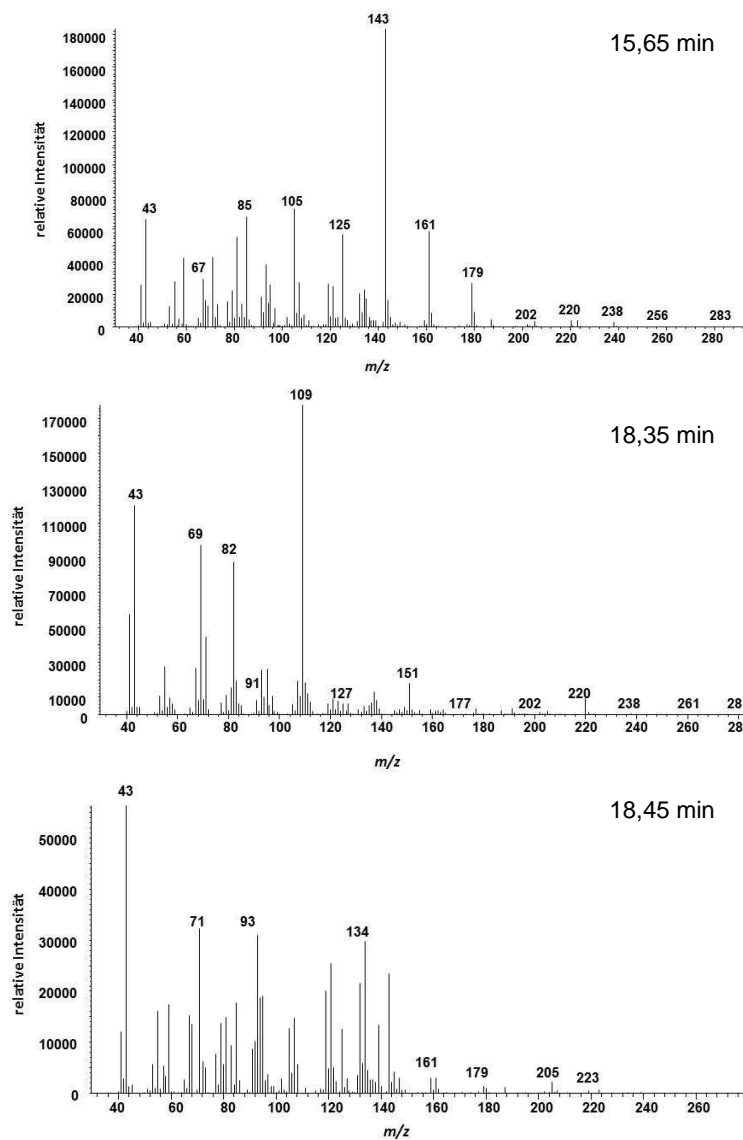
**Abbildung 7.19** Oxidierung von Nerol zu Nerol-2,3-epoxid durch SIPXG. Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum von Nerol-2,3-epoxid (17,4 Minuten) im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit der SIPXG.



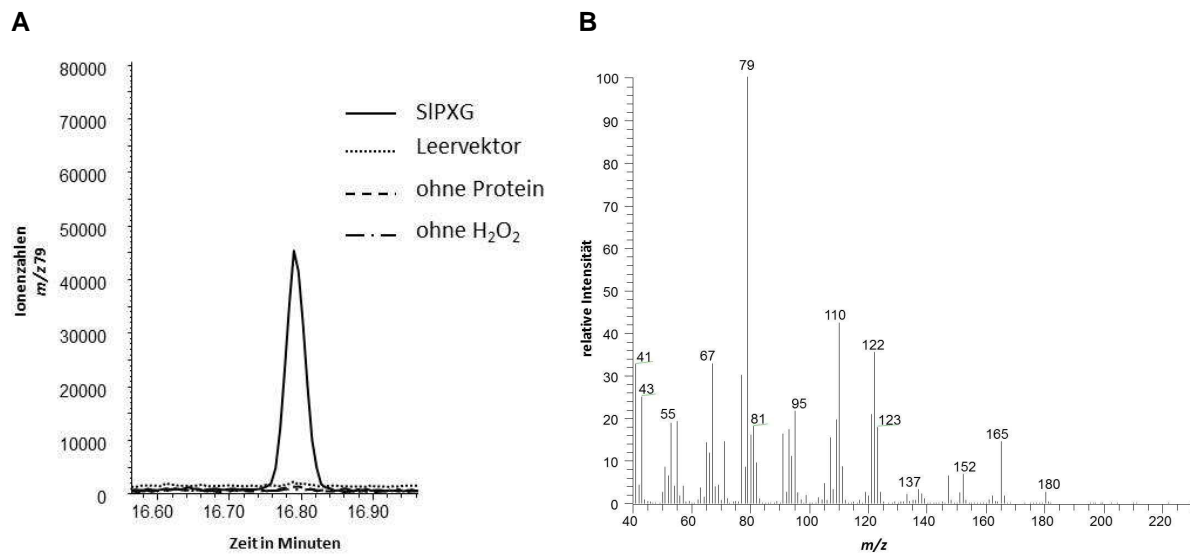
A



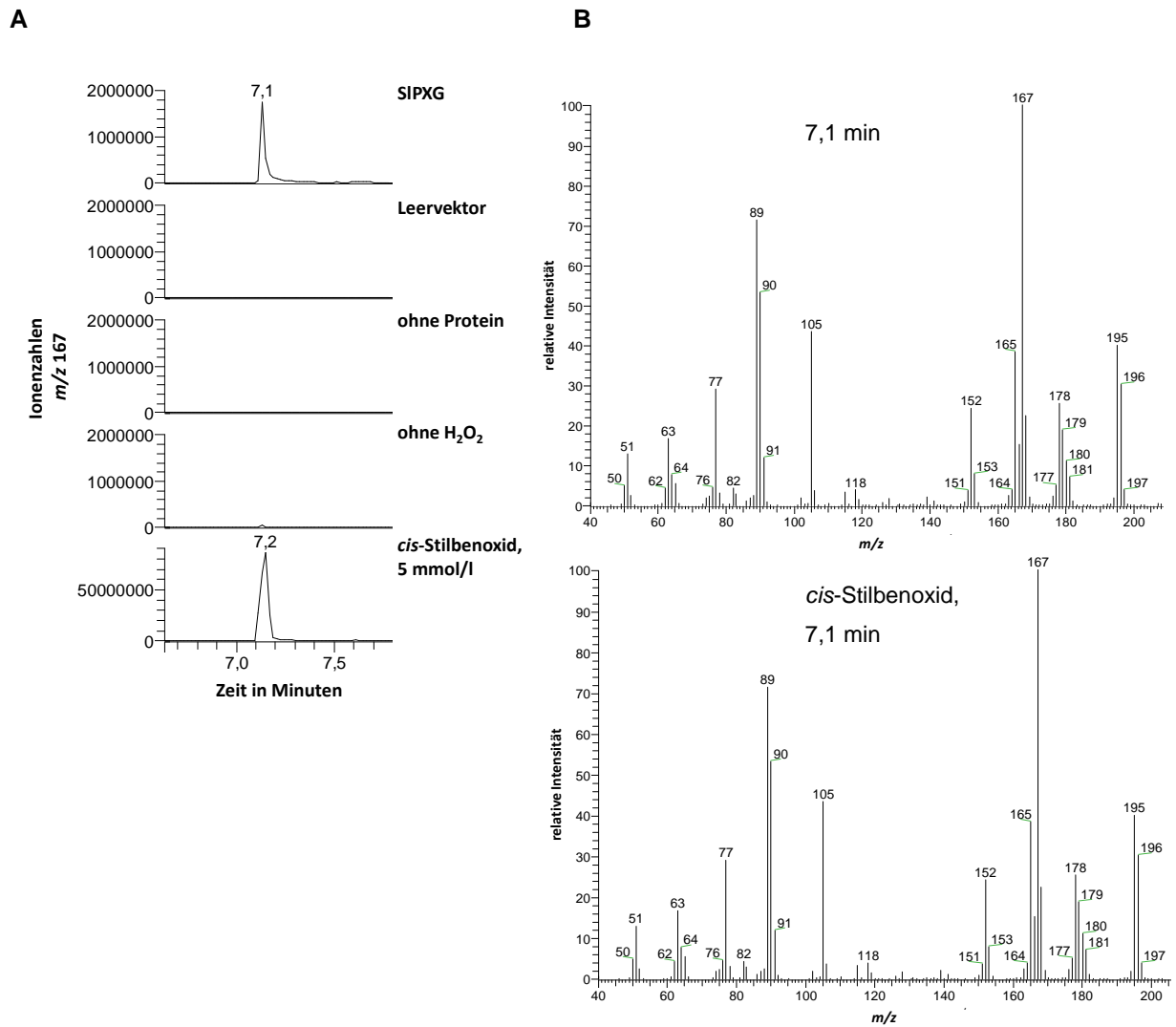
B



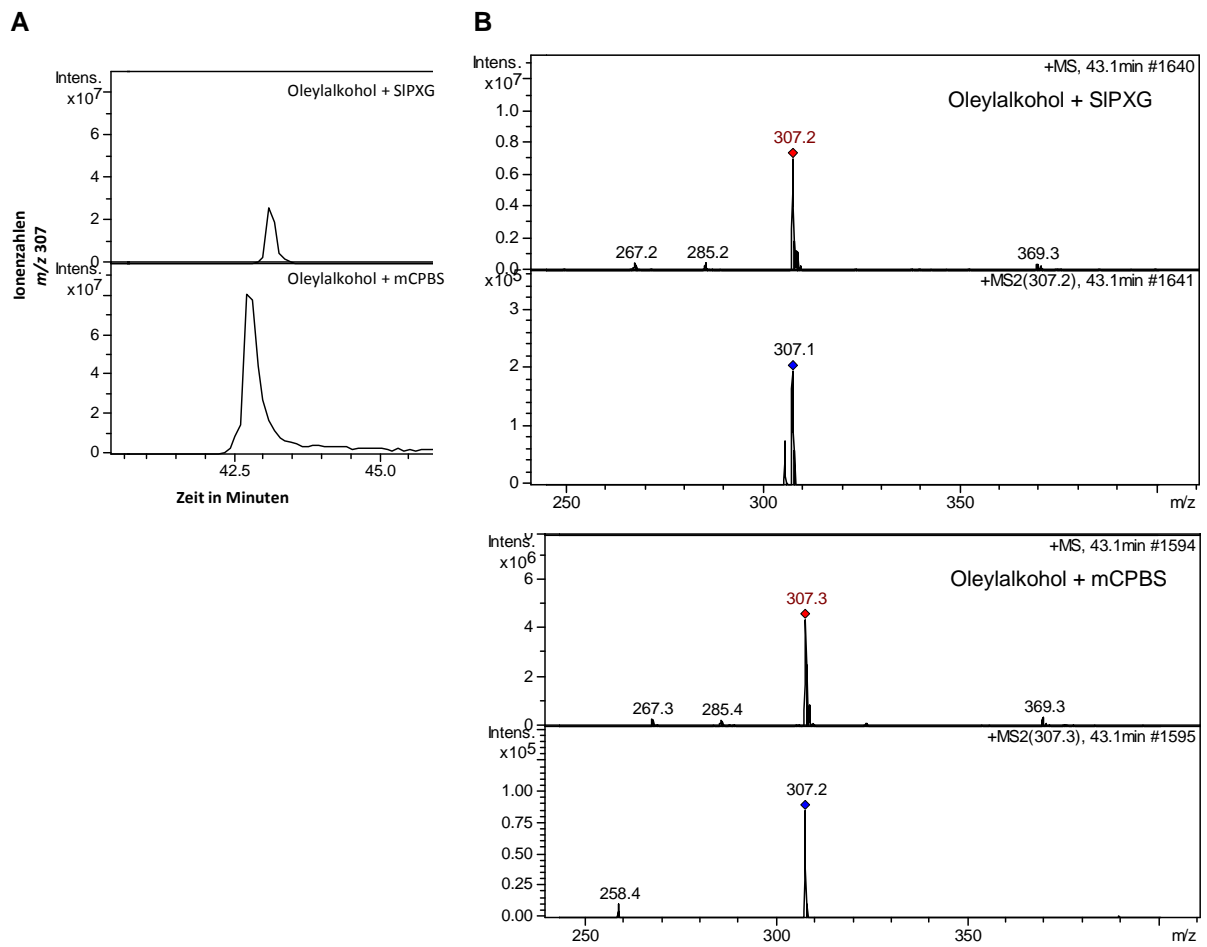
**Abbildung 7.20 Oxidierung von  $\alpha$ -Bisabolol durch SIPXG.** Die Oxide wurden mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektren von Bisabololoxid B (15,65 Minuten), 3,4-Dihydroxy-bisabolol (18,35 Minuten) und drittem Produkt (18,45 Minuten) im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit der SIPXG.



**Abbildung 7.21** Oxidierung von *cis*-Jasmon zu *cis*-Jasmon-7,8-epoxid durch SIPXG. Das Oxid wurde mittels GC-MS gemessen. Neben der Reaktion mit der mikrosomalen SIPXG wurden drei Kontrollversuche durchgeführt (Leervektorkontrolle, ohne Protein und ohne Wasserstoffperoxid). **A** GC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum bei 16,8 Minuten im GC-Chromatogramm des Ansatzes mit SIPXG.

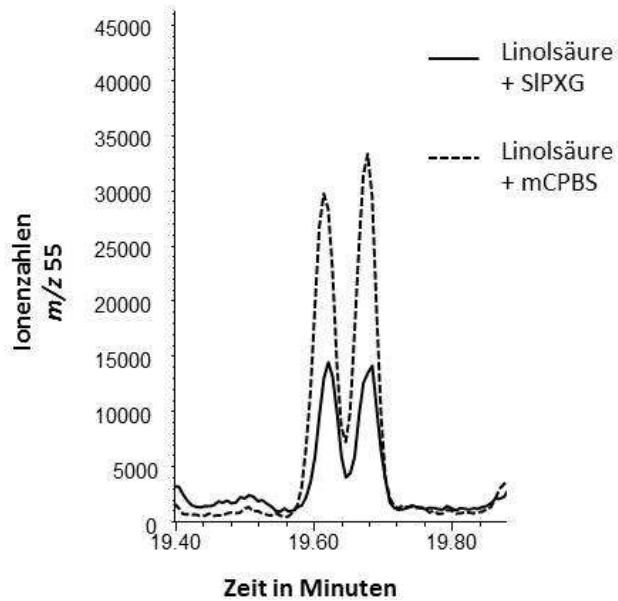


## 7.5 Chemische Oxidation

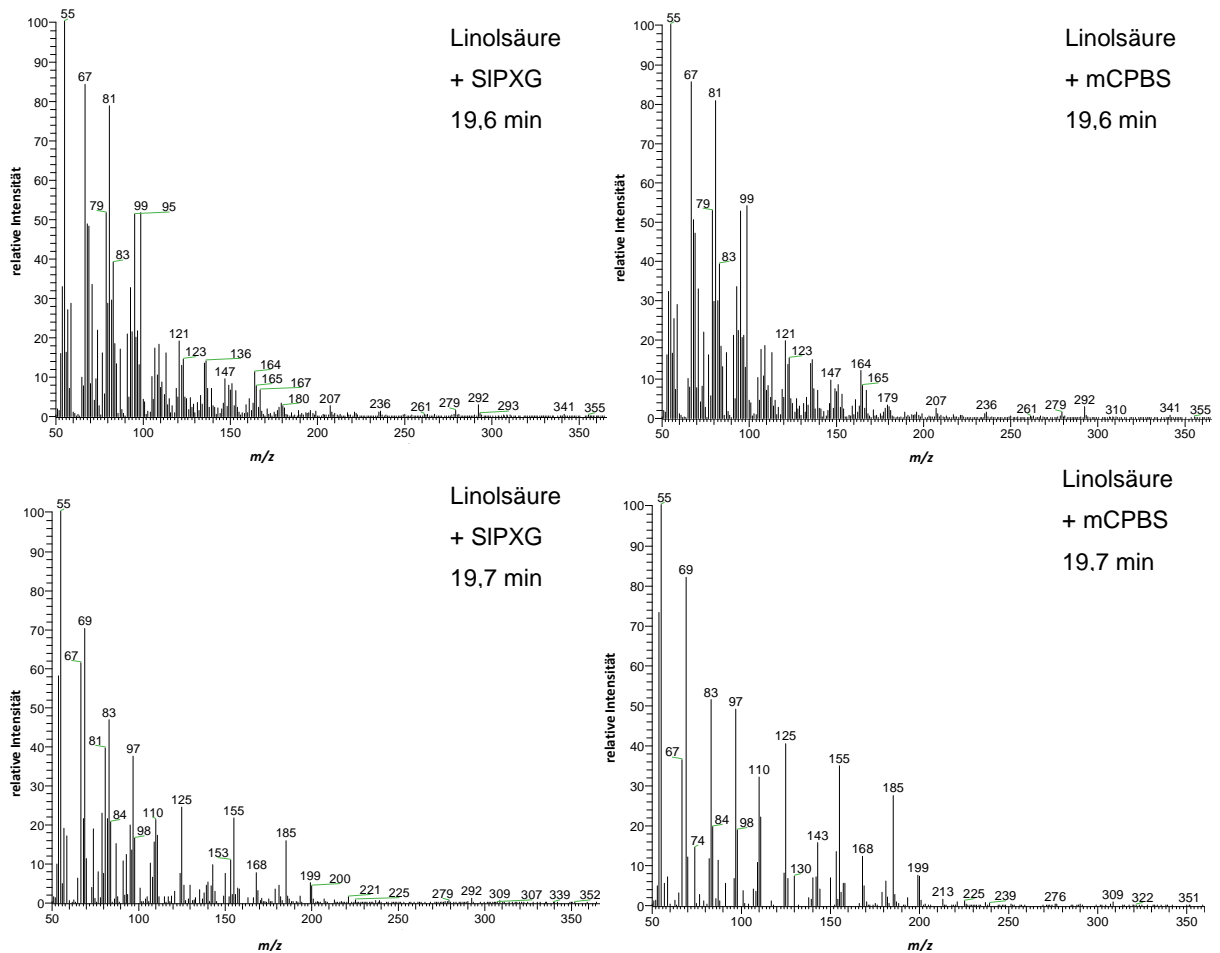


**Abbildung 7.23** Enzymatische und chemische Oxidation von Oleylalkohol. Die enzymatische Oxidation fand mit SIPXG, die chemische mit *m*-Chlorperbenzoesäure (mCPBS) statt. **A** LC-Chromatogramm, **B** Massenspektren und Tochterionenspektren im LC-Chromatogramm der Ansätze mit SIPXG und mCPBS.

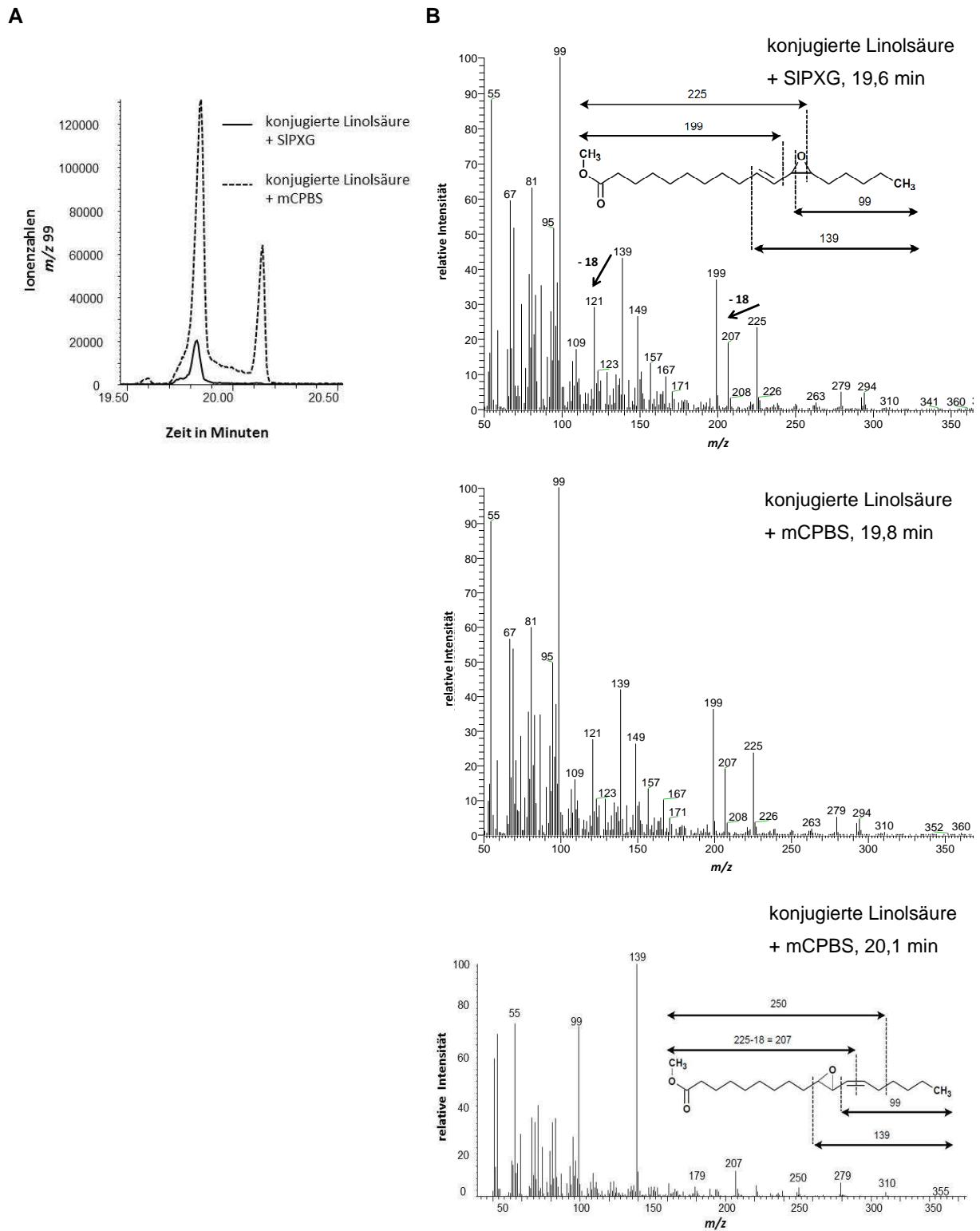
A



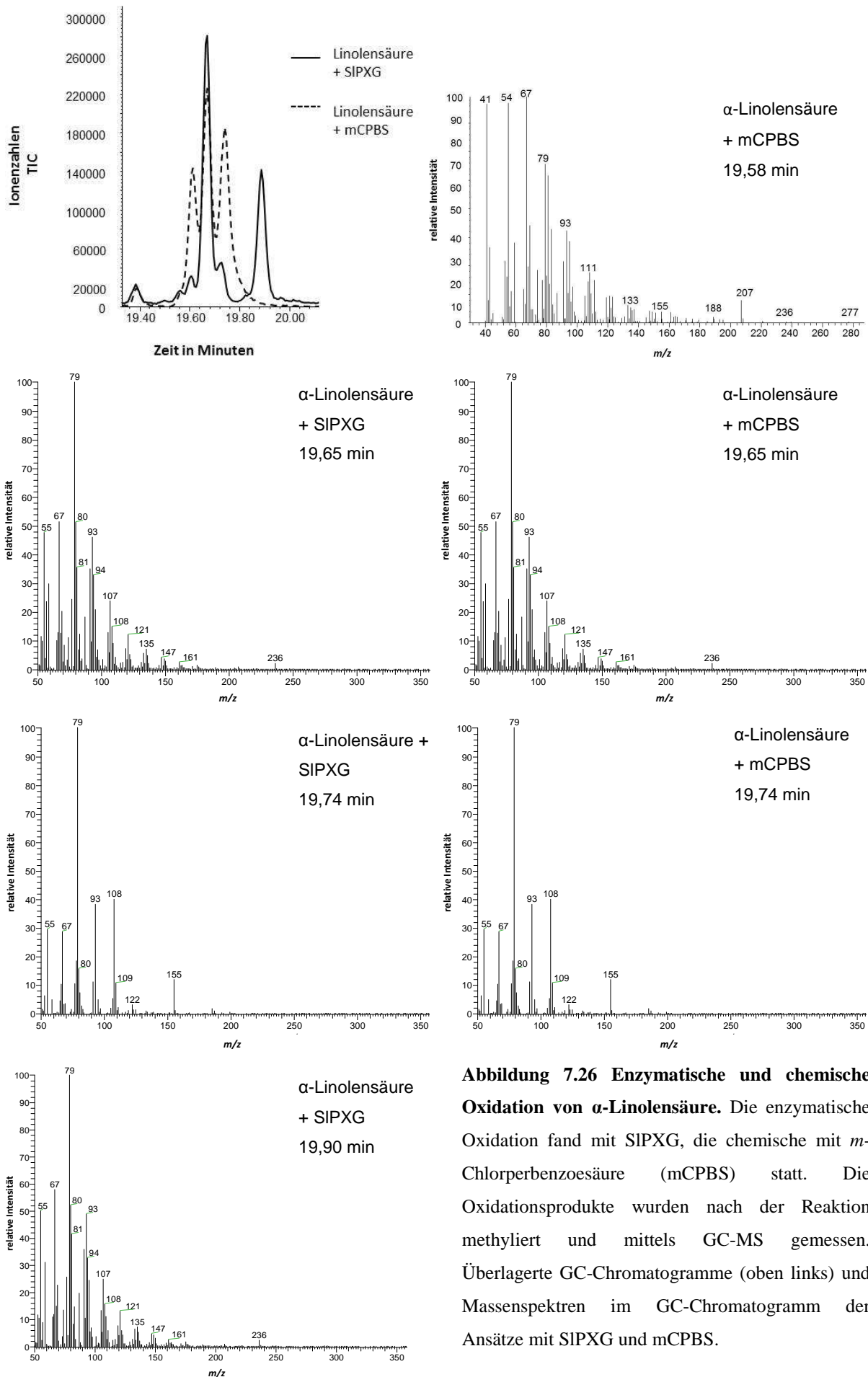
B



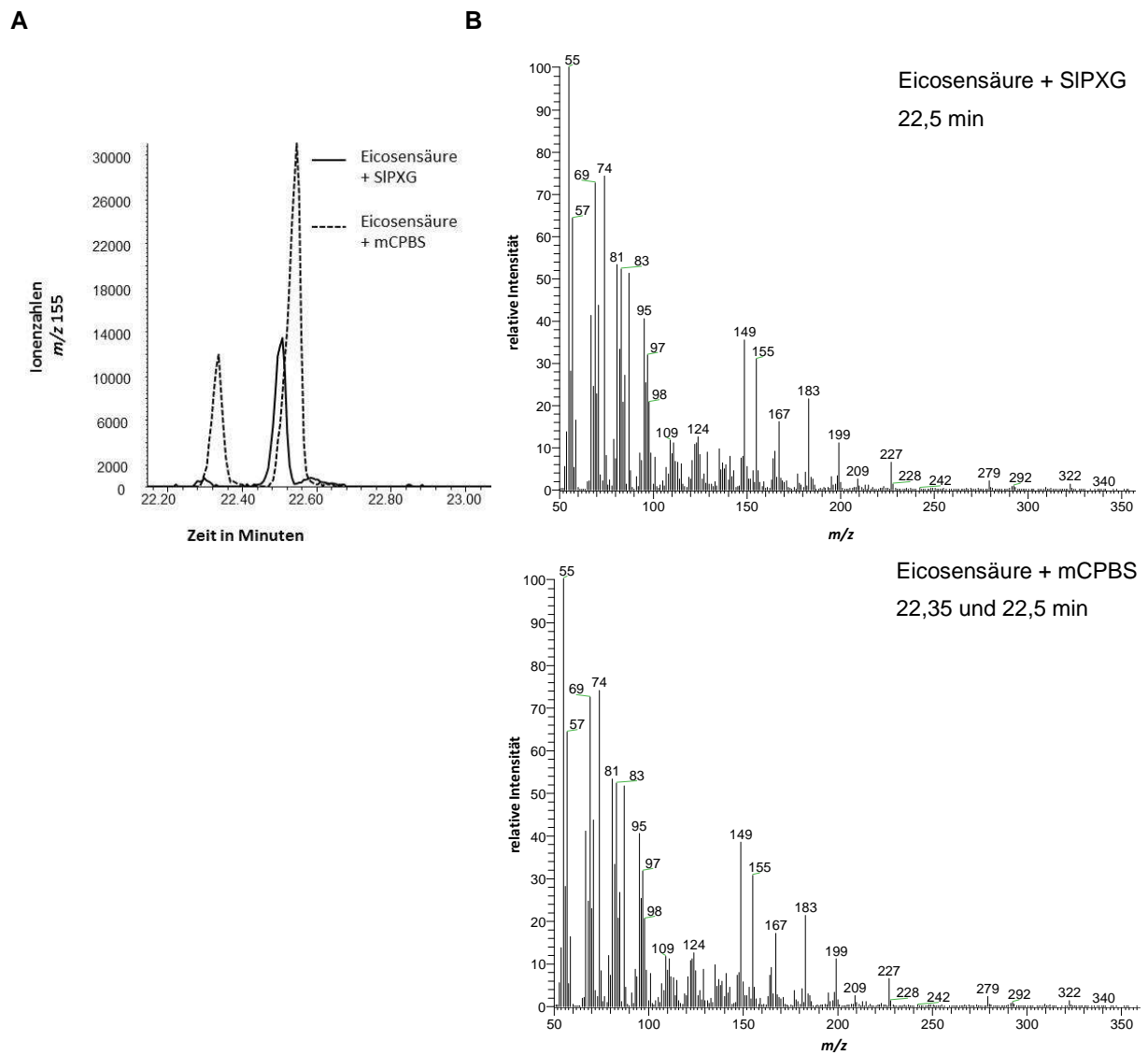
**Abbildung 7.24 Enzymatische und chemische Oxidation von Linolsäure.** Die enzymatische Oxidation fand mit SIPXG, die chemische mit *m*-Chlorperbenzoesäure (mCPBS) statt. Die Oxidationsprodukte wurden nach der Reaktion methyliert und mit GC-MS gemessen. **A** überlagerte GC-Chromatogramme, **B** Massenspektren im GC-Chromatogramm der Ansätze mit SIPXG und mCPBS.



**Abbildung 7.25 Enzymatische und chemische Oxidation von konjugierter (10 *trans*, 12 *cis*) Linolsäure.** Die enzymatische Oxidation fand mit SIPXG, die chemische mit *m*-Chlorperbenzoesäure (mCPBS) statt. Die Oxidationsprodukte wurden nach der Reaktion methyliert und mit GC-MS gemessen. **A** überlagerte GC-Chromatogramme, **B** Massenspektren im GC-Chromatogramm der Ansätze mit SIPXG und mCPBS.



**Abbildung 7.26 Enzymatische und chemische Oxidation von  $\alpha$ -Linolensäure.** Die enzymatische Oxidation fand mit SIPXG, die chemische mit *m*-Chlorperbenzoesäure (mCPBS) statt. Die Oxidationsprodukte wurden nach der Reaktion methyliert und mittels GC-MS gemessen. Überlagerte GC-Chromatogramme (oben links) und Massenspektren im GC-Chromatogramm der Ansätze mit SIPXG und mCPBS.



**Abbildung 7.27 Enzymatische und chemische Oxidation von Eicosensäure.** Die enzymatische Oxidation fand mit SIPXG, die chemische mit *m*-Chlorperbenzoesäure (mCPBS) statt. Die Oxidationsprodukte wurden nach der Reaktion methyliert und mittels GC-MS gemessen. **A** überlagerte GC-Chromatogramme, **B** Massenspektren im GC-Chromatogramm der Ansätze mit SIPXG und mCPBS.

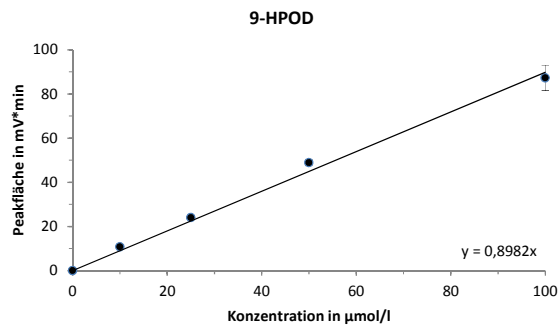


## 7.6 Gewählte Ionenspuren zur Quantifizierung und Semiquantifizierung im GC-MS-Chromatogramm

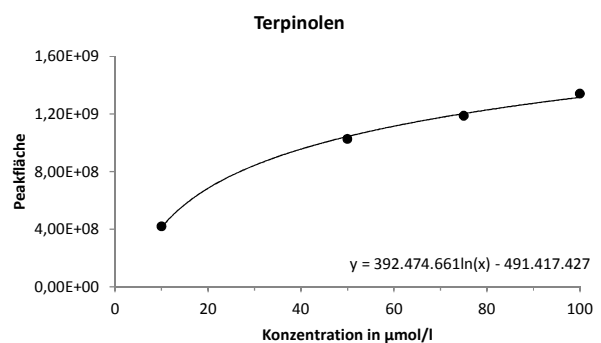
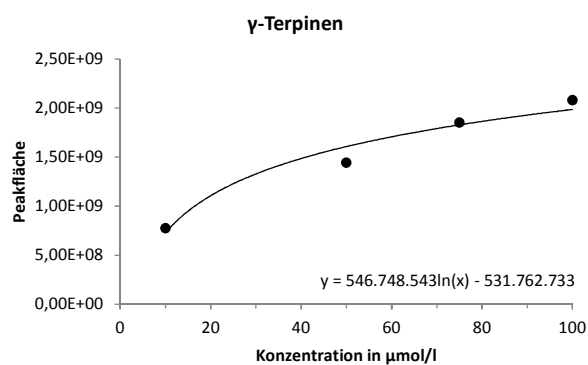
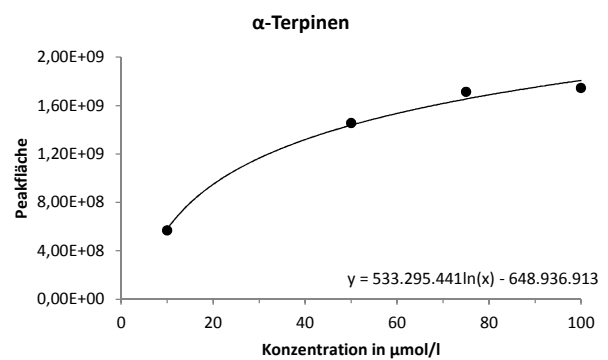
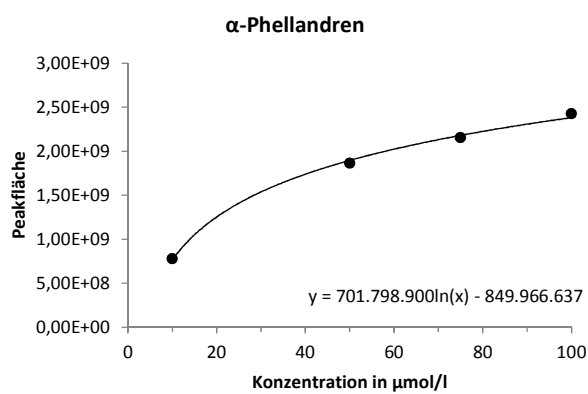
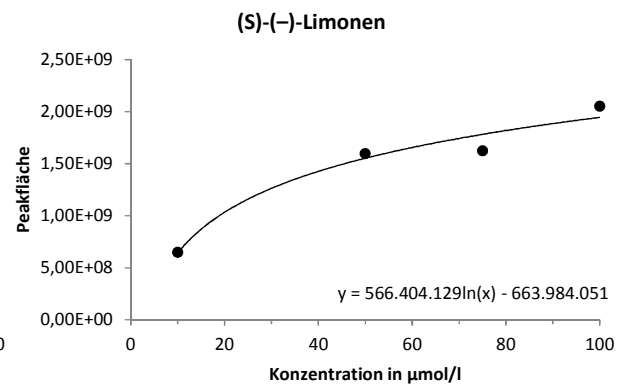
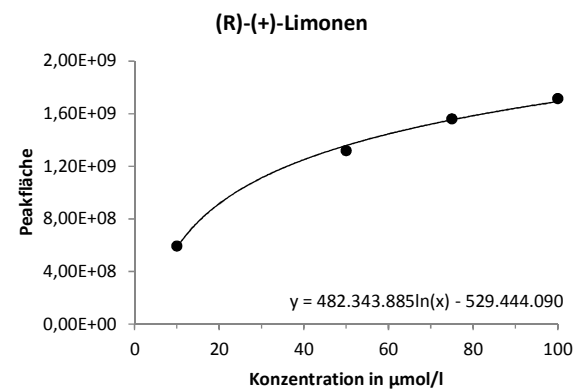
Molekül	<i>m/z</i>
9,10-Epoxy-octadecansäuremethylester	155
9,10-Epoxy-12-octadecensäuremethylester	55
12,13-Epoxy-9-octadecensäuremethylester	55
12,13-Epoxy-10-octadecensäuremethylester	99 oder 139
11,12-Epoxy-dodecansäuremethylester	155
15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäuremethylester	79
(S)-(-)-Limonen	68
(R)-(+)-Limonen	68
$\alpha$ -Phellandren	93
1,2-Epoxy- <i>p</i> -menth-5-en	126
5,6-Epoxy- <i>p</i> -menth-1-en	100
$\alpha$ -Phellandren-Oxid 1	95
$\alpha$ -Phellandren-Oxid 4	126
$\alpha$ -Terpinen	121
<i>cis</i> -1,4-Dihydroxy- <i>p</i> -menth-2-en	109
$\gamma$ -Terpinen	93
Terpinolen	121
Terpinolen-Oxid	137
$\alpha$ -Thujen	93
Nerol	69
$\alpha$ -Bisabolol	109
<i>cis</i> -Jasmon	79
<i>cis</i> -Stilben	109

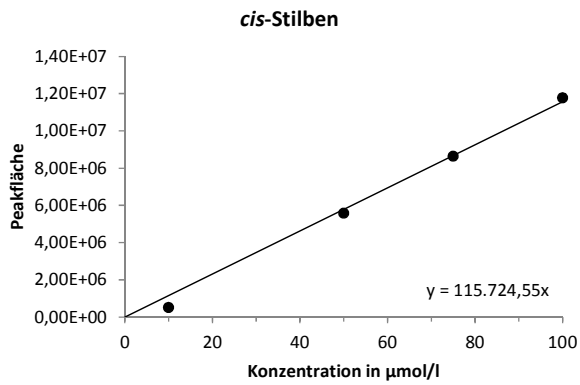
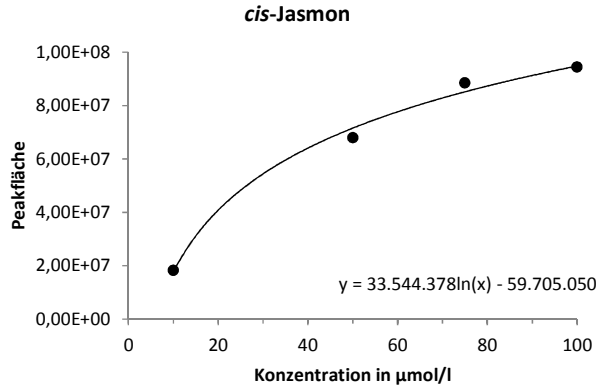
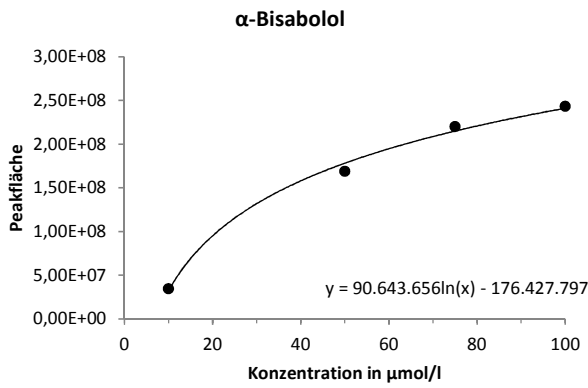
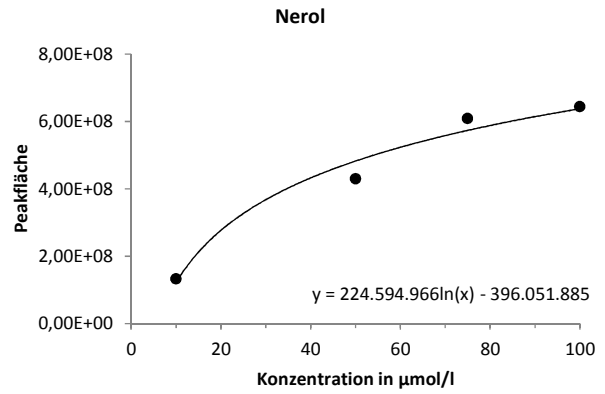
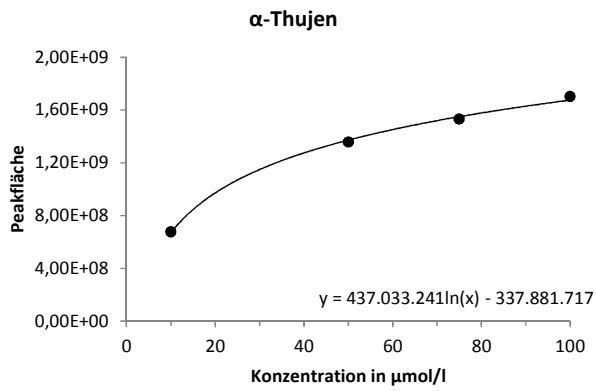
## 7.7 Eichkurven

### 7.7.1 Quantifizierung der Epoxidierung von 9-HPOD

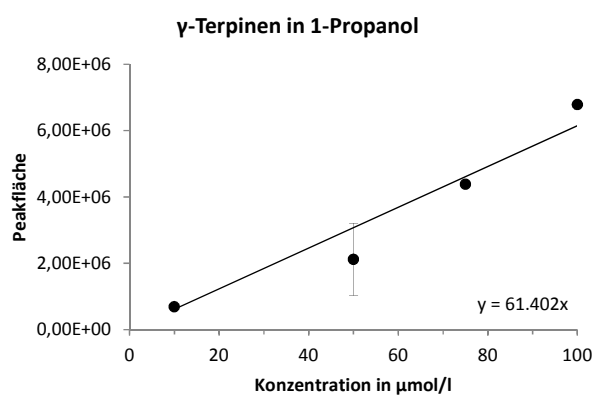
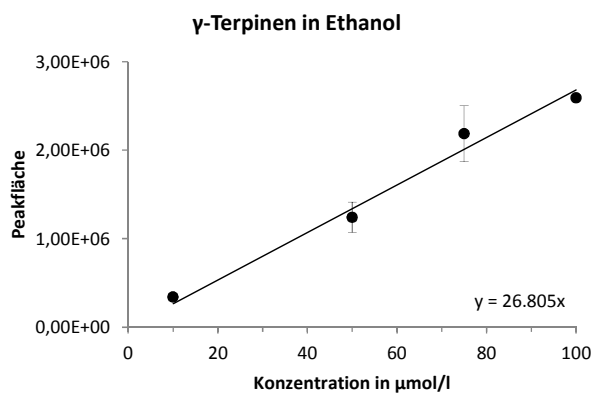
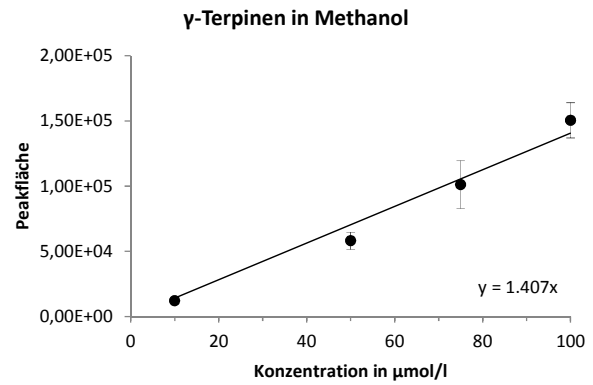
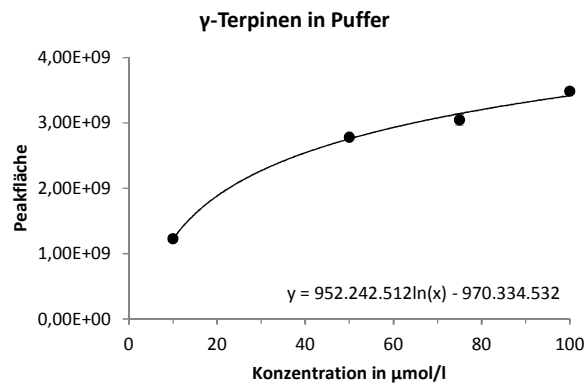


### 7.7.2 Quantifizierung der Oxidation von Terpenen und anderen sekundären Pflanzenstoffen in Natriumacetatpuffer

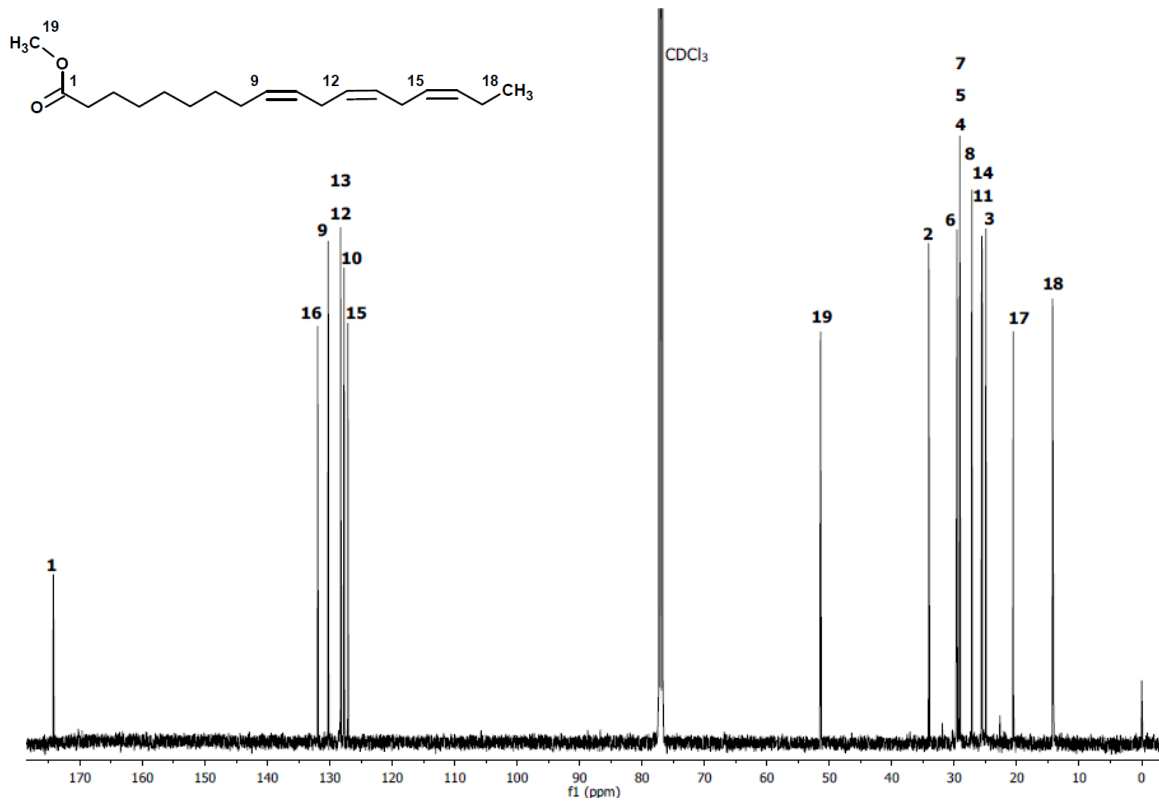
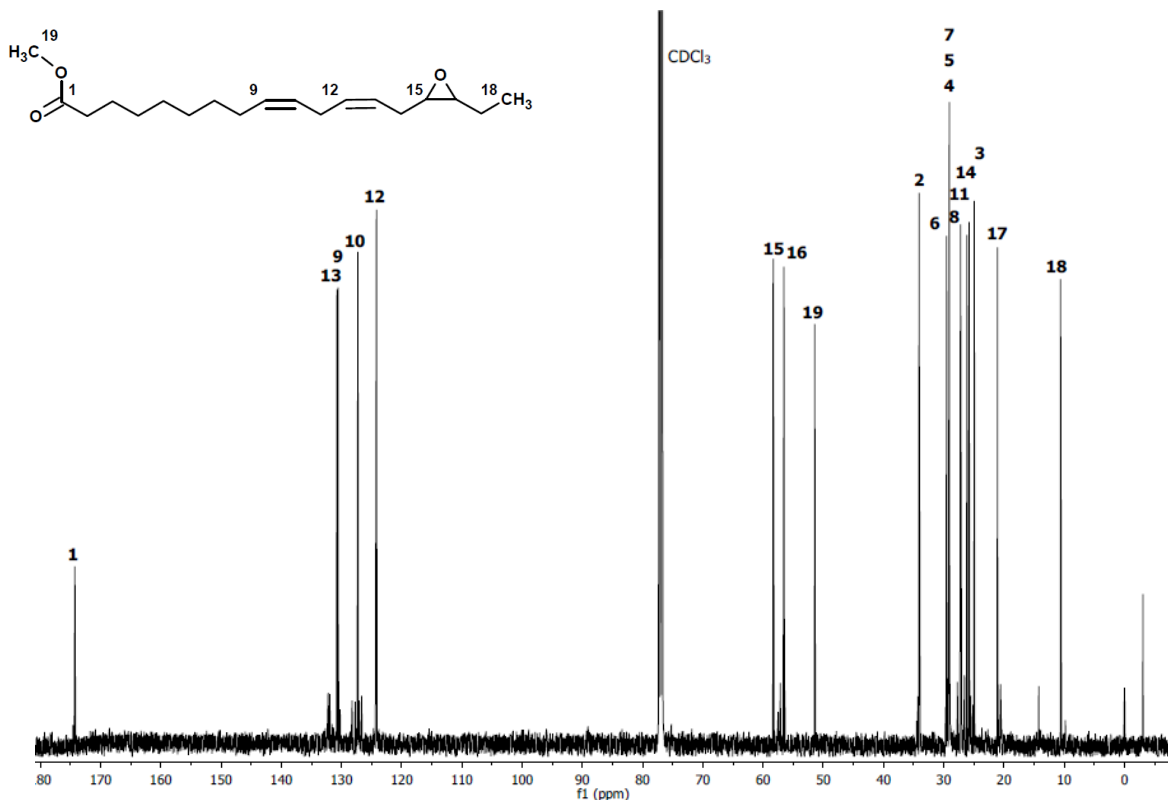


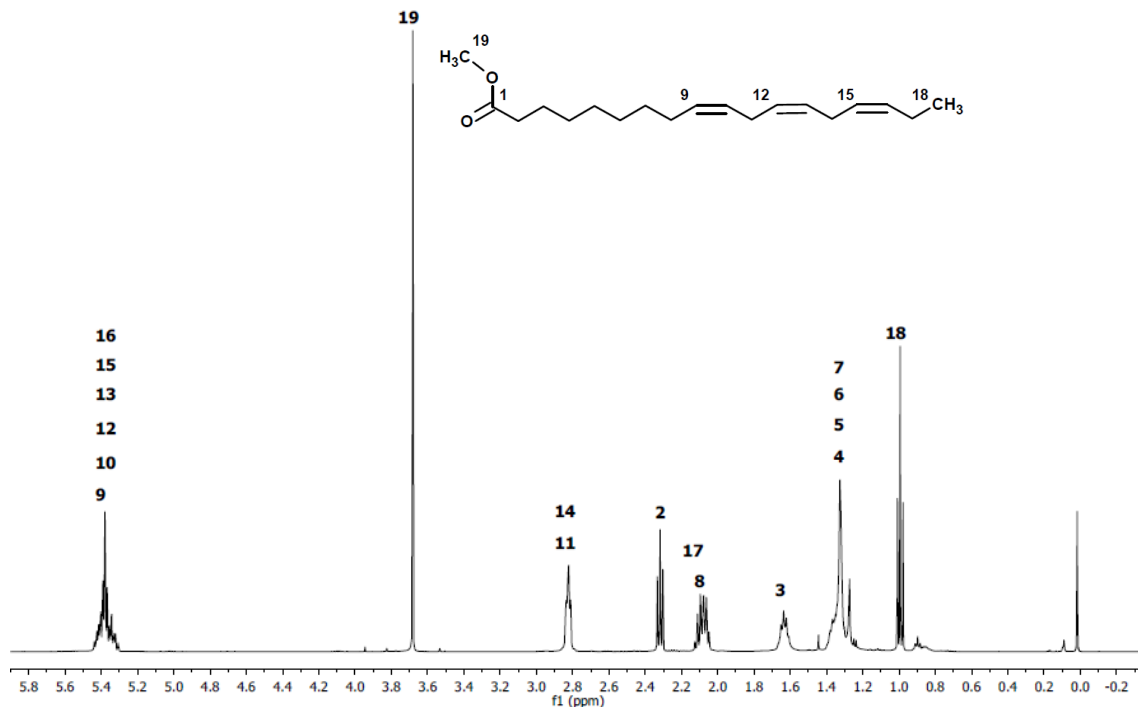
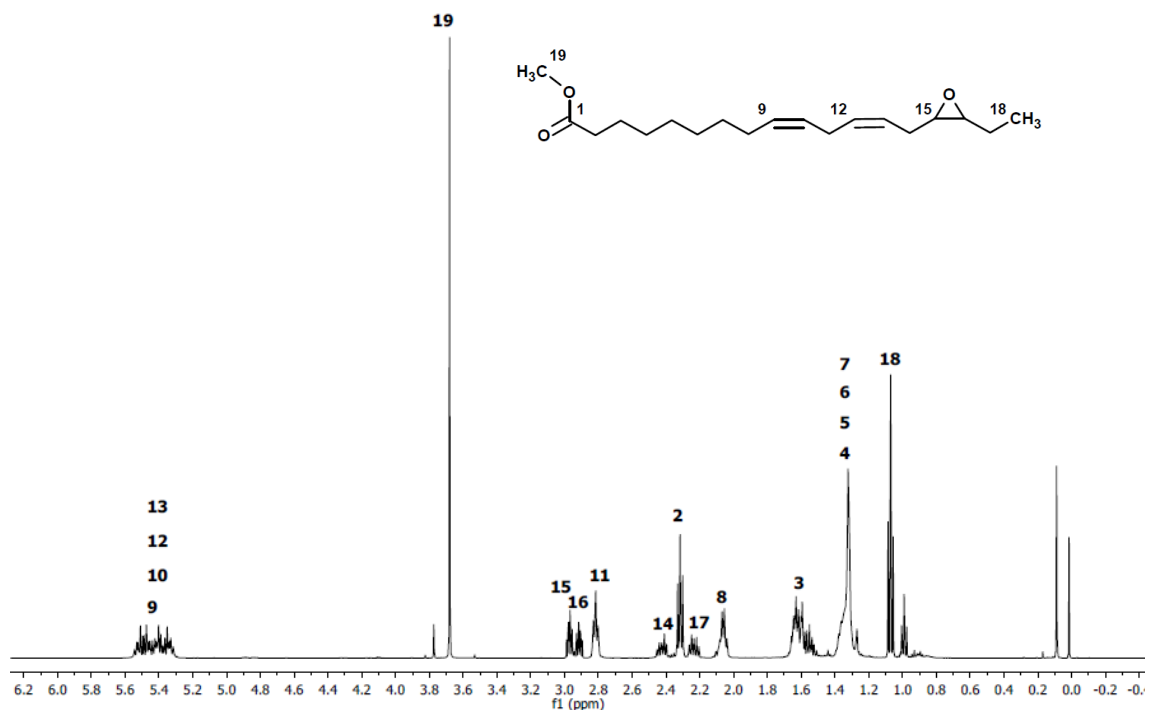


### 7.7.3 Quantifizierung der Oxidation von $\gamma$ -Terpinen in Natriumacetatpuffer und Alkoholen



## 7.8 NMR-Spektren

Abbildung 7.28 <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von  $\alpha$ -Linolensäuremethylester.Abbildung 7.29 <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäuremethylester.

Abbildung 7.30  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von  $\alpha$ -Linolensäuremethylester.Abbildung 7.31  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäuremethylester, Übersicht.

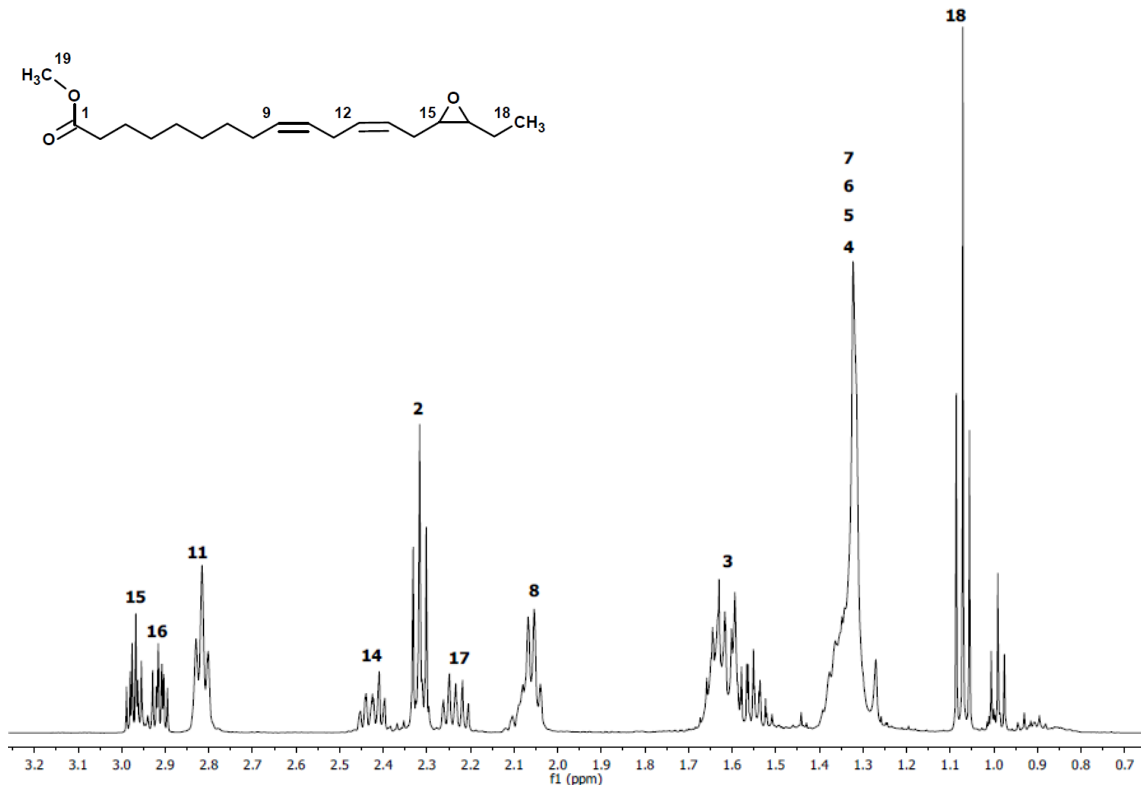


Abbildung 7.32  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäuremethylester, Einzelheiten.

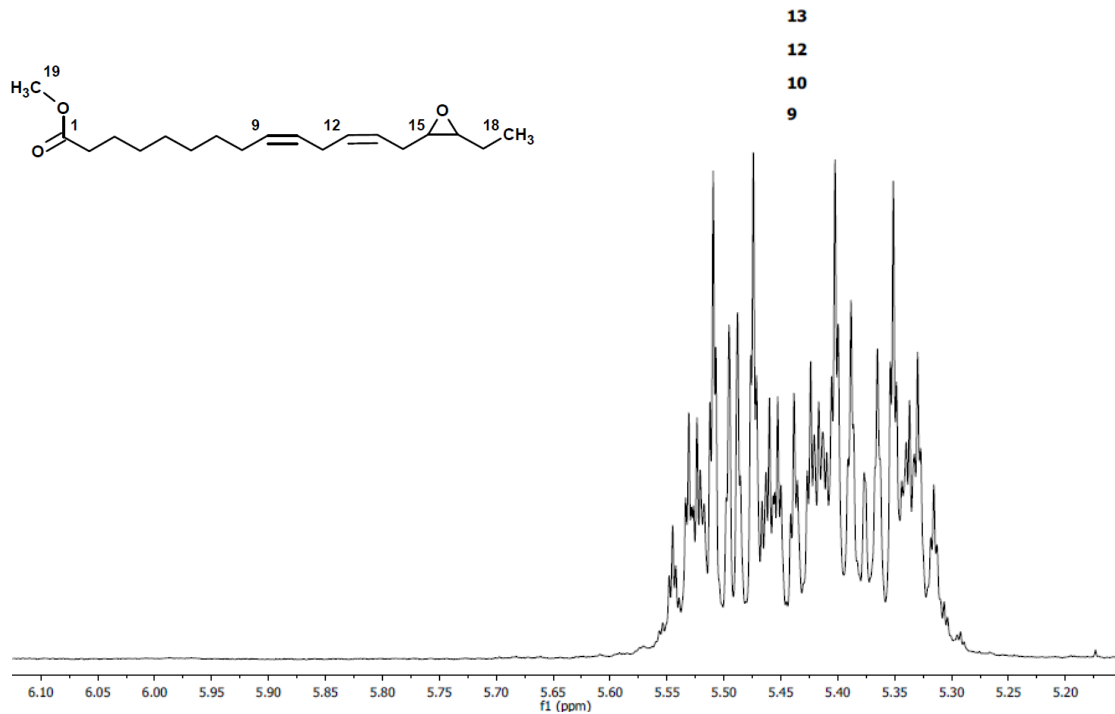
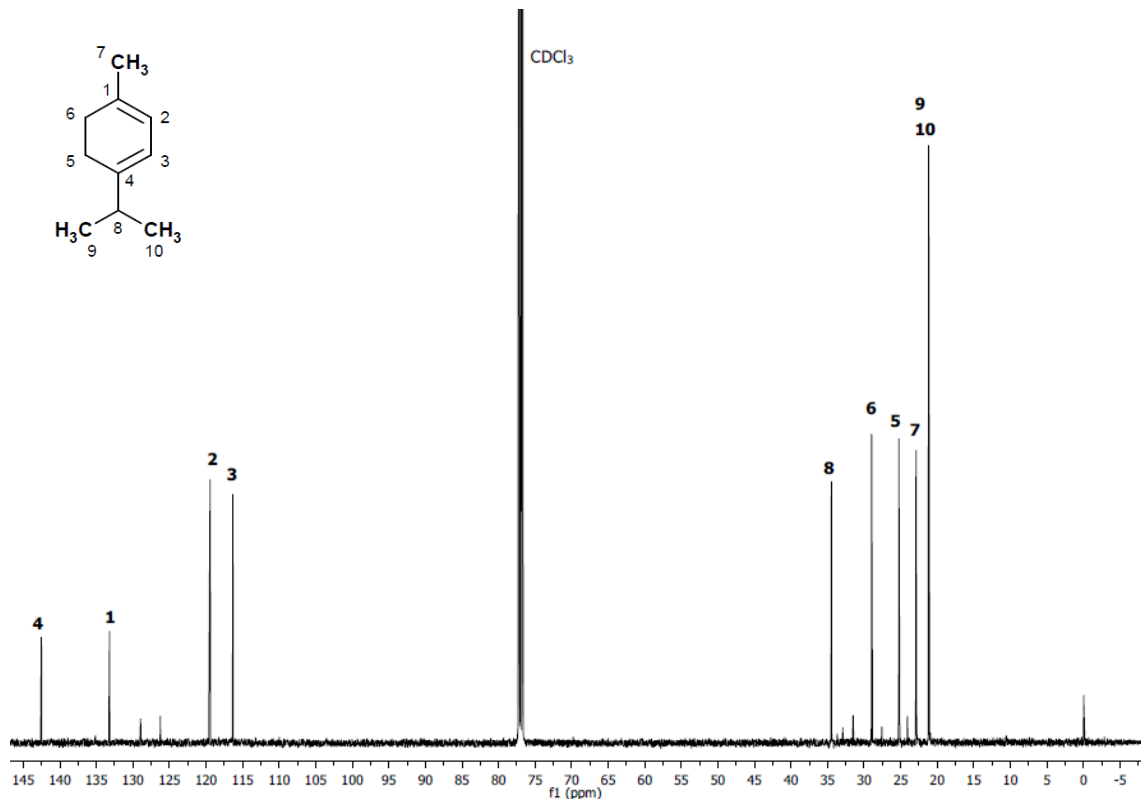
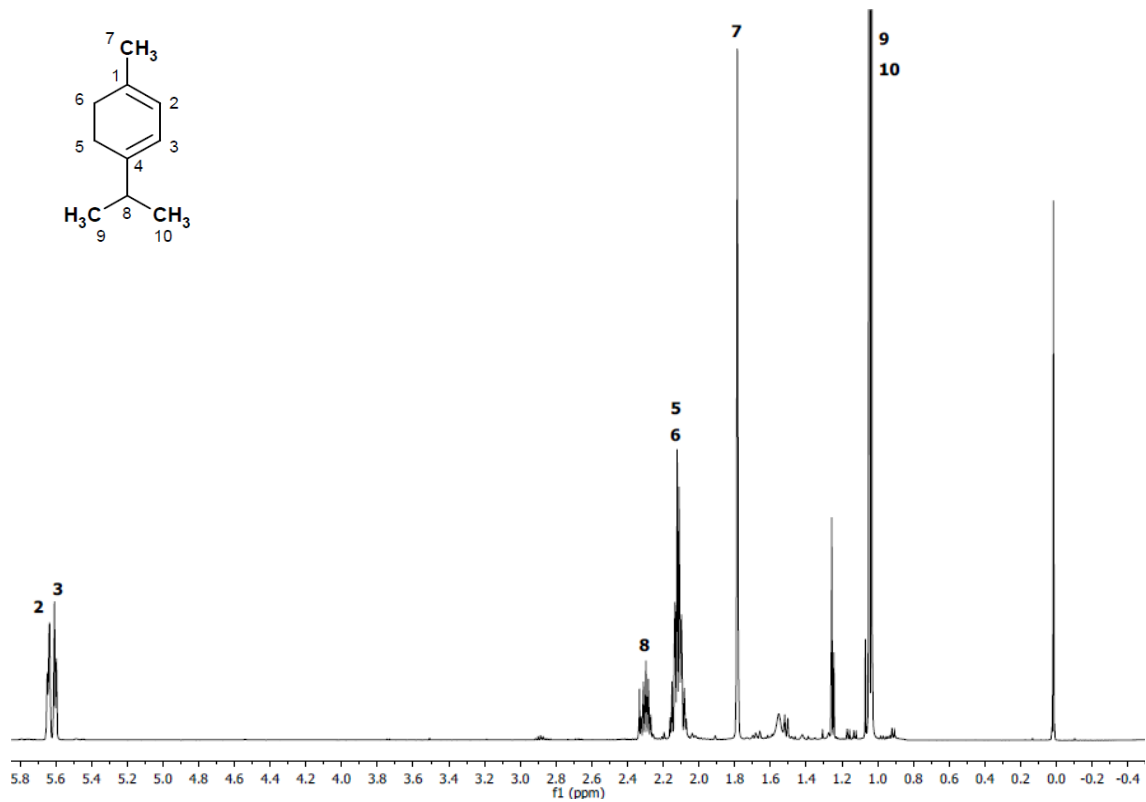


Abbildung 7.33  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 15,16-Epoxy-9-12-octadecadiensäuremethylester, Einzelheiten.

Abbildung 7.34  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $\alpha$ -Terpinen.Abbildung 7.35  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von  $\alpha$ -Terpinen.



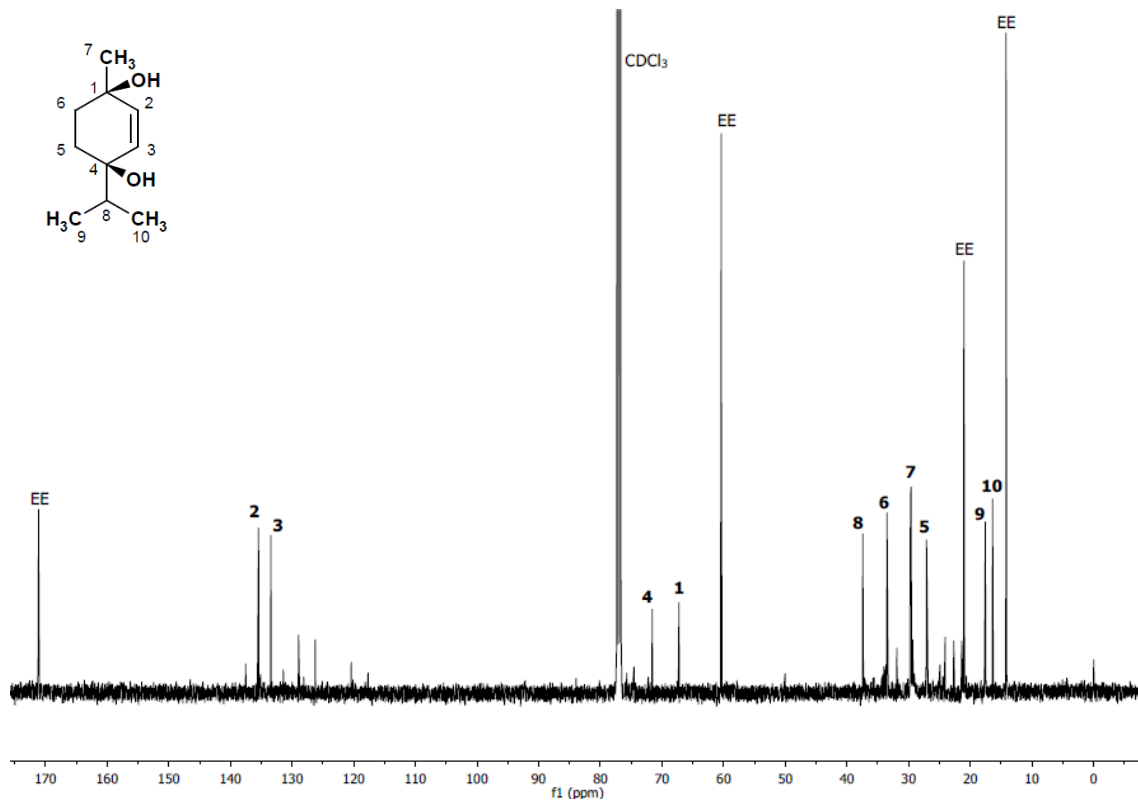


Abbildung 7.36  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von *cis*-1,4-Dihydroxy-p-menth-2-en.

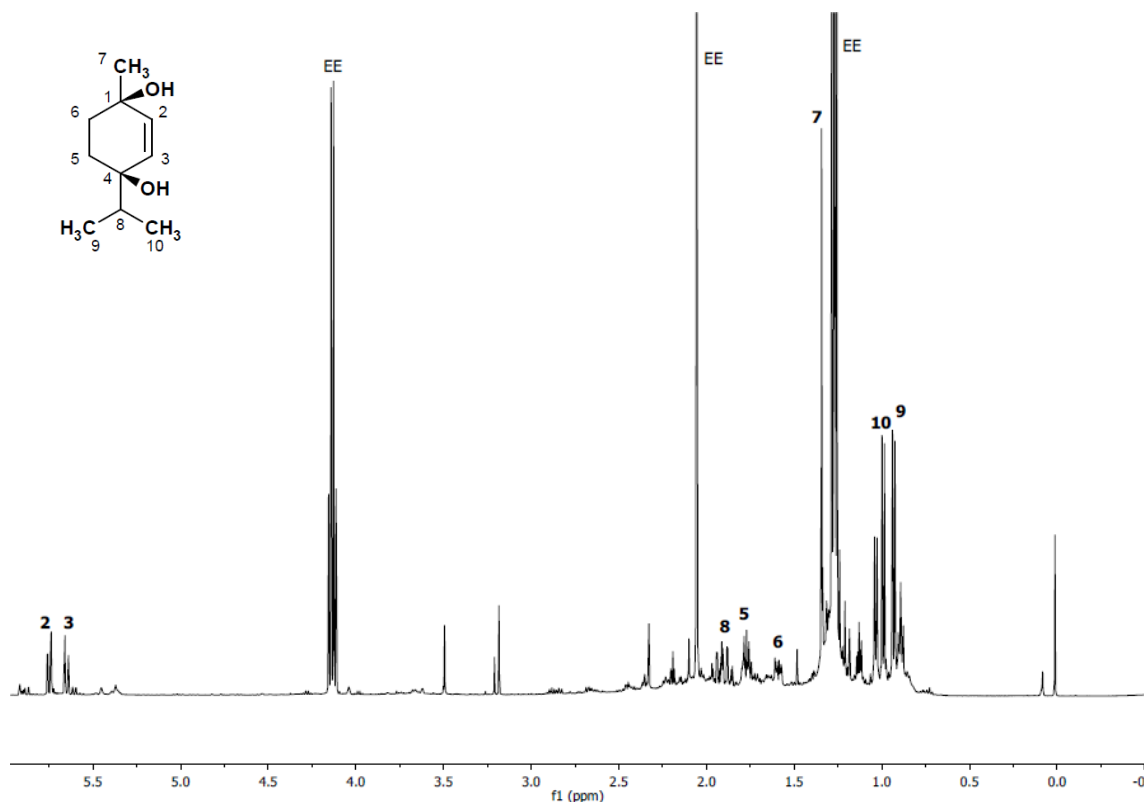


Abbildung 7.37  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von *cis*-1,4-Dihydroxy-p-menth-2-en, Übersicht.

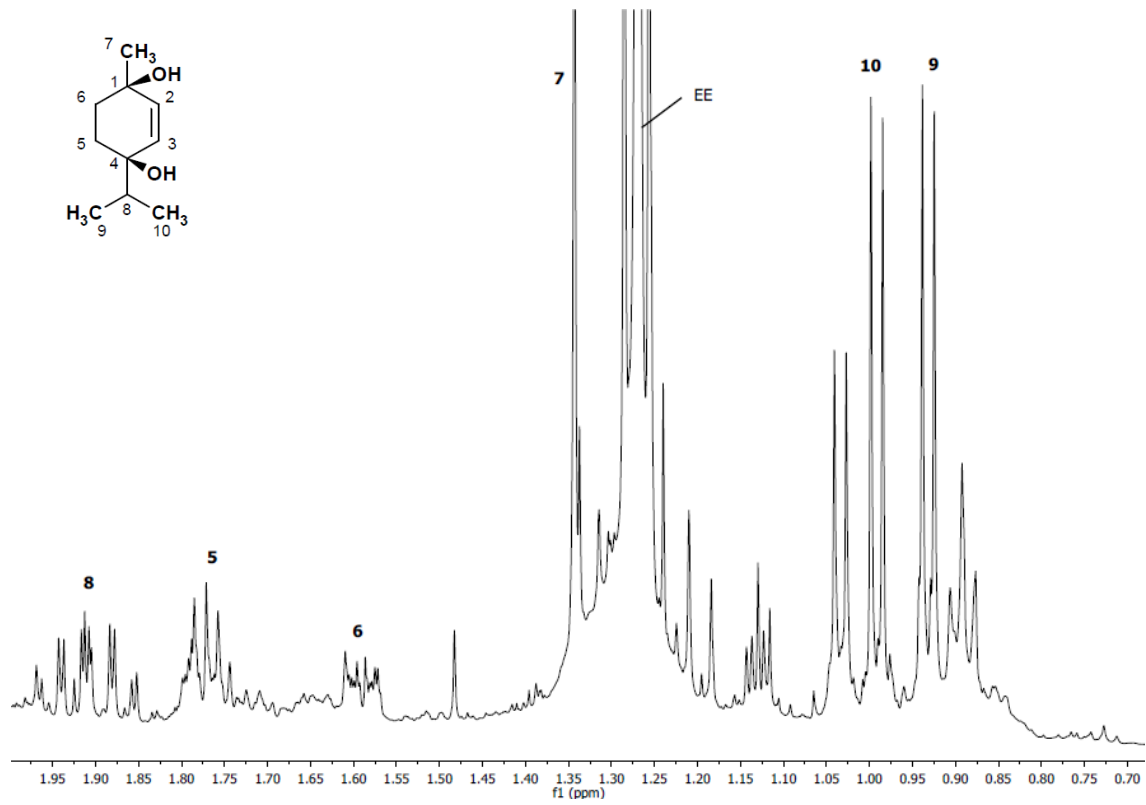


Abbildung 7.38  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *cis*-1,4-Dihydroxy-p-menth-2-en, Einzelheiten.

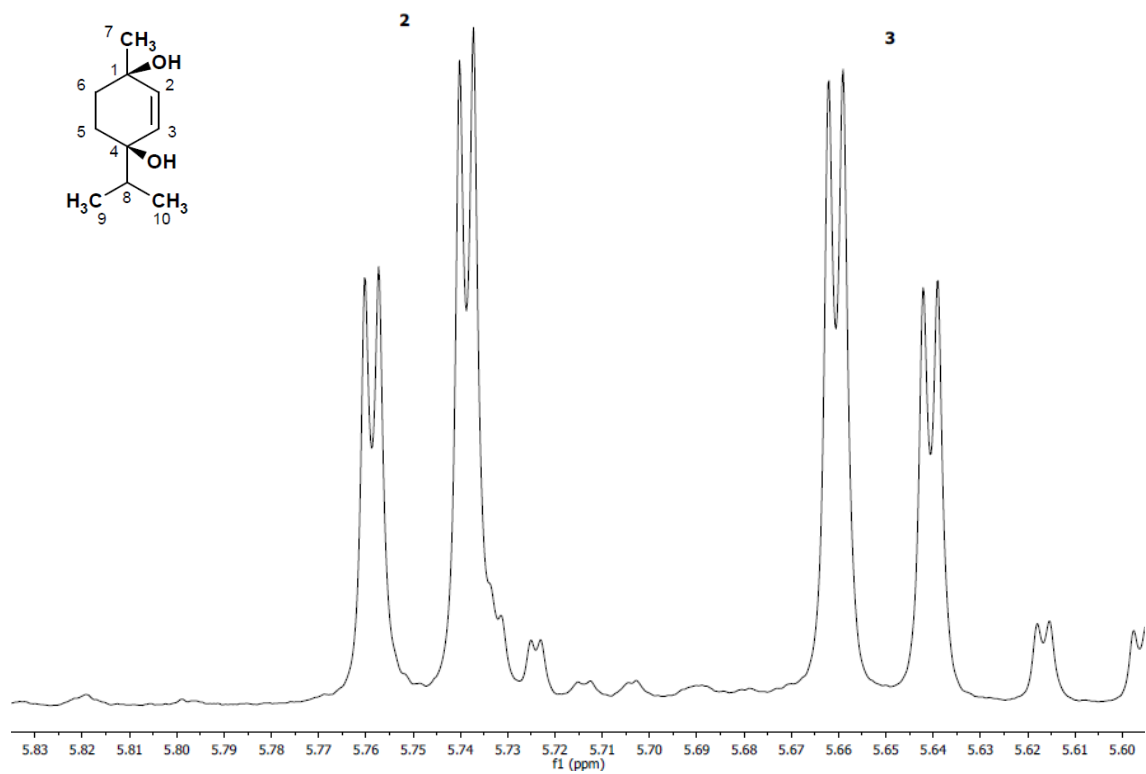
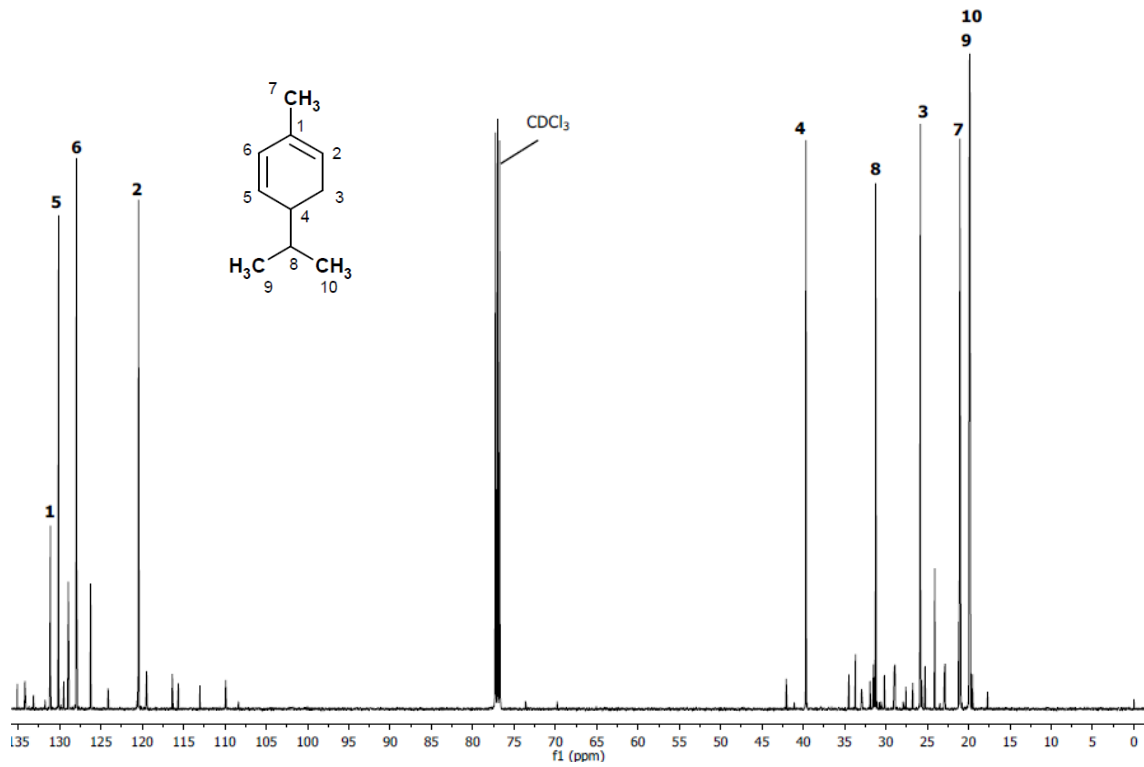
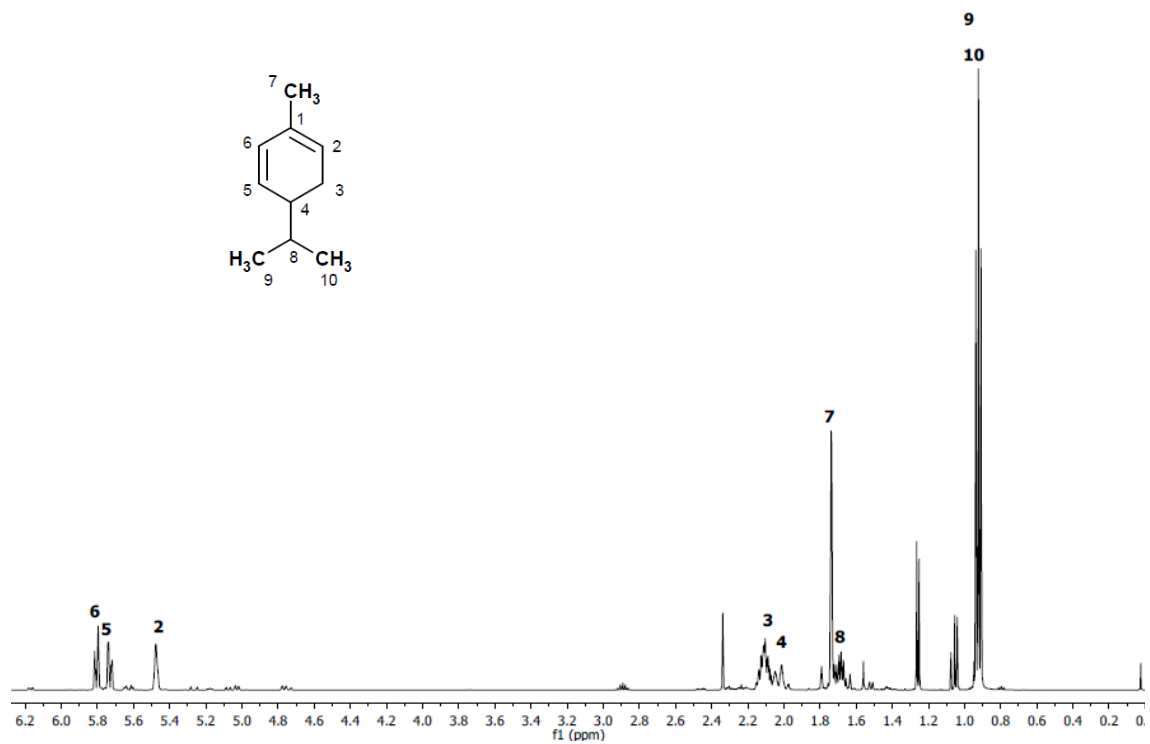


Abbildung 7.39  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *cis*-1,4-Dihydroxy-p-menth-2-en, Einzelheiten.

Abbildung 7.40  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von  $\alpha$ -Phellandren.Abbildung 7.41  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von  $\alpha$ -Phellandren.

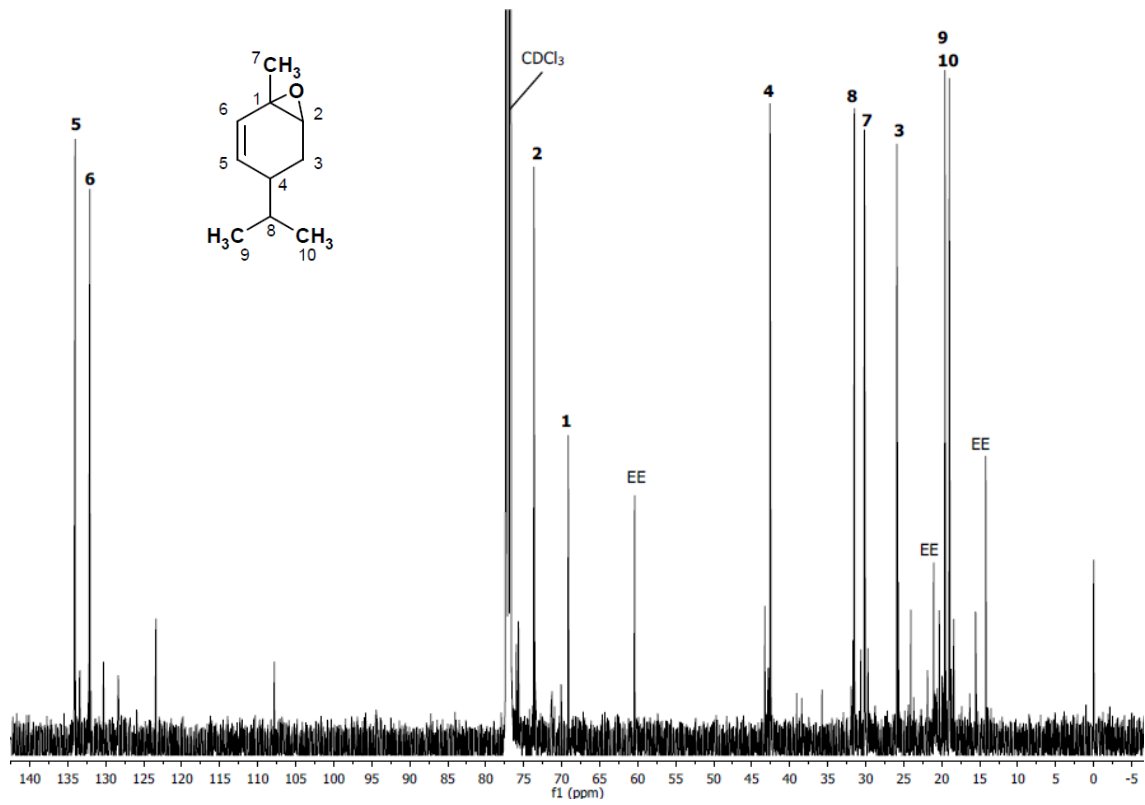


Abbildung 7.42  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en.

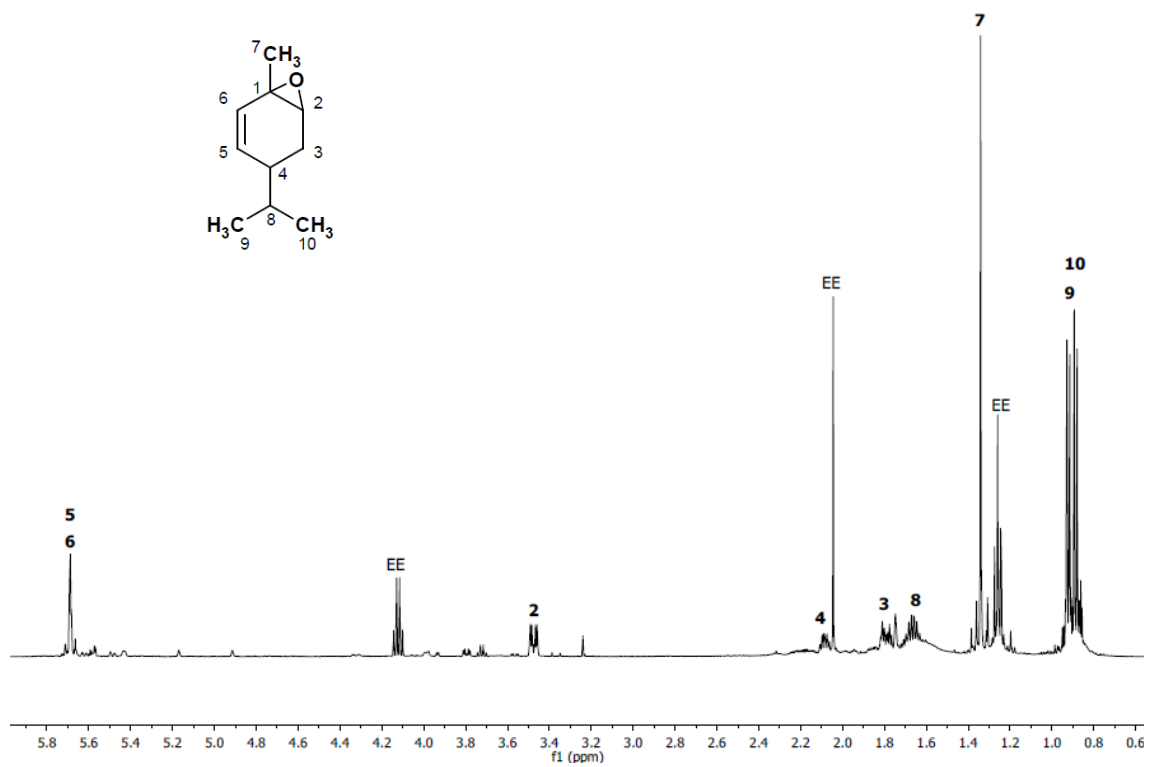


Abbildung 7.43  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en, Übersicht.

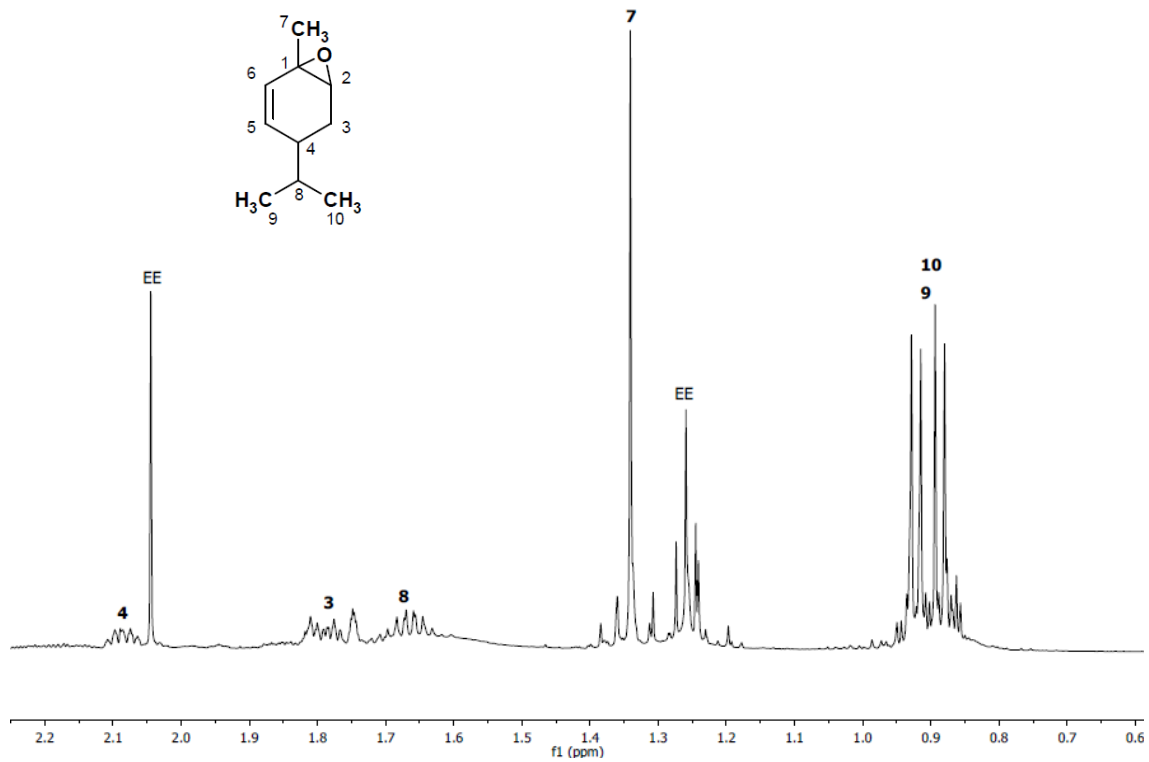


Abbildung 7.44 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en, Einzelheiten.

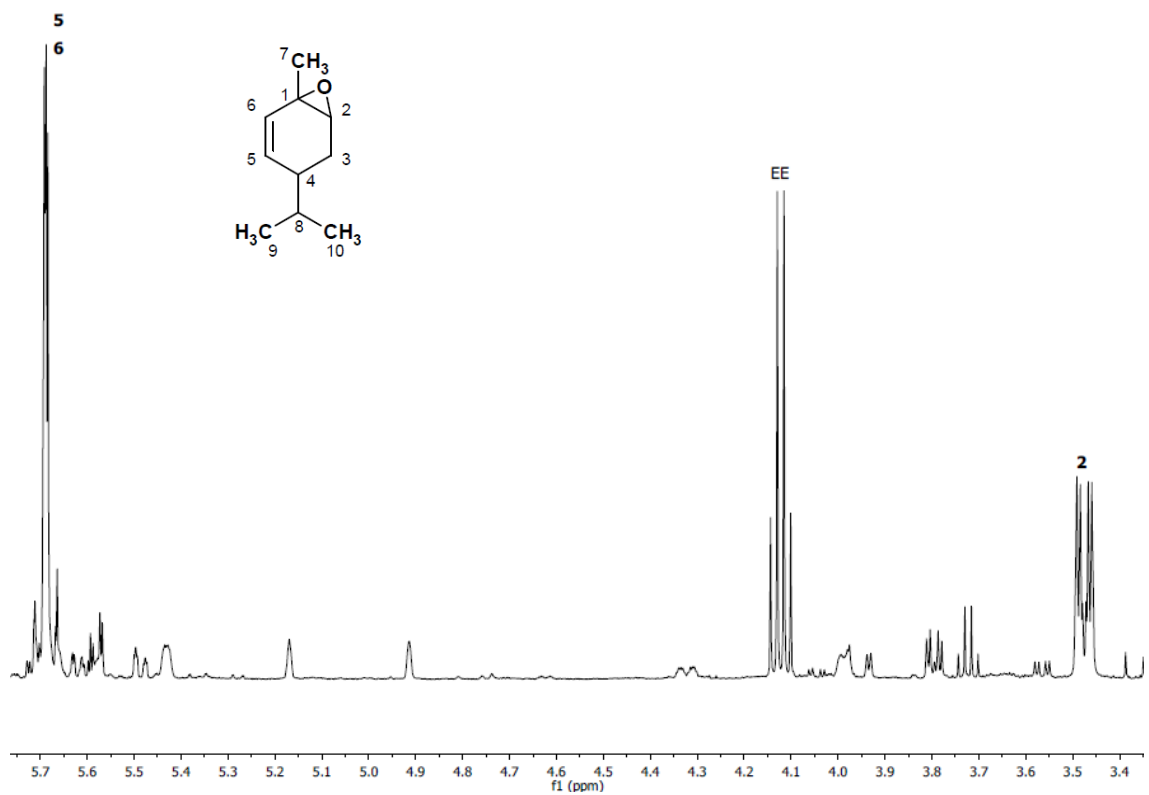


Abbildung 7.45 <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 1,2-Epoxy-*p*-menth-5-en, Einzelheiten.

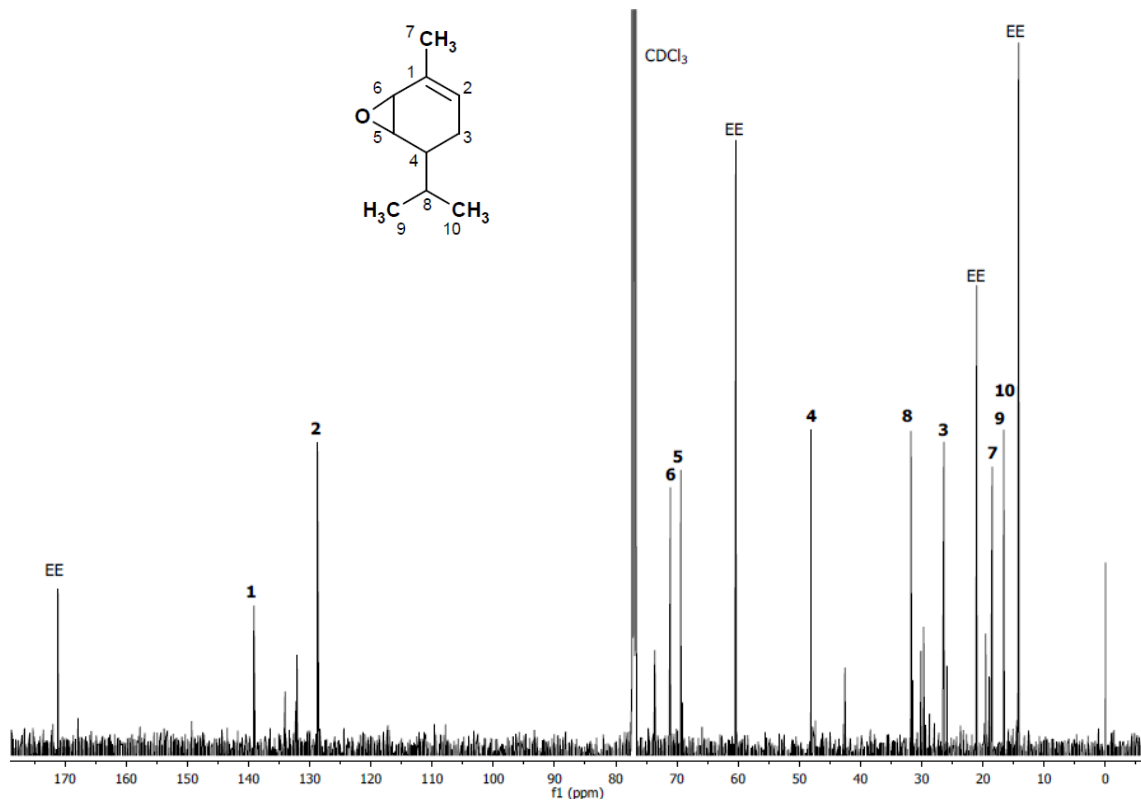


Abbildung 7.46  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en.

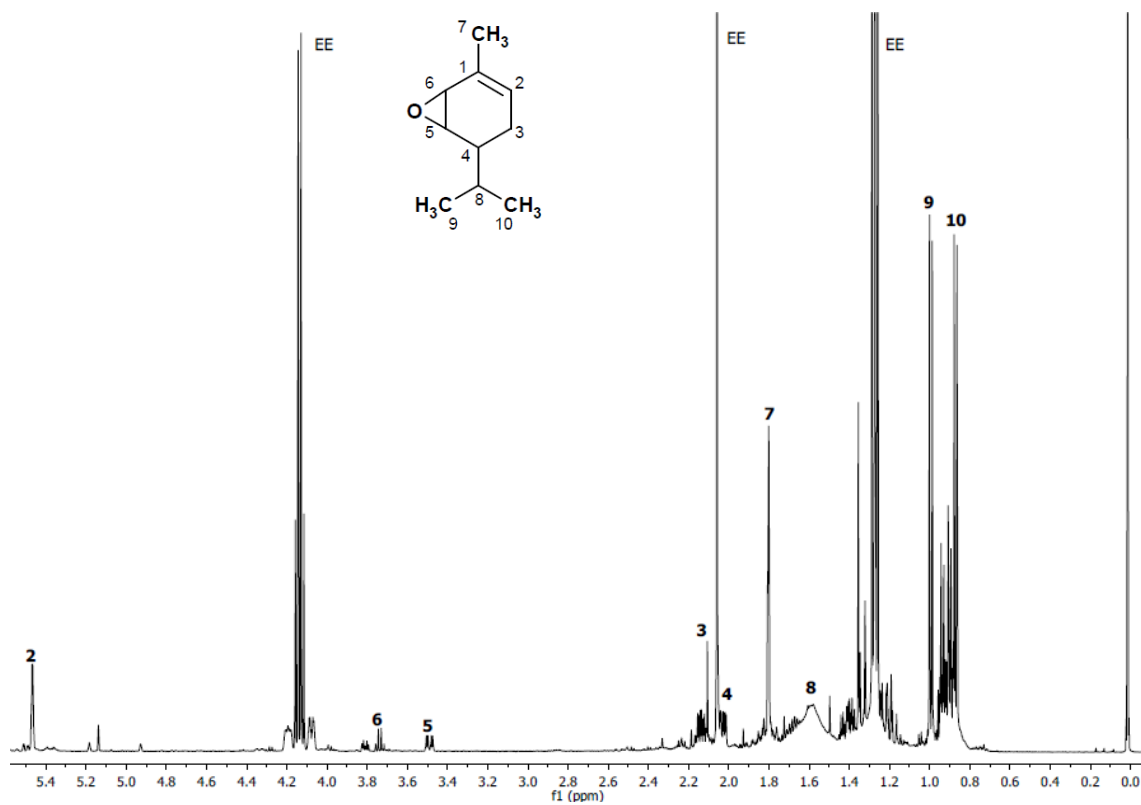


Abbildung 7.47  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en, Übersicht.

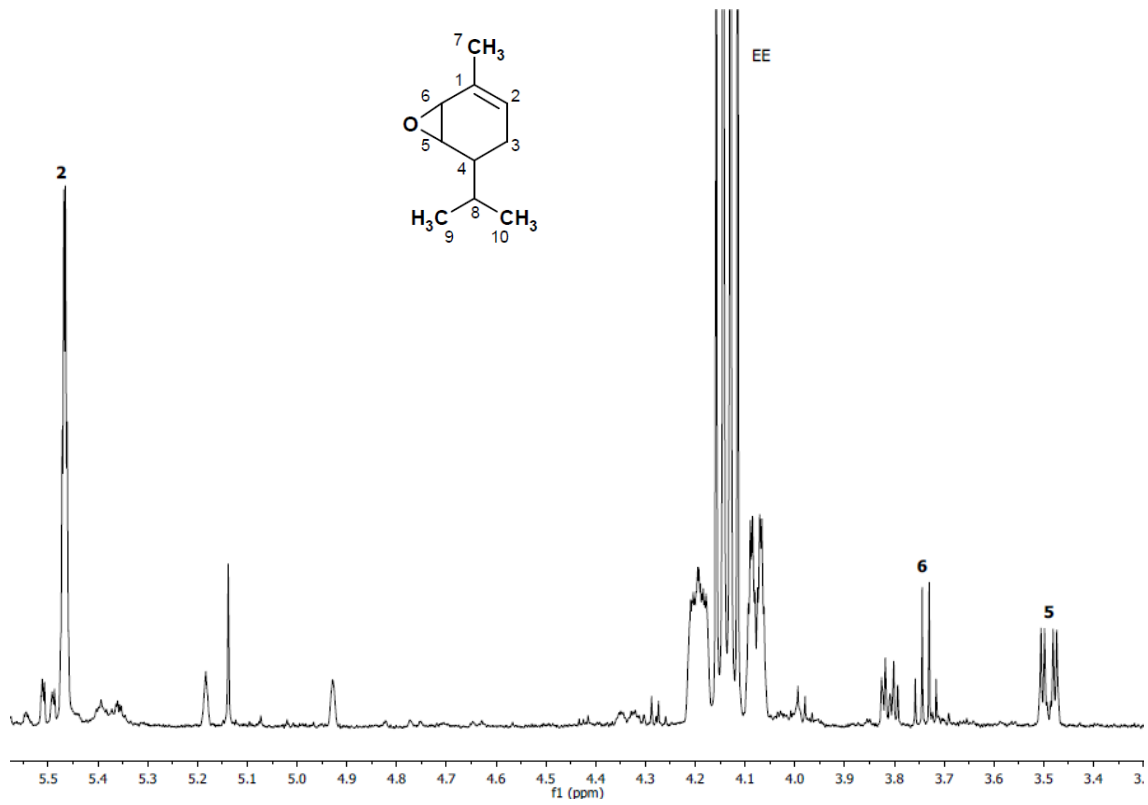


Abbildung 7.48  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en, Einzelheiten.

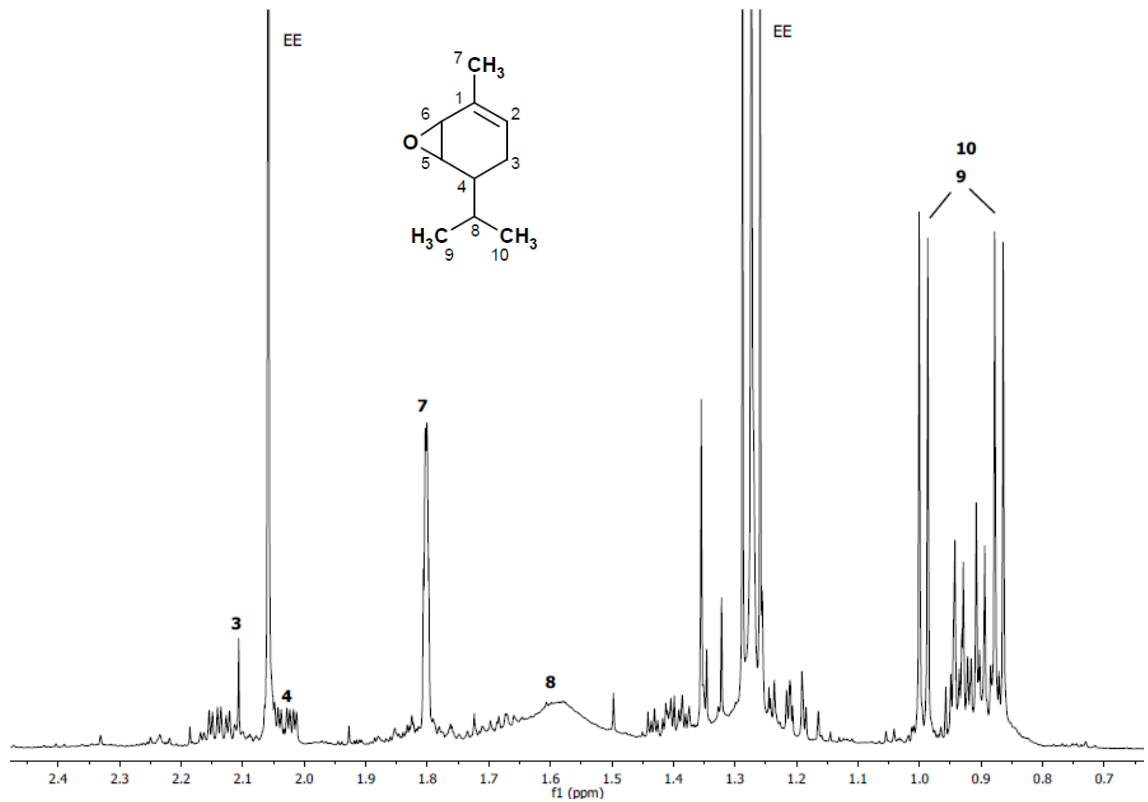


Abbildung 7.49  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 5,6-Epoxy-*p*-menth-1-en, Einzelheiten.