
Abbau von ligninhaltigen Substraten durch
Basidiomyceten – Bilanzierung des Abbaus und
Identifizierung von niedermolekularen, phenolischen
Abbauprodukten

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemiker

Carsten Weiß

geboren am 24.08.1970 in Lampertheim

2003

Referent: Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger

Korreferentin: Prof. Dr.-Ing. Brita Watkinson

Tag der Promotion: 01. Dezember 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis März 2003 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. G. Berger angefertigt.

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. R. G. Berger, möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit, für seine stete Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen Anregungen sowie den Freiraum, den er mir bei der Bearbeitung der Dissertation überließ, herzlich bedanken.

Mein Dank gilt ferner:

allen Kolleginnen und Kollegen am Institut, vor allem meinem Labornachbarn, Herrn Thilo Peters, für das gute und freundschaftliche Verhältnis und die stete Diskussionsbereitschaft;

Herrn Dr. Ulrich Krings für die anregenden Diskussionen zu den Themen Ligninabbau und Massenspektroskopie sowie die konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit;

Herrn Dr. Gerald Dräger vom organisch-chemischen Institut der Universität Hannover für die Durchführung der hochauflösenden HPLC-MS-Messungen.

Besonders möchte ich meinem Vater danken, der mich in jeder Weise immer unterstützt hat und auf dessen Beistand ich immer zählen konnte.

Von ganzem Herzen danke ich meiner geliebten Frau Flávia für ihren Optimismus in nicht immer einfachen Phasen in dieser Zeit. Ihre konstruktive Kritik und ihre Geduld beim Schreiben dieser Arbeit haben wesentlich zum Gelingen beigetragen.

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Weißfäulepilze aus der Klasse der Basidiomyceten sind in der Lage effizient Lignin abzubauen. Aus dieser Klasse wurden *Bjerkandera adusta* (BAD), *Lepista irina* (LIR), *Phanerochaete chrysosporium* (PCH) und *Pleurotus sapidus* (PSA) submers in ligninhaltigen Flüssignährmedien (mit Rosmarin-, Zimt-, Sesamschalen und Erdnussschalenpulver) kultiviert. Dabei konnte ein Ligninabbau nachgewiesen werden. Durch Bestimmung der antioxidativen Kapazität (AOC) im Kulturmedium mithilfe von Radikaleinfangtests (ABTS, DPPH) konnte gezeigt werden, dass es im Verlauf der Kultivierung zum Abbau bereits vorhandener und durch den Ligninabbau gebildeter radikaleinfangender Verbindungen kommt. Dabei konnte eine Korrelation zwischen antioxidativer Kapazität (radikaleinfangenden Eigenschaften) und Gesamtphenolgehalt gezeigt werden.

Bei Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* auf vorbehandeltem Erdnussschalenpulver konnte eine begrenzte Akkumulation von niedermolekularen, phenolischen Verbindungen erzielt werden. Die Anwendung unterschiedlicher Kultivierungstechniken (dynamische, statisch-dynamische Kulturführungen sowie Kultivierung mit Zusatz von ethanolischem Erdnussschalenextrakt) zeigte, dass ein enger Mycel-Substrat-Kontakt und die Anwesenheit niedermolekularer, phenolischer Mediatoren für die lignolytische Aktivität der eingesetzten Basidiomyceten wesentlich war.

Neben niedermolekularen Substanzen der eingesetzten Ligninsubstrate konnten transient auftretende Ligninabbauprodukte bei Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* in Gegenwart von Erdnussschalenpulver mittels HPLC-DAD, HPLC-ELSD, GC-FID, GC-MS und hochauflösender HPLC-MS nachgewiesen werden. Als Abbauprodukte wurden Zimtsäure, 3-(4-Hydroxyphenyl)propansäure, Furan-2,5-dicarbonsäure, E- und Z-Trihydroxymimtsäure identifiziert sowie eine Reihe weiterer phenolischer Abbauprodukte detektiert.

In Abhängigkeit der Kultivierungstechnik wurden niedermolekulare Bestandteile der verwendeten Ligninsubstrate (Vanillin, Vanillinsäure, Flavonoide der Erdnussschalen) innerhalb von 24 h vollständig verstoffwechselt. Eine Bilanzierung der temporär gebildeten Abbauprodukte gegenüber der Ligninabbaurate zeigte, dass eine merkliche Akkumulation niedermolekularer Ligninabbauprodukte nicht erfolgte.

Der Zusatz eines ethanolischen Erdnussschalenextraktes zum Kulturmedium von *Pleurotus sapidus* erwies sich als ein Induktor für eine gesteigerte *De-novo*-Bildung von p-Methoxybenzaldehyd, während bei der Kultivierung von *Lepista irina* der Zusatz von ligninhaltigen Substraten die *De-novo*-Synthese von p-Methoxybenzaldehyd induzierte.

Schlagwörter: Laccase, Lignocellulose, Abbau, Erdnussschalen, *Pleurotus sapidus*, *Lepista irina*, phenolische Abbauprodukte

Summary

The white-rot Basidiomycetes are capable to degrade lignin efficiently. *Bjerkandera adusta* (BAD), *Lepista irina* (LIR), *Phanerochaete chrysosporium* (PCH) and *Pleurotus sapidus* (PSA) were cultivated in liquid medium containing lignin (rosemary, cinnamon, sesame hulls and peanut shells, all in powder form). The degradation of lignin as well as the degradation of compounds with radical scavenging activity were determined in the growth medium by the ABTS- and the DPPH-tests.

ABTS-, DPPH-tests and storage stability tests with 'stripped corn oil' in addition to phenolic specific reactions revealed a correlation between antioxidant capacity and total phenolic content in the growth medium.

A limited accumulation of low-molecular phenolic compounds was achieved by the cultivations of *Lepista irina* and *Pleurotus sapidus* with pretreated peanut shells. The application of different cultivation techniques (agitated, static-agitated cultivation and cultivation with an ethanolic extract of peanut shells) showed that a close substrate-mycel-contact and the availability of low-molecular phenolic mediators were essential for lignolytic activities of *Lepista irina* and *Pleurotus sapidus*.

Low-molecular compounds (those contained in the substrates and the temporary products of lignin degradation) were analyzed using HPLC- DAD, HPLC-ELSD, GC-FID, GC-MS and high-resolution HPLC-MS. Cinnamic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-propan acid, furan-2,5-dicarboxylic acid and trihydroxy-cinnamic acid were identified, and a number of different phenolic compounds were detected as degradation products.

Depending on the cultivation technique low-molecular compounds including vanillin, vanillic acid and flavonoids of the peanut shells were degraded completely within 24 hours of cultivation. A balance of the degradation products at the end of cultivation versus the lignin degradation led to the conclusion that an observable accumulation of low-molecular degradation products did not occur. Supplementation of *Pleurotus sapidus* growth medium with ethanolic extract of peanut shells led to an increased *de novo* formation of p-anisaldehyde. During the cultivation of *Lepista irina* with peanut shells and peanut shell extracts the *de novo* formation of p-anisaldehyde was detected.

Keywords: laccase, lignocellulose degradation, peanut shells, *Pleurotus sapidus*, *Lepista irina*, phenolic degradation products

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XVI
Begriffsdefinitionen	XVIII
1 Einleitung und Problemstellung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Problemstellung und Zielsetzung	3
2 Ergebnisse	5
2.1 Auswahl von Basidiomyceten, ligninhaltigen Substraten und Testsystemen auf antioxidative Kapazität (AOC)	5
2.1.1 Auswahl der Basidiomyceten	5
2.1.2 Auswahl der ligninhaltigen Substrate	6
2.1.3 Testsysteme für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität	6
2.1.4 Vorbehandlung und antioxidative Eigenschaften (AOC) der verwendeten ligninhaltigen Substrate	7
2.2 Antioxidative Kapazität (AOC) in Extrakten aus dem Abbau ligninhaltiger Substrate durch Basidiomyceten	8
2.2.1 Screening Teil 1	8
2.2.1.1 Kultivierung mit extrahiertem Sesamschalenpulver	10
2.2.1.2 Kultivierung mit vorbehandeltem Zimt- und Rosmarinpulver	14
2.2.1.3 Kultivierung mit Erdnussschalenpulver	15
2.2.1.4 Fazit des Screenings, Teil 1	16
2.2.2 Abbau von Erdnussschalen durch <i>Lepista irina</i> und <i>Pleurotus sapidus</i> , Screening Teil 2	17
2.2.2.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität (AOC) von niedermolekularen Verbindungen im Kulturmedium	17

2.2.2.2	Bestimmung der AOC-Werte des Filtrerrückstands im Verlauf der Kultivierung	18
2.2.2.3	Zellfreie Kulturführung mit Rohenzymkonzentraten von <i>Lepista irina</i> und <i>Pleurotus sapidus</i>	19
2.2.2.4	Zusammenfassung und Fazit des Screenings Teil 2	20
2.3	Steigerung der lignolytischen Aktivitäten	21
2.3.1	Induktion und Steigerung lignolytischer Enzymaktivitäten	21
2.3.2	Bestimmung und Steigerung des Ligninabbaus	25
2.3.3	Fazit: Steigerung der lignolytischen Aktivitäten	26
2.4	Abbau niedermolekularer, phenolischer Verbindungen durch <i>Lepista irina</i> und <i>Pleurotus sapidus</i>	27
2.4.1	Identifizierung und Quantifizierung niedermolekularer Inhaltsstoffe in Erdnussschalenpulver	27
2.4.1.1	Identifizierung von monomeren aromatischen Verbindungen	27
2.4.1.2	Identifizierung von Flavonoiden	28
2.4.1.3	Identifizierung von nicht Lignin relevanten monomeren Inhaltsstoffen	31
2.4.1.4	Quantifizierung der identifizierten Inhaltsstoffe in Erdnussschalen	31
2.4.1.5	Bestimmung von Inhaltsstoffen in vorbehandelten Erdnussschalen	33
2.4.2	Bilanzierung der Hauptinhaltsstoffe der Erdnussschalen beim Abbau durch <i>Lepista irina</i> und <i>Pleurotus sapidus</i>	34
2.5	Identifizierung von Abbauprodukten	36
2.5.1	Identifizierung und Quantifizierung von p-Methoxybenzaldehyd in Kulturen von <i>Pleurotus sapidus</i> und <i>Lepista irina</i>	37
2.5.2	Abbauprodukte bei den Kultivierungen von <i>Pleurotus sapidus</i>	38
2.5.3	Abbauprodukte bei den Kultivierungen von <i>Lepista irina</i>	46
2.5.4	Fraktionierung und Identifizierung von Abbauprodukten aus der Kultivierung von <i>Lepista irina</i> mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt	55
2.5.5	Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i> und <i>Lepista irina</i> im Fed-batch-Verfahren auf Erdnussschalen	67
2.5.6	Zusammenfassung	67
3	Diskussion	69
3.1	Akkumulation von niedermolekularen, antioxidativ wirksamen Substanzen beim Abbauprozess	75

3.1.1	Kultivierung mit vorbehandelten Erdnussschalen	76
3.1.2	Kultivierung mit Sesamschalen	77
3.1.3	Kultivierung mit Zimt und Rosmarin	78
3.1.4	ABTS- und DPPH-Test	78
3.1.5	Beeinflussung der Bestimmung der AOC durch Laccase-Aktivität	79
3.2	Beeinflussung und Steigerung der lignolytischen Aktivitäten	81
3.2.1	Lignolytische Enzymaktivitäten	81
3.2.2	Bestimmung des Ligningehaltes und der Ligninabbaurate	84
3.3	Abbau von niedermolekularen Inhaltsstoffen im Erdnussschalpulver durch Basidiomyceten	89
3.3.1	Inhaltsstoffe der Erdnussschalen	89
3.3.2	Abbau der Inhaltsstoffe von Erdnussschalen	93
3.4	Identifizierung von Ligninabbauprodukten und hypothetischer Abbaueweg	95
3.4.1	3,4,5-Trihydroxymzimtsäure	95
3.4.2	Hydroxycumarin und strukturell verwandte Stoffe	98
3.4.3	Weitere interessante Abbauprodukte	101
3.4.4	Bildung von p-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd) bei Kultivierungen von <i>Lepista irina</i> und <i>Pleurotus sapidus</i>	103
3.4.5	Bilanzierung der Abbauprodukte und hypothetischer Abbaueweg	104
3.4.6	Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i> und <i>Lepista irina</i> im Fed-batch-Verfahren auf Erdnussschalen	107
3.5	Zusammenfassung und Ausblick	108
4	Material und Methoden	111
4.1	Mikroorganismen	111
4.2	Chemikalien	112
4.3	Lösungsmittel	115
4.4	Gase	115
4.5	Geräte	115
4.6	Substrate	116
4.6.1	Rosmarinpulver (extrahiert)	116
4.6.2	Sesamschalpulver (extrahiert)	117
4.6.3	Zimtpulver (extrahiert)	117

4.6.4	Erdnussschalenpulver	117
4.6.4.1	Unbehandeltes Erdnussschalenpulver	117
4.6.4.2	Behandeltes Erdnussschalenpulver	118
4.6.4.3	Ethanolische Erdnussschalenextrakte	118
4.7	Mikrobiologie	118
4.7.1	Autoklavieren	118
4.7.2	Kulturmedien	119
4.7.2.1	Standard-Nähr-Agar mit Hefeextrakt	119
4.7.2.2	Standard-Nähr-Agar mit Lignin	119
4.7.2.3	Standard-Nähr-Medium mit Hefeextrakt (SNL-Y)	119
4.7.2.4	Stickstoffarme Nährlösung für experimentelle Kulturen	120
4.7.2.5	Enzymzusatz	121
4.7.3	Kulturführung	121
4.7.3.1	Stammhaltung	121
4.7.3.2	Stammhaltung für experimentelle Kulturen	121
4.7.3.3	Vorkultur	121
4.7.3.4	Experimentelle Kultur	122
4.7.3.5	Dynamisches Kulturverfahren	122
4.7.3.6	Statisch-dynamisches Kulturverfahren	122
4.7.3.7	Statisch-dynamisch Kultivierung mit Zusatz von Enzymen	122
4.7.3.8	Gewinnung eines Exoenzymkonzentrates aus <i>Lepista irina</i> bzw. <i>Pleurotus sapidus</i> für zellfreie Versuche	123
4.7.3.9	Gewinnung eines Enzymrohfiltrates durch Zellaufschluss	123
4.7.3.10	Inkubation von extrahierten Erdnussschalen mit einem Exoenzymfiltrat	124
4.7.3.11	Inkubation von extrahierten Erdnussschalen mit einem Filtrat aus einem Zellaufschluss	124
4.7.3.12	Kultivierung mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt	124
4.7.3.13	Fed-batch-Kultivierung	125
4.8	Probennahme und Produktisolierung	125
4.9	Bestimmung des Ligningehaltes in den Substraten vor und nach der Kultivierung	126
4.9.1	Qualitativer Nachweis und Abschätzung des Ligningehaltes	126
4.9.2	Quantitative Bestimmung des Ligningehaltes	127

4.10	Bestimmung der antioxidativen Kapazität (AOC)	128
4.10.1	Radikaleinfangtest (ABTS- und DPPH-Test)	128
4.10.1.1	ABTS-Test	129
4.10.1.2	DPPH-Test	130
4.10.2	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes	131
4.10.3	Antioxidative Kapazität: Lagerstabilitätstest von 'stripped corn oil'	131
4.11	Weitere Bestimmungen	132
4.11.1	Proteinbestimmung nach Bradford	132
4.11.2	Glucoseoxidase-Aktivität	132
4.11.3	Laccase-Aktivität	133
4.11.4	pH-Wert	134
4.11.5	Glucose-Gehalt	135
4.11.6	Biotrockenmasse	135
4.11.7	Prüfung auf Kontaminationsfreiheit	135
4.12	Chromatographie	135
4.12.1	Probenvorbereitung	135
4.12.1.1	Ethylacetat-Extrakte	135
4.12.1.2	Methanol-Extrakte	135
4.12.1.3	Derivatisierung für die GC	136
4.12.1.4	Probenvorbereitung für die HPLC	136
4.12.2	Säulenchromatographie	136
4.12.3	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	137
4.12.3.1	Analytische HPLC	137
4.12.3.2	Präparative HPLC	138
4.12.3.3	Microbore HPLC	139
4.12.3.4	Hochauflösende HPLC-MS	140
4.12.4	Gaschromatographie (GC)	141
4.12.4.1	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor	141
4.12.4.2	Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor	141
4.13	Entsorgungshinweise	142
4.13.1	Biologisches Material	142
4.13.2	Lösemittel und Chemikalien	142
5	Literatur	143

6	Anhang	153
6.1	Übersicht: Bestimmung der AOC und HPLC/GC-Probenaufbereitung	153
6.2	Analytische HPLC - Peakauflistung	154
6.3	Präparative HPLC	155
6.3.1	Fraktionierungsprotokoll BW Erdnussschalen	155
6.3.2	Fraktionierungsprotokoll <i>Pleurotus sapidus</i> mit Erdnussschalen	157
6.3.3	Fraktionierungsprotokoll <i>Lepista irina</i> mit Erdnussschalen	158
6.3.4	Fraktionierungsprotokoll <i>Lepista irina</i> + Erdnussschalenextrakt	159
6.4	Abbauraten der Hauptinhaltsstoffe in Erdnussschalen	159
6.4.1	Dynamische Kultivierung von PSA mit Erdnussschalenpulver	159
6.4.2	Statisch-dynamische Kultivierung von <i>Pleurotus sapidos</i> mit Erdnussschalenpulver	160
6.5	Abbauprodukte: GC-Massenspektren (TMS-Derivate)	161
6.6	Fed-batch-Verfahren <i>Pleurotus sapidus</i> plus Erdnussschalen	165

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: AOC (ABTS-Test) im Kulturmedium: Kultivierung von PCH mit Sesamschalpulver (1: ABTS BW PCH)	11
Abbildung 2-2: AOC (ABTS- und DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von PCH mit Sesamschalpulver (1: ABTS BW Sesamschalpulver, 2: DPPH BW Sesamschalpulver, 3: ABTS BW PCH und 4: DPPH BW PCH)	11
Abbildung 2-3: AOC (ABTS- und DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von PSA bei Zusatz von Sesamschalpulver	12
Abbildung 2-4: Gesamtpolyphenolgehalt im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von PSA bei Zusatz von Sesamschalpulver	13
Abbildung 2-5: Lagerstabilität von 'stripped corn oil' mit Ethylacetatextrakt-Zusätzen aus einer Kultivierung von PSA mit Sesamschalpulver	14
Abbildung 2-6: zeitlicher Verlauf der AOC (DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt der Kulturmedien von PCH und BAD mit Zimtpulver	15
Abbildung 2-7: Verlauf der AOC (ABTS- und DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt: Kultivierung von LIR mit Erdnussschalpulver (1: BW Erdnussschalen im ABTS-Test, 2: BW Erdnussschalen im DPPH-Test, 3: BW LIR im ABTS-Test, 4: BW LIR im DPPH-Test)	16
Abbildung 2-8: AOC (ABTS-Test) im UF-Permeat des wässrigen Kulturmediums: Kultivierung von LIR mit Erdnussschalpulver (1: ABTS-Test BW Erdnussschalpulver und 2: BW LIR)	18
Abbildung 2-9: AOC (ABTS- und DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt des Filtrerrückstandes: Kultivierung von LIR mit Erdnussschalpulver (1: DPPH-Test BW Erdnussschalpulver, 2: ABTS-Test BW Erdnussschalpulver, 3: DPPH-Test BW LIR und 4: ABTS-Test BW LIR)	19
Abbildung 2-10: Enzymaktivität (Lac und GOD) und Exoproteingehalt im Kulturmedium: dynamische Kultivierung von PSA mit Erdnussschalpulver	24
Abbildung 2-11: Laccase-Aktivität und Exoproteingehalt im Kulturmedium: dynamische Kultivierung von LIR mit Erdnussschalpulver	24
Abbildung 2-12: Enzymaktivitäten (GOD und Lac): statisch-dynamische Kultivierung von PSA mit Erdnussschalpulver	25
Abbildung 2-13: UV-Spektrum von 5,7-Dihydroxychromen-4-on, mit den UV-Maxima mit λ_{\max} 251 nm und 296 nm	29

Abbildung 2-14: GC-Massenspektrum von 5,7-Dihydroxychromen-4-on-TMS nach Derivatisierung mit BSTFA	30
Abbildung 2-15: GC-Massenspektrum von 5,7-Dihydroxychromen-4-on nach Acetylierung mit Essigsäureanhydrid	30
Abbildung 2-16: HPLC-Chromatogramm BW Erdnussschalenpulver, mit 1: unbekannte Verbindung, 7: Vanillinsäure, 10: Vanillin, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 20: Eriodictyol und 22: Luteolin	33
Abbildung 2-17: GC-Massenspektrum eines Ligninabbauproduktes (TMS-Derivat): dynamische Kultivierung von PSA mit Erdnussschalenpulver (unbehandelt)	38
Abbildung 2-18: UV-Spektrum von Trihydroxyzimtsäure, UV-Maximum mit λ_{\max} bei 291 nm	40
Abbildung 2-19: GC-Massenspektrum von Zimtsäure-TMS, Kováts Index 1547, Fraktion B	40
Abbildung 2-20: GC-Massenspektrum eines Ligninabbauproduktes (TMS-Derivat), Kováts Index 1425, Fraktion B	41
Abbildung 2-21: GC-Massenspektrum eines Ligninabbauproduktes (TMS-Derivat), Fraktion D	41
Abbildung 2-22: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von PSA mit vorbehandelten Erdnussschalen (28. Kulturtag), mit: 16: Ligninabbauprodukt, 17:p-Methoxybenzaldehyd	42
Abbildung 2-23: UV-Spektrum (HPLC-DAD) Peak Nummer 16 bei 22,35 min mit λ_{\max} bei 279 nm, 28. Kulturtag	43
Abbildung 2-24: HPLC-Chromatogramm BW Erdnussschalenextrakt, mit 1: unbekannte Verbindung, 7: Vanillinsäure, 10: Vanillin, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 20: Eriodictyol und 22: Luteolin	45
Abbildung 2-25: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von PSA mit Erdnussschalenextrakt (24 h nach der Extraktzugabe), mit 1: unbekannte Verbindung, 9: Trihydroxyzimtsäure, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 16: Ligninabbauprodukt, 17: p-Methoxybenzaldehyd	45
Abbildung 2-26: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von PSA mit Erdnussschalenextrakt (7. Kulturtag nach der Extraktzugabe), mit 16: Ligninabbauprodukt und 17: p-Methoxybenzaldehyd	46
Abbildung 2-27: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von LIR mit Erdnussschalenpulver (17. Kulturtag), mit 2 bis 6 und 16:	

Ligninabbauprodukte, 10: Vanillin, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 17: p-Methoxybenzaldehyd und 22: Luteolin	47
Abbildung 2-28: HPLC-Chromatogramm (280 nm) der Fraktion A (Peak Nummer 3) vom 17. Kulturtag	49
Abbildung 2-29: UV-Spektrum Peak Nummer 3 mit λ_{\max} bei 271 nm	49
Abbildung 2-30: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von LIR + vorbehandeltem Erdnussschalpulver mit Enzymzusatz (19. Kulturtag), mit 3 und 16: Ligninabbauprodukte, 17: p-Methoxybenzaldehyd und 22: Luteolin	51
Abbildung 2-31: HPLC-Chromatogramm von BW Erdnussschalenextrakt, mit 1: unbekannte Verbindung, 7: Vanillinsäure, 10: Vanillin, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 20: Eriodictyol und 22: Luteolin	52
Abbildung 2-32: HPLC-Chromatogramm von LIR mit Erdnussschalenextrakt 24 h nach der Extraktzugabe, mit 1: unbekannte Verbindung, 8, 12, 16: Ligninabbauprodukte, 9: Z- und 11: E-Trihydroxyzimtsäure	53
Abbildung 2-33: HPLC-Chromatogramm von LIR mit Erdnussschalenextrakt am 6. Kulturtag nach der Extraktzugabe, mit 8, 12, 14, 15, 19, 21 und 23: Ligninabbauprodukte, 9: Z- und 11: E-Trihydroxyzimtsäure	53
Abbildung 2-34: HPLC-Chromatogramm von LIR mit Erdnussschalenextrakt am 11. Kulturtag nach der Extraktzugabe, mit 2, 3, 19 und 21: Ligninabbauprodukte, 17: p-Methoxybenzaldehyd	54
Abbildung 2-35: Trihydroxyzimtsäure-Abnahme: LIR mit Erdnussschalenextrakt	55
Abbildung 2-36: HPLC-Chromatogramm (280 nm): präparative HPLC der vereinten Proben LIR mit Erdnussschalenextrakt mit den Fraktionen A bis F	56
Abbildung 2-37: HPLC-Chromatogramme von Fraktion B: links bei 280 nm, rechts mit ELSD	56
Abbildung 2-38: HPLC-MS (TOF) Chromatogramm im negativen Ionisierungsmodus mit Massenspuren, von oben nach unten: 319 u, 315 u, 161 u, 195 u und TIC (total ion count), R_t in min	57
Abbildung 2-39: MS-Spektrum (GC-MS) von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure-TMS, Kováts-Index 1766	59
Abbildung 2-40: MS-Spektrum (GC-MS) von Trihydroxyzimtsäure-TMS, Kováts-Index 2118	60
Abbildung 2-41: Massenspektrum GC-MS eines Ligninabbauproduktes (TMS-Derivat), Kováts-Index 1828	61
Abbildung 2-42: Massenspektrum (GC-MS) eines Ligninabbauproduktes in der Fraktion E (TMS-Derivat), Kováts-Index 2039	64

Abbildung 2-43: Massenspektrum (GC-MS) eines Ligninabbauproduktes in der Fraktion E (TMS-Derivat), Kováts-Index 2112	65
Abbildung 3-1: Ligningrundbausteine	69
Abbildung 3-2: Biosynthese von Lignin, Stilbenen und Flavonoiden	71
Abbildung 3-3: Ausschnitt aus Fichtenholzlignin nach Adler	71
Abbildung 3-4: Nicht-phenolische β -O-4 Ligninmodellverbindung	73
Abbildung 3-5: Sesamol	77
Abbildung 3-6: Rosmarinsäure	78
Abbildung 3-7: Bildung des ABTS-Kationradikals (unten) aus ABTS (oben) durch Laccase	81
Abbildung 3-8: Reaktionsmechanismus für den mikrobiellen Ligninabbau durch Manganperoxidase	84
Abbildung 3-9: Übersicht der Bindungsarten und dimeren Ligninstrukturen	88
Abbildung 3-10: Coniferyl- und Syringylligninbindungstyp	89
Abbildung 3-11: Luteolin	90
Abbildung 3-12: Eriodictyol	91
Abbildung 3-13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on	91
Abbildung 3-14: Vanillin und Vanillinsäure	92
Abbildung 3-15: HMF	92
Abbildung 3-16: Oxidation von Vanillin zu Vanillinsäure	93
Abbildung 3-17: Postulierter Bildungsweg von 2,5-Furandicarbonsäure	94
Abbildung 3-18: E-3,4,5-Trihydroxyzimtsäure	95
Abbildung 3-19: Metabolismus von Ferulasäure mit einem Exoenzymrohextrakt von <i>Lentinus edodes</i>	97
Abbildung 3-20: 7-Hydroxycumarin	99
Abbildung 3-21: Hydroxychromenderivate	100
Abbildung 3-22: Benzofuranderivate	100
Abbildung 3-23: Phenylcumaran- β -5-Einheit	100
Abbildung 3-24: Massenspektrum, interpretiert als Hydroxyfurancarbaldehyd-TMS- Derivat	101
Abbildung 3-25: Strukturformel von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	101
Abbildung 3-26: Strukturformel von E-Zimtsäure	102
Abbildung 3-27: Reaktionsmechanismus von Arylalkoholoxidase (AAO) mit Aryl- Alkoholen mit: Benzylalkohol / Benzaldehyd $R_1=R_2=R_3=H$; Anisalkohol / Anisaldehyd $R_1=R_3=H, R_2=OCH_3$ und Veratrylalkohol / Veratrylaldehyd $R_1=R_2=OCH_3, R_3=H$	104

Abbildung 3-28: Hypothetischer Abbauweg von Lignocellulose durch die Enzyme der Weißfäulepilze	106
Abbildung 3-29: Interaktion der Pilzhyphenenzyme (VAO) mit Mediatoren und gebildeten Radikalen während der Transformation von Lignocellulose	107
Abbildung 4-1: Phloroglucin/HCl-Färbung von Ligninbestandteilen	126
Abbildung 4-2: Reaktionsschema ABTS ^{•+} mit einem Antioxidans AH	130
Abbildung 4-3: DPPH [•] -Radikal	131
Abbildung 4-4: Reaktionsgleichung GOD-Aktivitätstest	133
Abbildung 4-5: Reaktion ABTS (farblos) zu ABTS ^{•+} (grünblau)	134
Abbildung 6-1: Darstellung der Vorgehensweise bei der Bestimmung der AOC, Teil 1 und 2 des Screenings	153
Abbildung 6-2: Probennahmeplan der Kultivierungen von LIR und PSA mit Erdnussschalen	153
Abbildung 6-3: HPLC-Chromatogramm (präparativ): Gesamtethylacetatextrakt von BW Erdnussschalenpulver	155
Abbildung 6-4: HPLC-Chromatogramm BW Erdnussschalen Fraktion E, mit E-P1: Eriodictyol und E-P2: Luteolin	156
Abbildung 6-5: HPLC-Chromatogramm BW Erdnussschalen Fraktion D, mit D-P1: 5,7-Dihydroxychromen-4-on	157
Abbildung 6-6: HPLC-Chromatogramm (präparativ) Gesamtethylacetatextrakt LIR mit Erdnussschalen (17. Kulturtag)	158
Abbildung 6-7: GC-Massenspektrum von 2,5-Furandicarbonsäure, Kováts-Index 1651	161
Abbildung 6-8: LIR mit Erdnussschalen Fraktion C, Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 1439	161
Abbildung 6-9: LIR mit Erdnussschalen Fraktion D, Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 1295	162
Abbildung 6-10: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion B, Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 2014	162
Abbildung 6-11: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion B: Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 1440	163
Abbildung 6-12: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion B: Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 1635	163
Abbildung 6-13: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion B, Ligninabbauprodukt, der Molpeak ist nicht erkennbar	164
Abbildung 6-14: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion E, Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 2140	164

-
- Abbildung 6-15: HPLC-Chromatogramm (280 nm) einer Fed-batch-Kultivierung von
PSA (1. Zyklus), 9: Trihydroxymzimtsäure, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-
on und 17: p-Methoxybenzaldehyd 165
- Abbildung 6-16: HPLC-Chromatogramm (280 nm) einer Fed-batch-Kultivierung von
PSA (2. Zyklus), mit: 1: p-Methoxybenzaldehyd 165

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Auswahl ligninabbauender Basidiomyceten	5
Tabelle 2-2: Antioxidative Eigenschaften (AOC, TEAC-Werte) der verwendeten Substrate, AOC-Angaben in $\mu\text{g}\cdot\text{Trolox g}^{-1}$	7
Tabelle 2-3: Darstellung der Kulturparameter Ligninabbau und pH-Wert sowie der AOC-Bilanz im Verlauf der Kultivierung der verschiedenen Basidiomyceten mit den unterschiedlichen Substraten	10
Tabelle 2-4: Übersicht der AOC-Maxima im UF-Permeat, Filtrerrückstand und in zellfreien Extrakten; AOC-Werte in $\mu\text{g Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen	20
Tabelle 2-5: Gegenüberstellung ausgewählter Kulturparameter der verschiedenen Erdnussschalen-Darreichungsformen und Kultivierungstechniken von <i>Pleurotus sapidus</i>	22
Tabelle 2-6: Gegenüberstellung ausgewählter Kulturparameter der verschiedenen Erdnussschalen-Darreichungsformen und Kultivierungstechniken von <i>Lepista irina</i>	23
Tabelle 2-7: Ligningehalte in $\text{g}\cdot(100 \text{ g}^{-1})$ Substrat	25
Tabelle 2-8: Ligninabbaurate: Kultivierung von PSA mit Erdnussschalenpulver	26
Tabelle 2-9: Identifizierte aromatische Verbindungen in Erdnussschalen per GC-MS	28
Tabelle 2-10: Gehaltsangaben der monomeren Inhaltsstoffe in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ unbehandeltem Erdnussschalenpulver	32
Tabelle 2-11: Gehaltsangaben der monomeren Inhaltsstoffe in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ vorbehandeltem Erdnussschalenpulver ohne und mit Enzymzusatz	34
Tabelle 2-12: Resumee zum Abbau von Erdnussschalenmehl durch <i>Pleurotus sapidus</i> und <i>Lepista irina</i>	36
Tabelle 2-13: Gehalte des <i>De-novo</i> -Metaboliten p-Methoxybenzaldehyd im Kulturmedium der verschiedenen Kultivierungsbedingungen	37
Tabelle 2-14: Ligninabbauprodukte: Kultivierung von PSA mit Erdnussschalenpulver; Bestimmung mittels GC-MS als TMS-Derivate	39
Tabelle 2-15: Bilanzierung der Inhaltsstoffe im Kulturmedium: PSA plus Extrakt (nach 5 h) vs. BW Extrakt, HPLC-Bestimmung, Inhaltsstoffe in $\mu\text{g}\cdot(100 \text{ mL})^{-1}$ Kulturmedium	44
Tabelle 2-16: Ligninabbauprodukte: Kultivierung von LIR mit Erdnussschalenpulver; Bestimmung mittels GC-MS als TMS-Derivate	48
Tabelle 2-17: Vorschläge für Summenformel und DBE für die exakte Masse 339,2301 u	50

Tabelle 2-18: Mögliche Summenformeln für hochaufgelöste Massen der Fraktion B	58
Tabelle 2-19: Abbauprodukte in der Fraktion B: LIR plus Erdnussschalpulver; Bestimmung per GC-MS als TMS-Derivate	58
Tabelle 2-20: Aus der exakten Masse berechnete postulierte Summenformeln von Verbindungen der Fraktion E (ESI-HPLC-MS, hochauflösend)	63
Tabelle 2-21: Abbauprodukte in der Fraktion E: LIR plus Erdnussschalpulver; Bestimmung per GC-MS als TMS-Derivate	63
Tabelle 2-22: Identifizierte Abbauprodukte bei den Kultivierungen von PSA und LIR	68
Tabelle 2-23: Nicht identifizierte Abbauprodukte bei den Kultivierungen von PSA und LIR	68
Tabelle 3-1: Ligninabbauraten verschiedener Basidiomyceten	87
Tabelle 3-2: Gehaltsangaben zu niedermolekularen Inhaltsstoffen in Erdnussschalen	90
Tabelle 3-3: Bilanzierung der Abbauprodukte vs. Lignin- und Flavonoidabbau, Angaben in mg·g ⁻¹ Erdnussschalen	105
Tabelle 4-1: Verwendete Mikroorganismen	111
Tabelle 4-2: Nährmedienbestandteile	112
Tabelle 4-3: Sonstige Chemikalien	113
Tabelle 4-4: Standards für die HPLC und GC	114
Tabelle 4-5: Lösungsmittel	115
Tabelle 4-6: Gase	115
Tabelle 4-7: Hilfsmittel	116
Tabelle 4-8: Bedingungen für die analytische HPLC	138
Tabelle 4-9: Bedingungen für die präparative HPLC	139
Tabelle 4-10: Bedingungen für die Micro-HPLC	140
Tabelle 4-11: Bedingungen für den GC-FID	141
Tabelle 4-12: Bedingungen für die GC-MS	141
Tabelle 6-1: Peak-Zuordnung monomerer Erdnussschalen-Inhaltsstoffe und Abbauprodukte mit Retentionszeit und UV-Maxima (HPLC-DAD)	154
Tabelle 6-2: Fraktionen BW Erdnussschalen	156
Tabelle 6-3: Fraktionierung (SC) von Erdnussschalenextrakten an Kieselgel 60 und präparativer HPLC	156
Tabelle 6-4: Fraktionen PSA mit Erdnussschalen	157
Tabelle 6-5: Fraktionen LIR mit Erdnussschalen	158
Tabelle 6-6: Fraktionen LIR mit Erdnussschalenextrakt	159
Tabelle 6-7: Gehalte im Kulturmedium in µg·g ⁻¹ Erdnussschalen	159
Tabelle 6-8: Gehalte im Filtrerrückstand in µg·g ⁻¹ Erdnussschalen	160
Tabelle 6-9: Gehalte im Kulturmedium in µg·g ⁻¹ Erdnussschalen, HPLC-Untersuchung	160

Tabelle 6-10: Gehalte im Filtrerrückstand in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen, HPLC-
Untersuchung

160

Abkürzungsverzeichnis

AAO	Arylalkoholoxidase
ABTS	Diammonium-Salz der 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-2,3-dihydro-1,3-benzthiazol-6-sulfonsäure)
AOC	antioxidative Kapazität
AU	Absorptions-Einheiten
BFM	biologische Feuchtmasse
BHT	tert.-Butylhydroxytoluol
bidest.	bidestilliert
BSA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
BSTFA	N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
BTM	biologische Trockenmasse
BW	Blindwert
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DAD	Dioden-Array-Detektor
DBE	Doppelbindungsäquivalente
DPPH	2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazylhydrazin
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector; Verdampfungslichtstredetektor
ESI	Elektro-Spray-Ionisierung
et al.	und Mitarbeiter
eV	Elektronenvolt
f. Mikrobiol.	für die Mikrobiologie
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FTIR	Fourier-Transformationsinfrarotspektroskopie
GAE	Gallussäure-Äquivalente
GC	Gaschromatograph
GOD	Glucoseoxidase
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
ISTD	innerer Standard
kDa	kilo Dalton
Lac	Laccase
LiP	Ligninperoxidase
LMW	Low molecular weight
M ⁺	Molekülpeak
m / V	Masse pro Volumen (bei Prozentangaben)
m / z	Masse-Ladungsverhältnis

MG	Molekulargewicht
MnP	Manganperoxidase
MS	Massenspektrometrie
n.b.	nicht bestimmt
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
NP	Normalphase
n.w.	nicht nachweisbar
p.a.	pro analysis
RAR	Radikaleinfangrate
RI	Retentionsindex nach Kováts
RP	Reversed phase, Umkehrphase
SIM	Ausgewählte Massenspur (selected ion monitoring)
SEC	Größenausschlusschromatographie
SNA	Standardnähragar
SNL	Standardnährlösung
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity (antioxidative Kapazität ausgedrückt als Trolox-Äquivalente)
TIC	Total Ion Count (Gesamtionenstrom)
TM	Trockenmasse
TMS	Trimethylsilyl-Derivat
TOF	Time of Flight (Flugzeit)
Trolox	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure
U min ⁻¹	Umdrehung pro Minute
UF	Ultrafiltration
v / v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)

Begriffsdefinitionen

Im Folgenden werden häufig benutzte Begriffe definiert:

- dynamische Kultivierung: Die Kultivierung erfolgte unter Agitation auf einem Rundschüttler.
- statisch: Die Kultivierung erfolgte ohne Agitation.
- statisch-dynamisch: Der erste Teil der Kultivierung erfolgte unter statischen Bedingungen, der zweite Teil der Kultivierung erfolgte unter Agitation.
- Filtrerrückstand: Es handelte sich hierbei um das nicht verwertete Substrat, an dem ggf. Mycel anhaftete. Darunter sind auch weitere nicht-wasserlösliche Bestandteile zu verstehen.

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Einleitung

Weltweit ist Lignin neben Cellulose das zweithäufigst vorkommende Biopolymer. Im Unterschied zur leicht zugänglichen Cellulose weist Lignin eine wesentlich höhere Persistenz auf. Nur wenige Mikroorganismen verfügen über die enzymatische Ausstattung, Lignin abzubauen. Zu den effizientesten ligninabbauenden Mikroorganismen gehören die Basidiomyceten (Ständerpilze) (Eriksson et al., 1990; Kirk et al., 1998).

Der komplexe und heterogene Aufbau des Lignins stellt eine Barriere gegenüber den meisten Mikroorganismen dar. Da sich Ligninbindungen hydrolytisch nicht spalten lassen, ist primär ein extrazellulärer, oxidativer Angriff auf das Polymer notwendig, um die Bindungen zu spalten (Hofrichter und Steinbüchel, 2001).

Bei dem Bioabbau von Lignin handelt es sich um einen oxidativen Prozess, bei dem eine Vielzahl von Enzymen wie Ligninperoxidasen (E.C. 1.11.1.14), Manganperoxidasen (E.C. 1.11.1.13) und Laccasen (E.C. 1.10.3.2) sowie eine weitere Anzahl von Enzymen sowohl als Exoenzyme als auch als membrangebundene und intrazelluläre Enzyme eine Rolle spielen (Hofrichter und Steinbüchel, 2001). Bei den am Abbau von Lignocellulose beteiligten Enzymen handelt es sich um einen Multienzymkomplex, bei dem niedermolekulare Mediatoren und so genannte "Feed-back Enzyme" eine wichtige Rolle spielen (Leonowicz et al., 1999).

Die Mehrzahl der publizierten Arbeiten über den Ligninabbau durch Basidiomyceten beschäftigt sich mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Aspekten des Ligninabbaus (Leonowicz et al. 1999, Hofrichter und Steinbüchel, 2001).

Da es sich bei Lignin um ein komplex zusammengesetztes Makromolekül handelt, wurden Arbeiten zur stofflichen Charakterisierung des Ligninabbaus und zur Ligninbiosynthese vorzugsweise mit monomeren und dimeren Ligninmodellverbindungen sowie mit synthetischem Lignin oder Ligninisolaten durchgeführt (Higuchi, 1993; Kawai et al., 1988; Hattori et al., 1989; Kawai et al., 1989; Krings et al., 2001; Bourbonnais und Paice, 1987; Kawai et al., 1999). Unter dem Einfluss lignolytischer Enzyme kommt es nicht nur zur Bildung niedermolekularer,

aromatischer Abbauprodukte, sondern auch zu Ringöffnungsprodukten (Crestini et al., 1996, Hattori et al., 1999).

Neben einer potenziellen Nutzung niedermolekularer Verbindungen für die Lebensmittelindustrie aus dem Ligninabbau sind dieser als solcher sowie die Charakterisierung und Gewinnung daran beteiligter Enzyme ebenfalls von wirtschaftlichem Interesse. Zu nennen sind:

- das mikrobielle Bleichen von Pulpen und die mikrobielle Delignifizierung bei der Papierherstellung (Kashino et al., 1994; Addelemann, 1995),
- der Abbau von Lignin in Futtermitteln, der zu einer besseren Verwertung durch Wiederkäuer und so zu einer Aufwertung von ligninreichem Futter führt (Fukushima et al., 2001, Haddadin et al., 2002; Ogunbiyi et al., 2002),
- der Einsatz von lignolytischen Enzymen zum Abbau von Umweltkontaminanten wie z. B. Herbiziden, polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs), Dioxinen (Steffen et al., 2002; Mori et al., 2002; Manimekalai und Swaminathan, 2000) und zur Abwasseraufbereitung in der Lebensmittelindustrie (Perez et al., 1998; Ruiz et al., 2002; Hiratsuka et al. 2001),
- der Einsatz lignolytischer Enzyme zur Wollveredlung (Heine et al., 2001),
- die Nutzung lignocellulosehaltiger Substrate als Nährstoffquelle für Speisepilze (Cohen et al., 2002).

Der mikrobielle Abbau des Ligninpolymers stellt eine potenzielle Quelle zur Gewinnung interessanter niedermolekularer, phenolischer Verbindungen dar, die Anwendung als Antioxidantien in der Lebensmittel- und kosmetischen Industrie finden könnten.

Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigt sich mit der Gewinnung von antioxidativ wirksamen Stoffen aus agrarwirtschaftlichen und industriellen Abfall- und Nebenprodukten der Nahrungsmittelerzeugung (Stanley et al., 2001; Schieber et al., 2001; Niwa et al., 2001; Meyer et al., 2001; Bonnely et al., 2000). Da derart gewonnene Antioxidantien natürlichen Ursprungs sind und zudem aus Abfallprodukten gewonnen werden, besitzen sie ein enormes wirtschaftliches Interesse.

Neben den vom Verbraucher bevorzugten natürlichen Antioxidantien Ascorbinsäure und Tocopherole (Vitamine C und E) werden bei der Nahrungsmittelproduktion zusätzlich synthetische Antioxidantien wie tert.-Butylhydroxytoluol (BHT), Butylhydroxyanisol, Propylgallate und tert.-Butylhydrochinone eingesetzt, deren toxikologische Unbedenklichkeit umstritten ist (Klein et al., 2002; Fries et al., 2002). Als bisherige Quelle für die Gewinnung von natürlichen Antioxidantien kommen u.a. Früchte, Gemüse, Wein, grüner und schwarzer Tee und Gewürze infrage (Yen et al., 1997; Lee et al., 2002; Sanchez-Moreno et al., 1999; Dyke et al., 2000; Hermann 2001). Ein deklarationsfreier Einsatz von Extrakten dieser Lebensmittel zu anderen Lebensmitteln ist jedoch aufgrund von Eigenfärbungen, -aroma und -geschmack teilweise eingeschränkt.

Ein bisher industriell noch nicht genutzter Rohstoff für die Gewinnung von natürlichen Antioxidantien ist Lignin. Es liegen einige Arbeiten vor, die sich mit den antioxidativen Eigenschaften von Lignin und Holzextrakten beschäftigen (Guillen et al., 1998; Cruz et al., 1999; Bock et al., 1984; Catignani et al., 1982; Kasprzyka-Guttman et al., 1994; Barclay et al., 1997). Dabei handelt es sich zum Teil um das Ligninpolymer, um monomere Ligninbausteine sowie um Ligninbegleitprodukte, die antioxidativ wirksam sind.

1.2 Problemstellung und Zielsetzung

Dem Abbau von nativem Lignin (eingebunden in dem Polysaccharidkomplex) durch Mikroorganismen und der Fokussierung auf dabei entstehende und gegebenenfalls akkumulierende, niedermolekulare Intermediate ist bisher wenig Beachtung geschenkt worden. Untersuchungen zum chemischen Abbau und zur thermischen Hydrolyse von Lignin sowie zur Identifizierung von niedermolekularen Bestandteilen liegen jedoch bereits vor (Pecina et al., 1986; Niemelä, 1990; Masselter et al., 1995; Javor et al., 2000). Diese Prozesse stellen im Vergleich zu enzymatisch generierten Antioxidantien aus dem Ligninabbau aus den genannten Gründen keine attraktive Alternative dar.

Folgende Arbeitshypothesen sollten mit der vorliegenden Arbeit überprüft werden:

- Ist eine Akkumulation niedermolekularer, antioxidativ wirksamer Substanzen aus dem Ligninabbau durch Basidiomyceten realisierbar?

- Kann durch geeignete Kulturführung eine positive Beeinflussung lignolytischer Aktivitäten (Enzymaktivitäten und Ligninabbauraten) bei den verwendeten Basidiomyceten erzielt werden?
- Können durch mikrobielle Ligninolyse bereits im Holz vorhandene niedermolekulare, antioxidativ wirksame Verbindungen einer Gewinnung zugänglich gemacht werden?
- Ist durch Identifizierung der flüchtigen und nicht flüchtigen Ligninabbauprodukte eine Bilanzierung des Ligninabbaus möglich?

2 Ergebnisse

2.1 Auswahl von Basidiomyceten, ligninhaltigen Substraten und Testsystemen auf antioxidative Kapazität (AOC)

2.1.1 Auswahl der Basidiomyceten

Aufgrund der Ergebnisse eines Aktivitätsscreenings von 46 Basidiomycetenstämmen, die auf erdnussschalenhaltigen Agarplatten kultiviert und anschließend einer selektiven Aktivitätsfärbung auf Laccase, Tyrosinase, Peroxidasen (Lignin- und Manganperoxidasen) und Polyphenoloxidase unterzogen wurden, wurden die folgende Stämme ausgewählt (Peters, 2003):

Tabelle 2-1: Auswahl ligninabbauender Basidiomyceten

Basidiomycetenstamm	Laccase	Tyrosinase	Peroxidase	Polyphenoloxidase	Wachstum
<i>Bjerkandera adusta</i> BAD, CBS 414.48	-	-	o/+	o	+
<i>Lepista irina</i> , LIR, CBS 458.79	+	-	+	+	o
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> , PCH, CBS 481.73	-	-	o/+	o/+	++
<i>Pleurotus sapidus</i> , PSA, DSM 8266	+	-	+	+	++

Enzymaktivitäten:

- + stark ausgeprägte Enzymaktivität
- o/+ mittlere Enzymaktivität
- o sehr gering ausgeprägte Enzymaktivität
- keine Enzymaktivität

Wachstum

- ++ sehr schnelles Wachstum
- + schnelles Wachstum
- o langsames Wachstum

Wie die Enzymaktivitäten zeigen, sind alle ausgewählten Stämme, mit Abstufungen für den Ligninabbau geeignet. Als Besonderheit ist zu erwähnen, dass *Phanerochaete chrysosporium* der meist verwendete Modellstamm für

Untersuchungen zum Ligninabbau ist (de Jong et al., 1994). Von *Bjerkandera adusta* ist bekannt, dass er zahlreiche Arylmetaboliten *de novo* zu synthetisieren vermag (Lapadatescu et al., 2000; Muheim et al., 1990; Lapadatescu und Bonnarne, 1999).

2.1.2 Auswahl der ligninhaltigen Substrate

Als ligninhaltiges Substrat kommt pflanzliches Material mit verholztem Gewebe infrage. Ausschlaggebend für die Auswahl war neben wirtschaftlichen Faktoren (Abfallprodukte) ein hoher Ligningehalt. Aufgrund von Literaturrecherchen und mikroskopischen Untersuchungen wurden die folgenden Substrate ausgewählt:

- Sesamschalen (*Sesamum indicum* L.)
- Rosmarin (*Rosmarinus officinalis* L.),
- Zimt (*Cinnamomum* ssp.) und
- Erdnussschalen (*Arachis hypogaea* L.).

Die Phloroglucin-Salzsäure-Präparate der eingesetzten Substrate zeigten rot angefärbte ligninhaltige Bestandteile (z.B. Gefäßelemente, Steinzelle, Faserzellen etc.). Es waren jedoch nicht alle ligninhaltigen Zellelemente rot angefärbt, daher war eine exakte Quantifizierung des Ligningehaltes durch die Phloroglucin-Salzsäure-Färbung nicht möglich. Bei allen Substraten war jedoch eine Abnahme der Ligninbestandteile mikroskopisch im Verlauf der Kultivierung erkennbar. Die mikroskopische Untersuchung zeigten die charakteristischen Merkmale der verwendeten Substrate (Schormüller, 1970; Gassner et al., 1989). Alle Substrate waren frei von Fremdbestandteilen.

2.1.3 Testsysteme für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Um das Auffinden von Abbauprodukten zu erleichtern, wurde nach Testsystemen gesucht, die bestimmte funktionelle Eigenschaften der Abbauprodukte detektieren können. Die beim Ligninabbau entstehenden phenolische Verbindungen haben die Eigenschaft, aufgrund ihrer Hydroxylgruppen antioxidativ wirksam zu sein (Bungert, 1996). Aus der Vielzahl beschriebener Tests zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität (Prior et al., 1999), im Folgenden kurz als AOC bezeichnet, wurden folgende ausgewählt:

- Radikaleinfangtests, lösungsmittelabhängig DPPH- und/oder ABTS-Test, (siehe 4.10) wurden aufgrund ihrer schnellen Durchführbarkeit und ihres geringen materiellen Aufwandes angewandt.
- Dientest, ein Stabilitätstest für tocopherolfreies Maiskeimöl, 'stripped corn oil', wurde als Referenzmethode zur potenziellen Stabilisierung lipidreicher Lebensmittel gewählt (siehe 4.10.3)
- Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes mittels Folin-Ciocalteus-Reagenz (Gutfinger, 1981) siehe 4.10.2

2.1.4 Vorbehandlung und antioxidative Eigenschaften (AOC) der verwendeten ligninhaltigen Substrate

Alle verwendeten Substrate wurden mit einer Gewürzmühle zu einem Pulver vermahlen, um eine identische Korngrößenverteilung zu gewährleisten. Da es sich bei den verwendeten Produkten um Naturprodukte handelte und diese in ihrer Zusammensetzung Schwankungen unterliegen können, wurden alle Substrate einem Extraktionsschritt (siehe 4.6) unterzogen. Mit diesen beiden Maßnahmen wurde sichergestellt, dass für jede Charge eines Substrates annähernd identische Ausgangsbedingungen geschaffen worden sind.

Tabelle 2-2 gibt eine Übersicht über die nach dem Extraktionsschritt verbleibende AOC im Kulturmedium der eingesetzten Substrate (BW Substrate).

Tabelle 2-2: Antioxidative Eigenschaften (AOC, TEAC-Werte) der verwendeten Substrate, AOC-Angaben in $\mu\text{g}\cdot\text{Trolox g}^{-1}$

Substrat	ABTS, wässriger Extrakt ¹	ABTS, Ethylacetatextrakt ²	DPPH, Ethylacetatextrakt ²
Sesamschalenpulver	36	79	39
Rosmarinpulver	138	507	350
Zimtpulver	308	495	558
Erdnussschalenpulver	11	13	14

1: Das Kulturmedium wurde durch Filtration vom festen Bestandteilen befreit

2: Ethylacetatextrakt des filtrierten Kulturmediums

Tabelle 2-2 zeigt anhand der TEAC-Werte, dass nach dem Extraktionsschritt alle Substrate noch eine AOC aufwiesen.

2.2 Antioxidative Kapazität (AOC) in Extrakten aus dem Abbau ligninhaltiger Substrate durch Basidiomyceten

2.2.1 Screening Teil 1

Im Verlauf des Screenings wurden alle Organismen dynamisch kultiviert (siehe 4.7.3.5). Die antioxidative Kapazität (AOC) wurde über die Radikaleinfangeigenschaft im Filtrat des Kulturmediums direkt und in einem Lösungsmittel-extrakt (Ethylacetatextrakt) bestimmt. Der Ligninabbau wurde in dieser Screening-Phase halbquantitativ nach Phloroglucin-HCl-Färbung mikroskopisch verfolgt (4.9.1). Über den gesamten Kulturverlauf wurden folgende Parameter im Kulturmedium und im Ethylacetatextrakt bestimmt (siehe Anhang, Abbildung 6-1):

- pH-Wert,
- AOC mittels ABTS-Test (Kulturmedium und Ethylacetatextrakt),
- AOC mittels DPPH-Test (Ethylacetatextrakt),
- Gesamtpolyphenolgehalt (Ethylacetatextrakt),
- Stresslagerung von 'stripped corn oil' (Zusatz von Ethylacetatextrakten ausgewählter Kulturtage zum Maiskeimöl).

Die bei den Untersuchungen ermittelten Kulturparameter (pH-Wert, Ligninabbau) und AOC-Werte der Kulturmedien sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst. Bei jeder Versuchsreihe wurden auch die nativen antioxidativen Kapazitäten (AOC) der verwendeten Substrate (BW Substrat) mitbestimmt. Ferner wurden bei jeder Kultivierungsreihe die native AOC der Kulturen ohne Ligninzusatz (BW Pilz) bestimmt.

Eine Quantifizierung des Substrat-Abbaus über die Bestimmung der Trockenmasse war nicht möglich, da das Mycel und das ligninhaltigem Substrat nach der Probennahme (Zentrifugation, Filtration) nicht mehr getrennt werden konnten. Die Summenbestimmung der beiden Parameter (TM Substrat mit BTM Pilz) lässt nur eingeschränkte Rückschlüsse auf die Einzelparameter zu, da zwei gegenläufige Effekte vorlagen:

- Abnahme der Trockenmasse (TM) des Substrats
- Zunahme Biotrockenmasse (BTM) des Pilzmycels

Tabelle 2-3: Darstellung der Kulturparameter Ligninabbau und pH-Wert sowie der AOC-Bilanz im Verlauf der Kultivierung der verschiedenen Basidiomyceten mit den unterschiedlichen Substraten

Mikroorganismus	Substrat bzw. Kontrollkultur	Verlauf pH-Wert	Ligninabbau (mikroskopisch)	AOC Kulturmedium (ABTS-Test)	AOC Ethylacetatextrakt (ABTS-Test)	AOC Ethylacetatextrakt (DPPH-Test)
	Sesamschalenpulver	5,2 bis 7,8; max. 8,0	++	Laccase stört Test	- mit Schwankung	-
<i>Pleurotus sapidus</i>	Erdnussschalen	5,2 bis 5,7	++	Laccase stört Test	-	-
	BW PSA	5,2 bis 6,0		Laccase stört Test		
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Sesamschalenpulver	5,1 bis 8,9	++	+	+ mit Schwankung	O
	Zimtpulver	4,9 bis 5,6	+	--	--	--
	BW PCH	5,0 bis 6,0				
	Sesamschalenpulver	4,4 bis 5,3	+	-	-	-
<i>Bjerkandera adusta</i>	Zimtpulver	5,2 bis 6,0	+	--	--	--
	Rosmarinpulver	4,5 bis 5,4	++	--	--	--
	BW BAD	5,2 bis 6,0				
<i>Lepista irina</i>	Erdnussschalenpulver	5,1 bis 6,0	++	Laccase stört Test	O	erst +, später -
	BW LIR	5,0 bis 6,0		Laccase stört Test		

Erläuterungen zu Tabelle 2-3:

BW PSA, BW PCH, BW BAD: Kontrollkultur ohne Zusatz von Substrat

Ligninabbau ++ deutlicher Ligninabbau

Ligninabbau + erkennbarer Ligninabbau

AOC - - Abnahme der AOC um mehr als 75% des AOC-Wertes des Substrates

AOC - Abnahme der AOC um mehr als 10% des AOC-Wertes des Substrates

AOC O keine Änderung der AOC im Vergleich zum Kontrollwert BW Substrat, $\pm 10\%$ des Kontrollwertes

AOC + Hinzugewinn im Verlauf der Kultivierung um mehr als 10% des AOC-Wertes des Substrates

Schwankung Änderung der AOC um mehr als 25% im Verlauf der Kultivierung, zwischenzeitliche Maxima und Minima möglich

2.2.1.1 Kultivierung mit extrahiertem Sesamschalpulver

Bei der Verwendung von Sesam als Substrat kam es im Verlauf der Kultivierungen zu keiner nennenswerten Akkumulation antioxidativer Verbindungen.

Abbildung 2-1 zeigt die AOC im Kulturmedium von *Phanerochaete chrysosporium*. Im Vergleich zu den Kontrollwerten (BW Sesamschalpulver und BW *Phanerochaete chrysosporium*) ist eine Zunahme der AOC erkennbar. Im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von *Phanerochaete chrysosporium* zeigten sich nur marginale Änderungen der AOC-Werte gegenüber dem BW Sesamschalpulver (Abbildung 2-2).

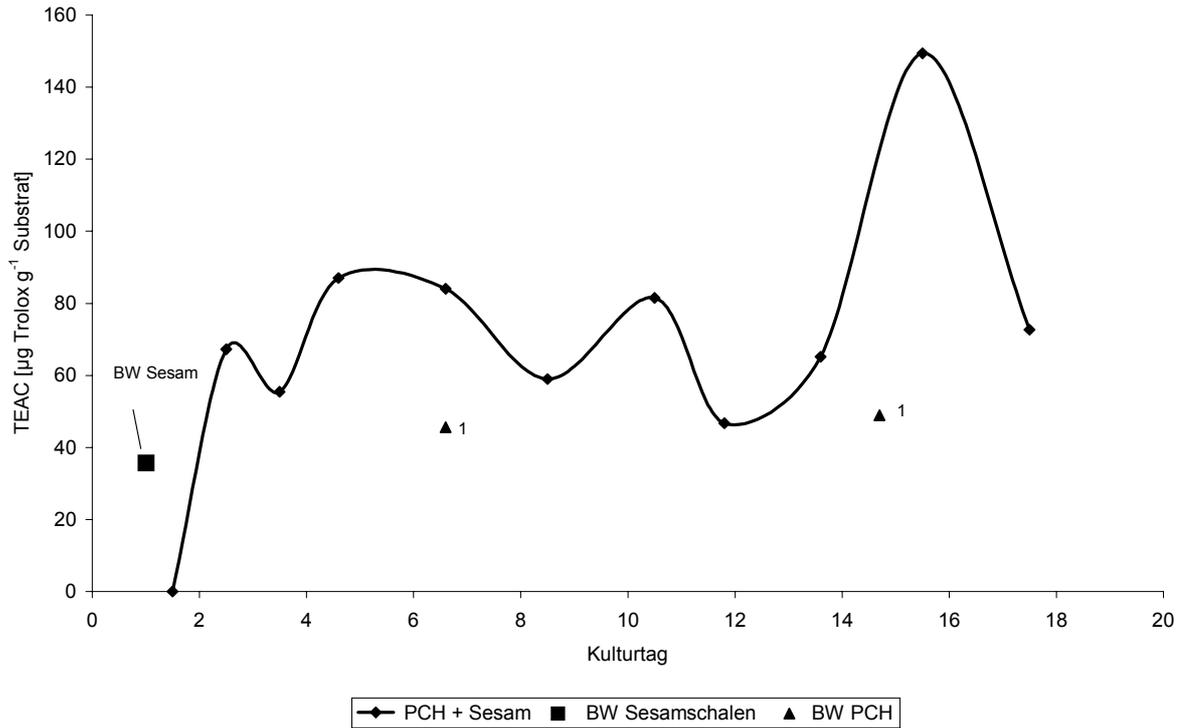


Abbildung 2-1: AOC (ABTS-Test) im Kulturmedium: Kultivierung von PCH mit Sesamschalenpulver (1: ABTS BW PCH)

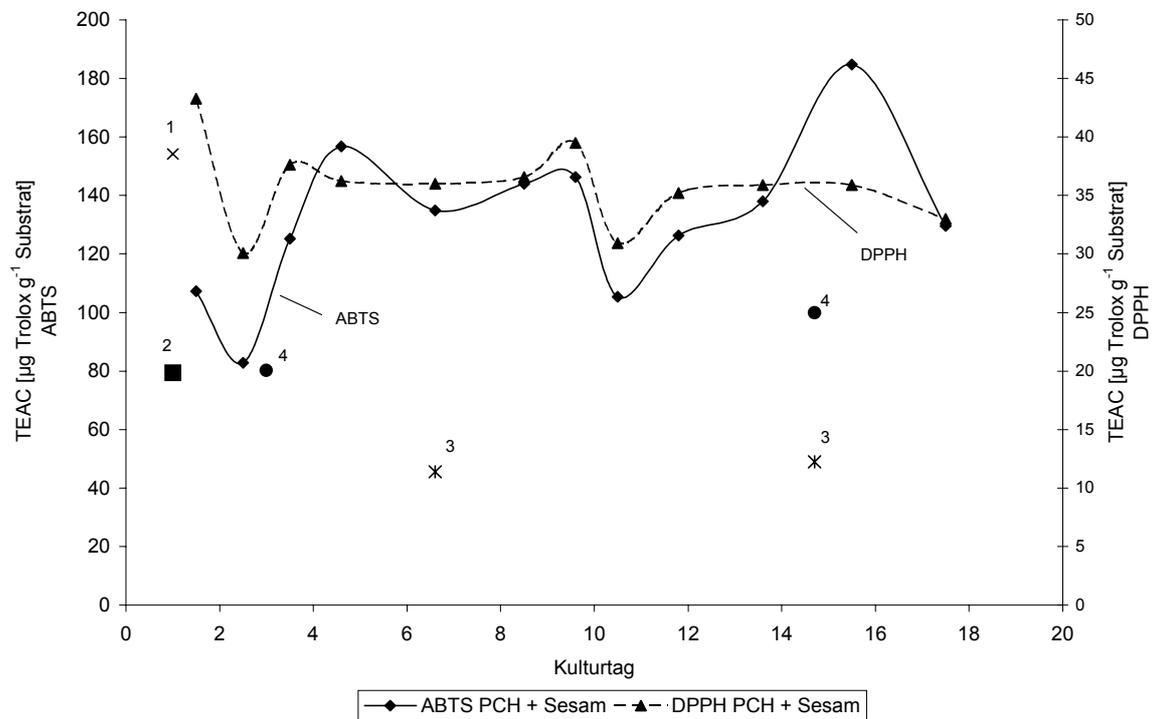


Abbildung 2-2: AOC (ABTS- und DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von PCH mit Sesamschalenpulver (1: ABTS BW Sesamschalenpulver, 2: DPPH BW Sesamschalenpulver, 3: ABTS BW PCH und 4: DPPH BW PCH)

Eine Bestimmung der AOC-Werte im Kulturmedium von *Pleurotus sapidus* war aufgrund einer Laccase-Aktivität nicht möglich (siehe Diskussion). Bei *Phanerochaete chrysosporium* (siehe Abbildung 2-1) und bei *Bjerkandera adusta* lag keine Laccase-Aktivität vor.

Am Beispiel der Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* mit Sesamschalenpulver sind in Ethylacetatextrakten von Kulturmedien die ermittelten AOC-Werte verschiedener Kulturtage dargestellt. Die Abbildung 2-3 bis Abbildung 2-5 zeigen die mit unterschiedlichen Messverfahren (ABTS, DPPH, Gesamtpolyphenolgehalt und dem Lagerstabilitätstest von 'stripped corn oil') ermittelten AOC-Verläufe.

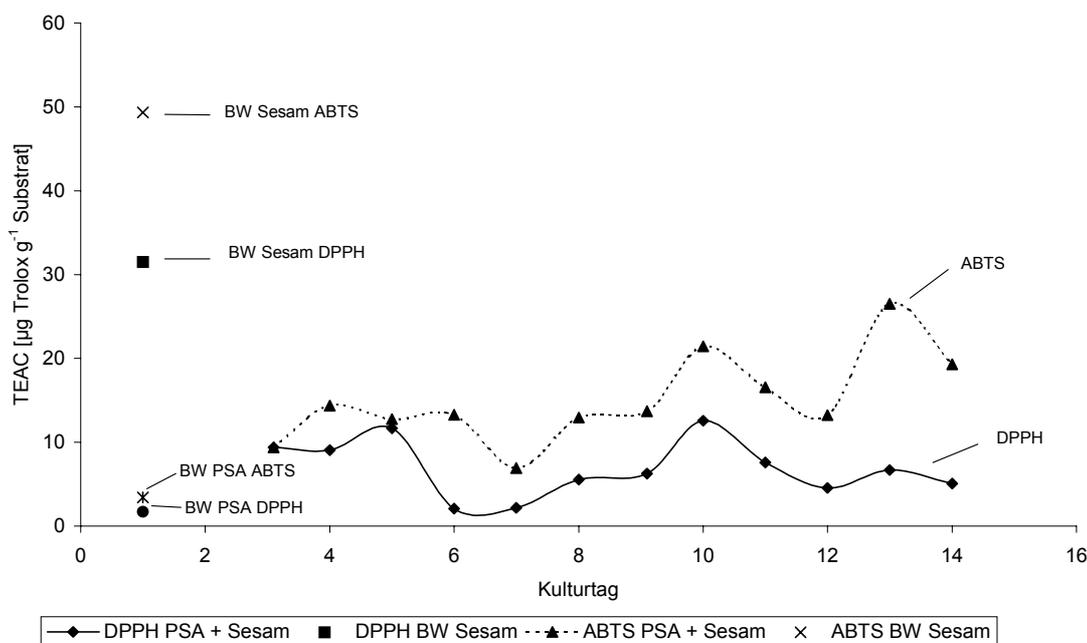


Abbildung 2-3: AOC (ABTS- und DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von PSA bei Zusatz von Sesamschalenpulver

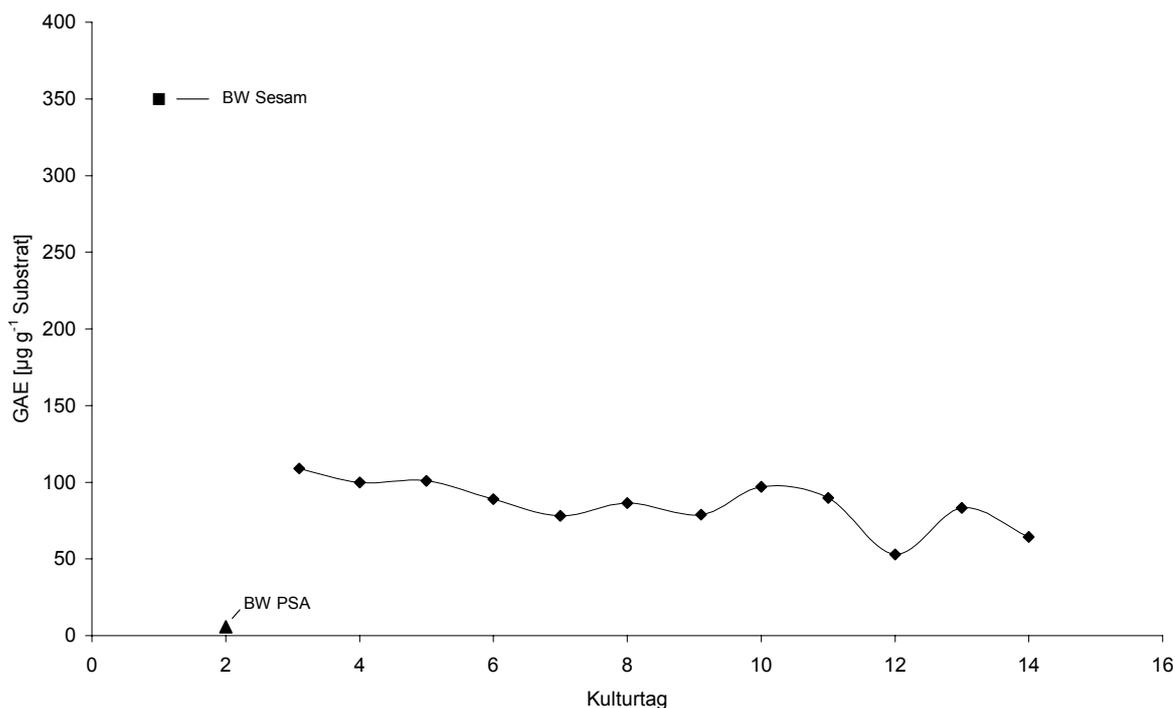


Abbildung 2-4: Gesamtpolyphenolgehalt im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums von PSA bei Zusatz von Sesamschalpulver

Der zeitliche Verlauf des Gesamtpolyphenolgehaltes (AOC-Referenztest) ergibt ein prinzipiell ähnliches Bild wie bei dem ABTS- und DPPH-Test.

Als Referenzmethode zum ABTS- und DPPH-Test wurde zusätzlich die stabilisierende Wirkung von Ethylacetatextrakten auf stressgelagertes (Lagerversuch bei 60 °C) 'stripped corn oil' untersucht (4.10.3). Dazu wurden dem 'stripped corn oil' Ethylacetatextrakte aus verschiedenen Kulturmedien (6. und 9. Kulturtag) zugesetzt. Eine antioxidative Wirkung eines Extraktes war dann gegeben, wenn im Vergleich zum Kontrollwert (nur 'stripped corn oil') der Gehalt an konjugierten Dienhydroperoxiden geringer war. Als antioxidative Referenzsubstanz diente Butylhydroxytoluol (BHT) in einer Konzentration von $250 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ stripped corn oil. Abbildung 2-5 zeigt die besonders stark ausgeprägte antioxidative Wirkung von BHT. Ein Extrakt von nicht fermentierten Sesamschalen (BW Sesamschalen) besitzt gegenüber BHT eine deutlich geringere, gegenüber den Extrakten aus der Kultivierung mit Sesamschalen jedoch höhere antioxidative Wirkung.

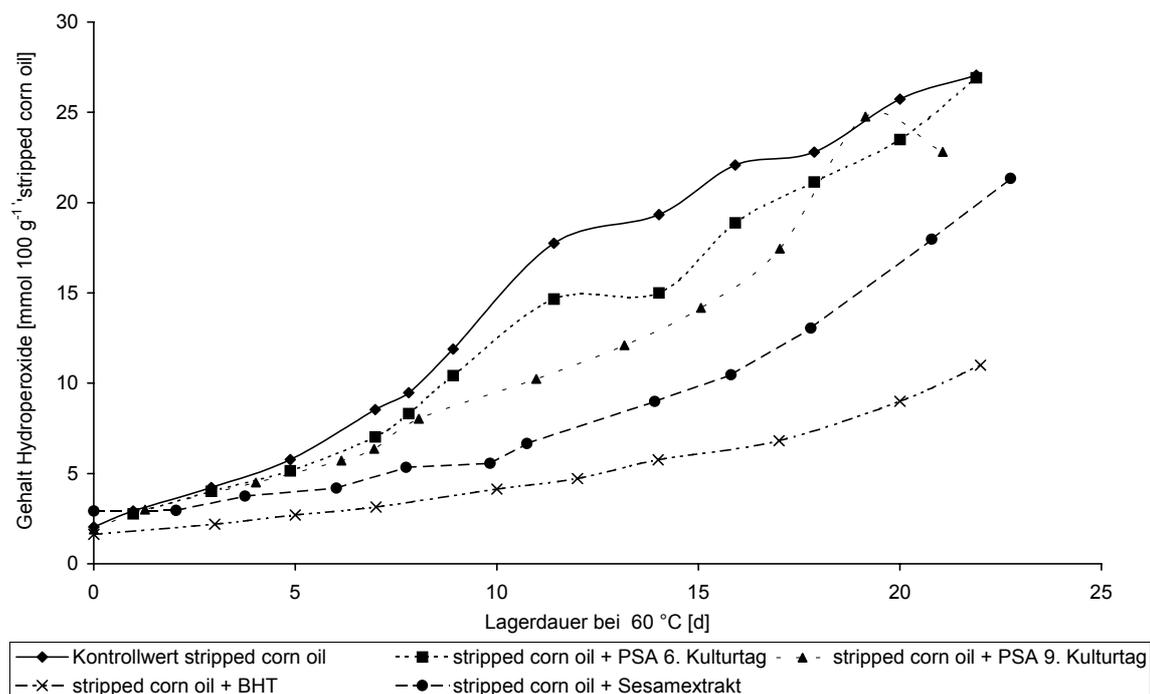


Abbildung 2-5: Lagerstabilität von 'stripped corn oil' mit Ethylacetatextrakt-Zusätzen aus einer Kultivierung von PSA mit Sesamschalenpulver

Die mit unterschiedlichen, z.T. unabhängigen Testmethoden erzielten Ergebnisse spiegeln einheitlich wieder, dass es zu keiner Akkumulation antioxidativ wirksamer Substanzen im Verlauf der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit Sesamschalen kommt, sondern im Gegenteil sogar extrahierbare antioxidativ wirksame Substanzen der zugesetzten Sesamschalen im Verlauf der Kultivierung abgebaut worden sind.

2.2.1.2 Kultivierung mit vorbehandeltem Zimt- und Rosmarinpulver

Bei der Kultivierung mit extrahiertem Zimtpulver wies das Substrat trotz eines Extraktionsschrittes eine hohe AOC auf. Im Verlauf der Kultivierung von *Phanerochaete chrysosporium* und *Bjerkandera adusta* zeigte sich nach bereits wenigen Kulturtagen eine sehr starke Abnahme der AOC im Kulturmedium. Abbildung 2-6 veranschaulicht die starke Abnahme der AOC im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums.

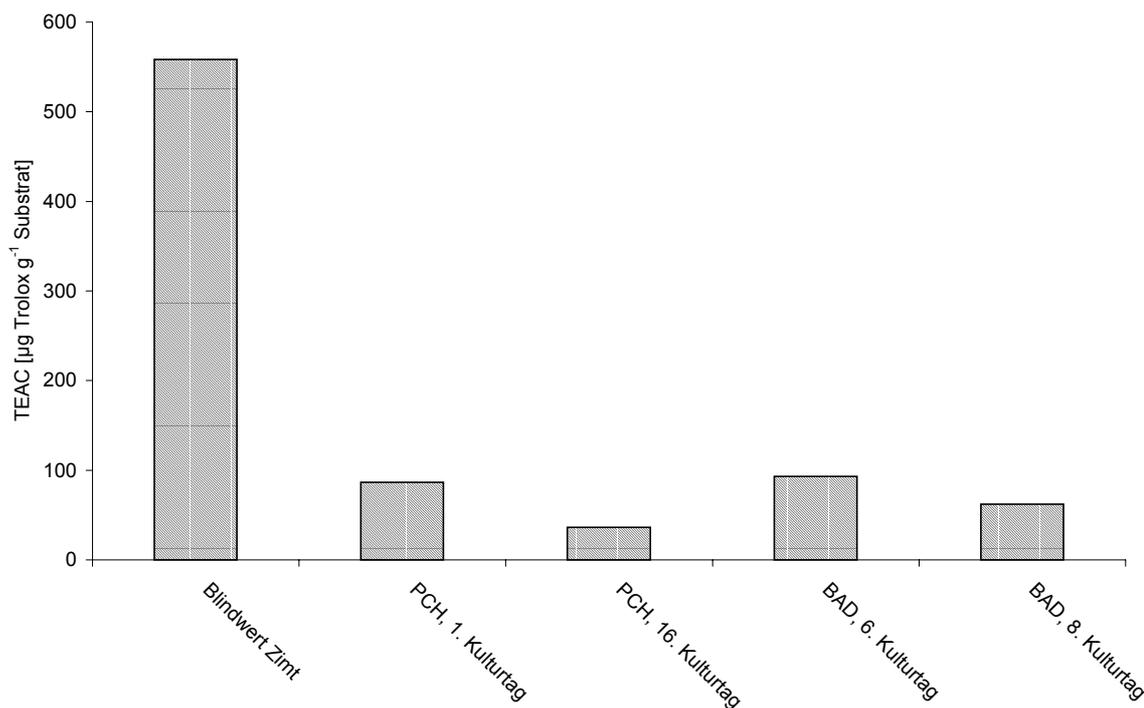


Abbildung 2-6: Abbau der AOC (DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt von den Kulturmedien von PCH und BAD mit Zimtpulver

Bei der Kultivierung von *Bjerkandera adusta* mit vorbehandeltem Rosmarinpulver zeichnete sich ein vergleichbares Bild wie bei der Kultivierung mit Zimtpulver ab.

2.2.1.3 Kultivierung mit Erdnussschalenpulver

Die Kultivierung von *Lepista irina* mit Erdnussschalenpulver zeigte geringe temporäre Hinzugewinne der antioxidativen Kapazität in den Ethylacetatextrakten der Kulturmedien (siehe Abbildung 2-7).

Bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* wurden Abnahmen der AOC-Werte beobachtet, die im Verlauf der Kultivierungen hohen Schwankungen unterworfen waren (Abbildungen sind nicht mit aufgeführt).

Die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes und der AOC mithilfe des Lagerstabilitätstests mit 'stripped corn oil' zeigten bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* eine Abnahme der antioxidativen Kapazität (Abbildung nicht aufgeführt). Bei *Lepista irina* ergab sich in Übereinstimmung mit den oben Ausgeführten eine geringfügige temporäre Zunahme des Gesamtpolyphenolgehaltes. Jedoch war gegen Ende der Kultivierung kein

Unterschied zu BW Erdnussschalenpulver und BW *Lepista irina* erkennbar (Abbildung nicht aufgeführt).

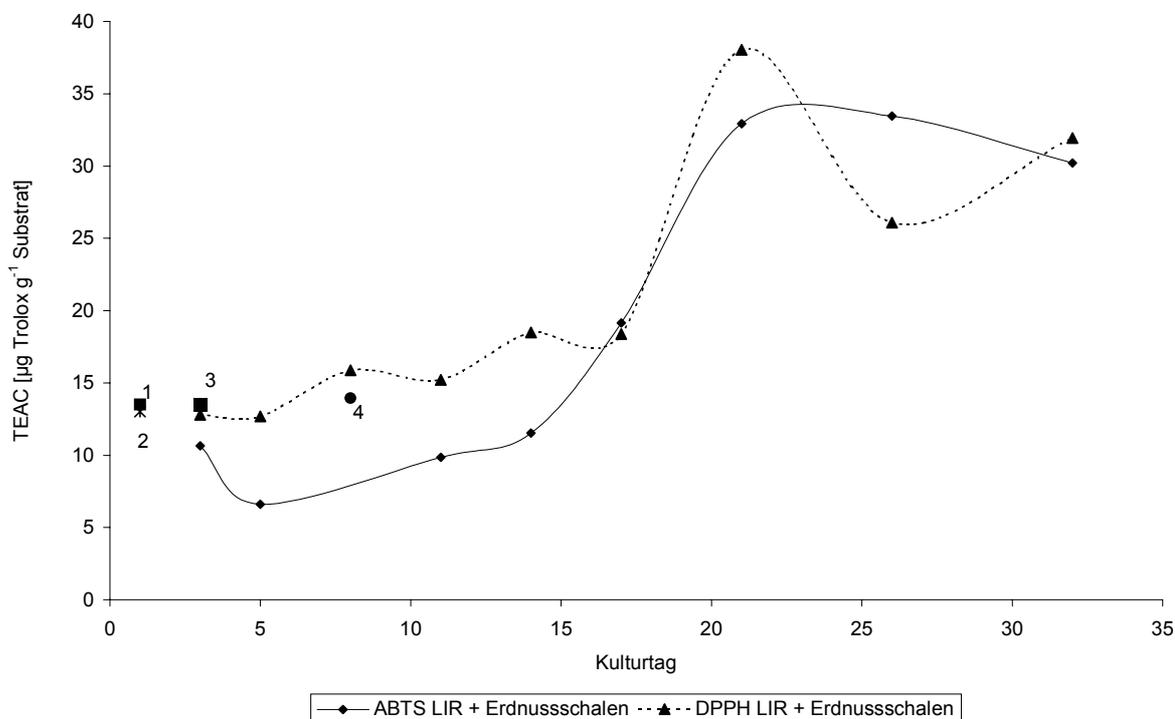


Abbildung 2-7: AOC (ABTS- und DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt: Kultivierung von LIR mit Erdnussschalenpulver (1: BW Erdnussschalen im ABTS-Test, 2: BW Erdnussschalen im DPPH-Test, 3: BW LIR im ABTS-Test, 4: BW LIR im DPPH-Test)

2.2.1.4 Fazit des Screenings, Teil 1

Ein Ligninabbau konnte bei allen eingesetzten Basidiomyceten mikroskopisch nachgewiesen werden. Es konnte im Verlauf der Kultivierung mit ligninhaltigen Substraten keine Erhöhung der AOC des Kulturmediums erreicht werden. Die Kultivierungen von *Lepista irina* mit Erdnussschalenpulver zeichneten sich durch eine geringe Zunahme an AOC aus (siehe Abbildung 2-7).

Die Substrate Rosmarin- und Zimtpulver zeigten eine hohe native AOC im Vergleich zu Erdnussschalen- und Sesamschalenpulver. Entsprechend ausgeprägt waren die Abnahmen der AOC im Kulturmedium bei den Kultivierungen mit Zimt und Rosmarin. Für vertiefende Untersuchungen wurde aufgrund des hohen Ligningehaltes und der geringen nativen AOC vorbehandeltes Erdnussschalenpulver als Substrat ausgewählt. Bei den Pilzkulturen wurden *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* aufgrund ihrer ausgeprägten lignolytischen Aktivität gegenüber Erdnussschalen

ausgesucht. Zudem zeigte *Lepista irina* eine temporäre Erhöhung der AOC im Kulturmedium, während *Pleurotus sapidus* auch aufgrund seines guten Wachstums ausgewählt wurde.

Die folgenden vertiefenden Untersuchungen sollten zur Klärung folgender Gesichtspunkte dienen:

- Kommt es bei annähernd gleich bleibender AOC im Kulturmedium über den Kulturverlauf zu einer Zunahme niedermolekularer antioxidativer Substanzen auf Kosten des polymeren Lignins?
- Werden durch einen partiellen Ligninabbau antioxidativ wirksame Erdnussschalensubstanzen einer extraktiven Gewinnung zugänglich gemacht?
- Kann ein Ligninabbau ohne vitale Zellen durch isolierte lignolytische Exoenzyme bewerkstelligt werden und kann dadurch der Katabolismus niedermolekularer Substanzen durch den Pilz vermieden werden?

2.2.2 Abbau von Erdnussschalen durch *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus*, Screening Teil 2

Durch den Einsatz von Ultrafiltrationsmodulen (cut-off 10 kDa) lassen sich Lösungen in einen niedermolekularen (Permeat) und hochmolekularen (Retentat oder Konzentrat) Bestandteil trennen.

2.2.2.1 Bestimmung der antioxidativen Kapazität (AOC) von niedermolekularen Verbindungen im Kulturmedium

Mithilfe des ABTS-Testes wurde die AOC im Permeat eines wässrigen Extraktes von vorbehandelten Erdnussschalen (BW Erdnussschalen) bestimmt. Es wurde ein TEAC-Wert von $9 \mu\text{g Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ im Permeat des Ultrafiltrats eines wässrigen Extraktes ermittelt - der TEAC-Wert nicht ultrafiltrierter Blindwerte betrug $11 \mu\text{g Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$. Zu Beginn der Kultivierung von *Lepista irina* mit Erdnussschalenspulver konnte im Vergleich zu den Kontrollwerten eine deutlich höhere AOC im Permeat des Kulturmediums beobachtet werden, die im Verlauf der Kultivierung jedoch schnell abgebaut wurde (Abbildung 2-8).

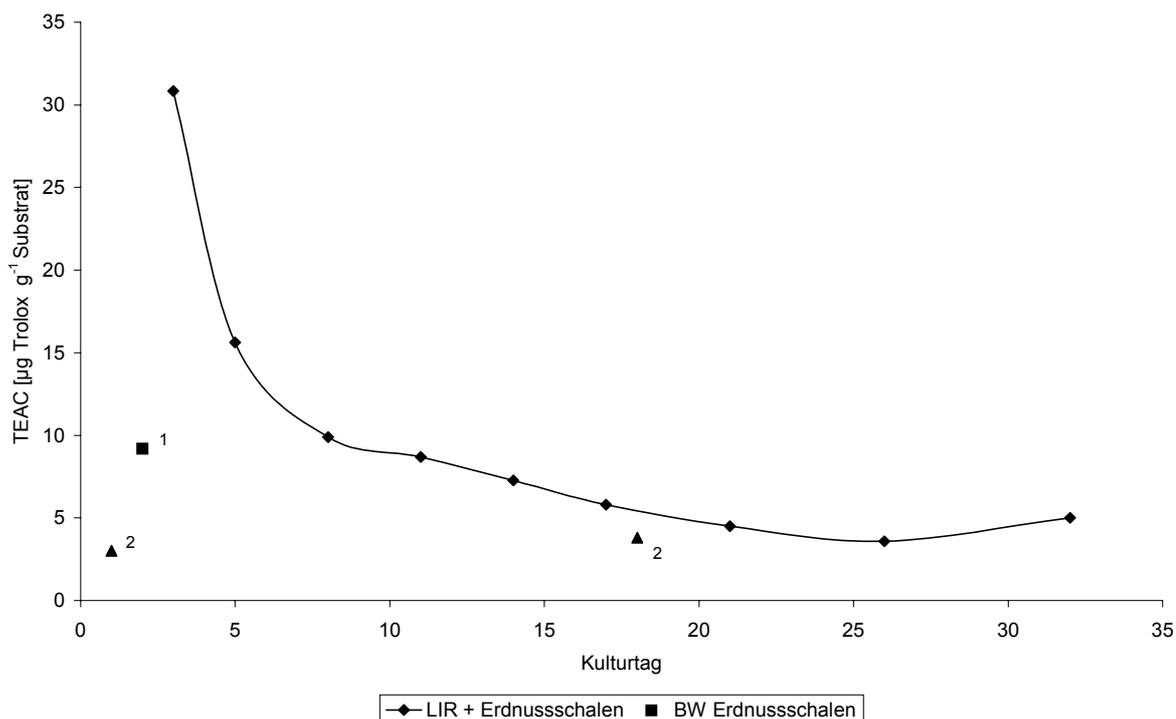


Abbildung 2-8: AOC (ABTS-Test) im UF-Permeat des wässrigen Kulturmediums: Kultivierung von LIR mit Erdnussschalenpulver (1: ABTS-Test BW Erdnussschalenpulver und 2: BW LIR)

Bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* zeichnete sich ein vergleichbares Bild der AOC im UF-Permeat des Kulturmediums ab (Verlauf nicht dargestellt).

2.2.2.2 Bestimmung der AOC-Werte des Filtrerrückstands im Verlauf der Kultivierung
Nicht gelöste Feststoffe und Pilzmycel wurden nach Kultivierung durch Zentrifugation und Filtration (Filtrerrückstand) vom wässrigen Kulturmedium abgetrennt und mit Ethylacetat extrahiert. Die AOC des Ethylacetatextraktes wurde mithilfe des ABTS- und DPPH-Tests bestimmt.

Im Verlauf der Kultivierungen mit *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* erfolgte jeweils eine sehr starke Abnahme der AOC in den Ethylacetatextrakten der Filtrerrückstände (siehe Abbildung 2-9), ähnlich dem Verlauf der AOC-Werte der Permeate der Kulturmedien (siehe Abbildung 2-8).

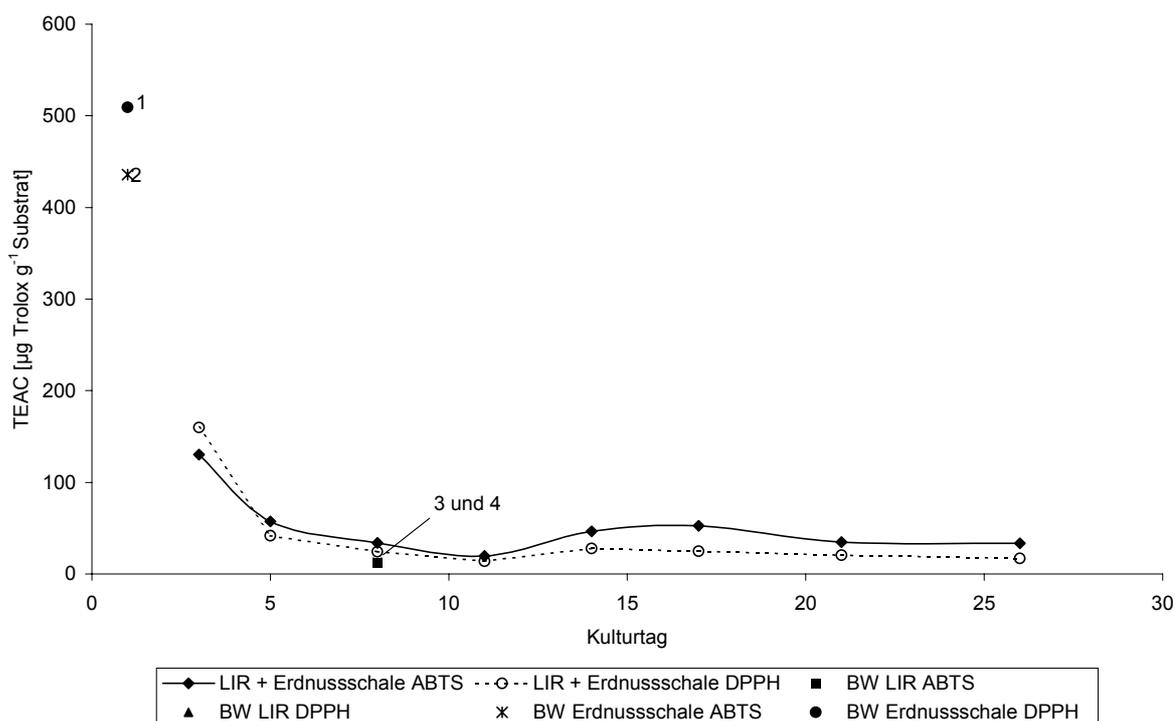


Abbildung 2-9: AOC (ABTS- und DPPH-Test) im Ethylacetatextrakt des Filtrerrückstandes: Kultivierung von LIR mit Erdnussschalpulver (1: DPPH-Test BW Erdnussschalpulver, 2: ABTS-Test BW Erdnussschalpulver, 3: DPPH-Test BW LIR und 4: ABTS-Test BW LIR)

2.2.2.3 Zellfreie Kulturführung mit Rohenzymkonzentraten von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus*

Um eine vollständige Mineralisierung des Lignins zu verhindern, wurde Erdnussschalpulver in einem Falle mit einem exoenzymhaltigen Konzentrat des Kulturmediums in einem anderen Falle mit einem Enzymkonzentrat nach Zellaufschluss versetzt. Bei den Konzentraten handelte es sich um die Retentate der Ultrafiltration induzierter, laccasehaltiger Lösungen (siehe 4.7.3.10 und 4.7.3.11).

Halbquantitative Abschätzungen eines möglichen Ligninabbaus im Filtrerrückstand durch die exoenzymhaltigen Konzentrate ergaben jedoch keine erkennbaren Unterschiede zum Kontrollwert BW Erdnussschalpulver. Die Bestimmung der AOC in Ethylacetatextrakten des wässrigen, enzymhaltigen Mediums von *Pleurotus sapidus* mit Substrat ergab eine Abnahme des TEAC-Wertes um ca. 60% gegenüber dem Kontrollwert, BW Erdnussschalpulver / BW *Pleurotus sapidus*. Der Ansatz mit einem Konzentrat nach Zellaufschluss von *Pleurotus sapidus* zeigte ein nahezu identisches Bild (Abbildung nicht aufgeführt).

Bei zellfreier Inkubation von Erdnussschalenpulver mit einem exoenzymhaltigen Konzentrat des Kulturmediums von *Lepista irina* konnte eine geringe Steigerung der AOC beobachtet werden. Der gleiche Ansatz mit einem enzymhaltigen Konzentrat nach Zellaufschluss von *Lepista irina* lieferte identische Ergebnisse (Abbildung nicht aufgeführt).

2.2.2.4 Zusammenfassung und Fazit des Screenings Teil 2

Durch den Einsatz der Ultrafiltration konnte gezeigt werden, dass im Bereich der niedermolekularen Fraktion (<10 kDa) ein temporärer Zugewinn an AOC-Werten bei den Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* erreicht wurde. Im Extrakt aus dem Filtrerrückstand der Kulturen ergab sich im Gegensatz dazu bereits nach kurzem Kulturverlauf eine starke Abnahme der AOC-Werte (im Vergleich zu BW Substrat im Filtrerrückstand).

Die zellfreien Kulturführungen zeigten mikroskopisch keinen nachweisbaren Ligninabbau. In den Ethylacetatextrakten der Kulturmedien von *Pleurotus sapidus* war eine nachweisbare Abnahme der antioxidativen Kapazität (AOC) erkennbar. Bei der zellfreien Kulturführung mit einem Rohenzymfiltrat von *Lepista irina* konnte hingegen eine Zunahme der AOC beobachtet werden.

Tabelle 2-4 zeigt zusammenfassend die AOC-Maxima in den Permeaten der Ultrafiltrate, den Ethylacetatextrakten der zellfreien Kulturführungen und den Ethylacetatextrakten der entsprechenden Filtrerrückstände zellhaltiger Kulturführungen.

Tabelle 2-4: Übersicht der AOC-Maxima im UF-Permeat, Filtrerrückstand und in zellfreien Extrakten; AOC-Werte in $\mu\text{g Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen

Mikroorganismus bzw. Blindwert	<i>Lepista irina</i>	<i>Pleurotus sapidus</i>	BW Erdnussschalen
AOC im Permeat UF (ABTS)	31	37	9
AOC im Filtrerrückstand (ABTS)	120	35	436
AOC im Filtrerrückstand (DPPH)	170	16	509
AOC in der zellfreien Kultur mit Ethylacetatextrakt (ABTS)	24	8	13
AOC in der zellfreien Kultur mit Ethylacetatextrakt (DPPH)	19	9	14
Bemerkung	Die zellfreie Kultivierung mit Rohenzymfiltrat eines Zellaufschlusses zeigte identische Ergebnisse wie die Kultivierung mit dem Exoenzymfiltrat		

2.3 Steigerung der lignolytischen Aktivitäten

Es sind zahlreiche Methoden beschrieben, um die lignolytischen Aktivitäten zu beeinflussen (Vasdev und Kuhad, 1994; Ha et al., 2001; Perez et al., 1998; Ruiz et al., 2002). Ziel war es eine verstärkte Akkumulation niedermolekularer Abbauprodukte zu erreichen.

2.3.1 Induktion und Steigerung lignolytischer Enzymaktivitäten

Stellvertretend für die Bewertung der ligninolytischen Aktivitäten der Kulturen wurden die Enzymaktivitäten von Laccase (EC 1.10.3.2, Lac) und Glucoseoxidase (EC 1.1.3.4, GOD) bei verschiedenen Kultivierungstechniken bestimmt. Es wurden die folgenden Kultivierungstechniken bei verschiedenen Substrat-Darreichungsformen angewandt und die Kulturparameter Wachstum, Lac-Aktivität, GOD-Aktivität und Exoproteingehalt über den Kulturverlauf bestimmt:

- dynamische Kultivierung mit unbehandeltem Erdnussschalpulver (nur *Pleurotus sapidus*) (siehe 4.7.3.5)
- statisch-dynamische Kultivierung mit unbehandeltem Erdnussschalpulver (siehe 4.7.3.6)
- statisch-dynamische Kultivierung mit vorbehandeltem Erdnussschalpulver und Zusatz von Enzymen (siehe 4.7.3.7)
- dynamische Kultivierung mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt anstelle des Erdnussschalpulvers (siehe 4.7.3.12)

Die statisch-dynamischen Kultivierungen unterschieden sich von den rein dynamischen Kultivierungen in der Mycel-Substrat-Bindung. Während bei der dynamischen Kultivierung das Substrat nur teilweise vom Mycel umwachsen war, zeigte sich bei den statisch-dynamischen Kultivierungen ein vollständiger Einschluss des Substrats in das Mycel des Pilzes. Die dauerhafte Mycel-Substrat-Bindung wurde durch den vorgeschalteten statischen Kultivierungsschritt erreicht. Das Resultat dieser Mycel-Substrat-Bindung waren höhere Laccase-Aktivitäten von *Pleurotus sapidus* (siehe Tabelle 2-5).

Die Verwendung eines ethanolischen Erdnussschalenextraktes zeigte besonders bei *Lepista irina* den größten Einfluss auf die Laccase-Aktivität (siehe Tabelle 2-6).

Der Zusatz von Enzymen (Xylanase, α -Amylase und Amyloglucosidase, siehe 4.7.3.7) – um zellwandgebundenes Lignin und phenolische Verbindungen besser

zugänglich zu machen - zum Kulturmedium von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* wirkte sich ebenfalls auf die Laccaseaktivität aus (siehe Tabelle 2-5 und Tabelle 2-6).

Tabelle 2-5: Gegenüberstellung ausgewählter Kulturparameter der verschiedenen Erdnussschalen-Darreichungsformen und Kultivierungstechniken von *Pleurotus sapidus*

Kultivierung von PSA	Maximum Lac [U·L ⁻¹]	Maximum GOD [U·L ⁻¹]	Proteingehalt [µg·mL ⁻¹]	Wachstum
dynamisch mit Erdnussschalenpulver ¹	26 (14. d)	15,1 (14. d)	470 (21. d)	+
statisch-dynamisch mit Erdnussschalenpulver ²	226 (1. d)	28,7 (1. d)	319 (14. d)	++
statisch-dynamisch mit vorbehandeltem Erdnussschalenpulver	81 (13. d)	n.b.	166 (28. d)	o
statisch-dynamisch mit vorbehandeltem Erdnussschalenpulver und Enzymzusatz	137 (12. d)	n.b.	n.b.	+ bis o
dynamisch mit Erdnussschalenextrakt	151 (4. d)	n.b.	336 (7. d)	o
BW PSA	max. 30	max. 6	170 (10. d)	

1: Abbildung 2-10

2: Abbildung 2-12

Wachstum:

o: Wachstum erkennbar, jedoch geringer als bei Kontrollkultur BW *Pleurotus sapidus*

+: Wachstum vergleichbar mit Kontrollkultur BW *Pleurotus sapidus*

++: Wachstum stärker als bei Kontrollkultur BW *Pleurotus sapidus*

d Kulturtag

n.b. nicht bestimmt

Tabelle 2-6: Gegenüberstellung ausgewählter Kulturparameter der verschiedenen Erdnussschalen-Darreichungsformen und Kultivierungstechniken von *Lepista irina*

Kultivierung von LIR	Maximum Lac [U·L ⁻¹]	Maximum GOD [U·L ⁻¹]	Proteingehalt [µg·mL ⁻¹]	Wachstum
statisch-dynamisch mit Erdnussschalenpulver	193 (11. d)	33 (17. d)	179 (8. d)	++
statisch-dynamisch mit vorbehandeltem Erdnussschalenpulver	38 (10. d)	n.b.	187 (10. d)	O
statisch-dynamisch mit vorbehandeltem Erdnussschalenpulver und Enzymzusatz	86 (6. d)	n.b.	170 (6. d)	+
dynamisch mit Erdnussschalenextrakt ¹	893 (9. d)	n.b.	383 (9. d)	O
BW PSA	max. 30	max. 6	170 (10. d)	

1: Abbildung 2-11

Wachstum:

o: Wachstum erkennbar, jedoch geringer als bei Kontrollkultur BW *Lepista irina*

+: Wachstum vergleichbar mit Kontrollkultur BW *Lepista irina*

++: Wachstum stärker als bei Kontrollkultur BW *Lepista irina*

d Kulturtag

n.b. nicht bestimmt

Die Abbildung 2-10 bis Abbildung 2-12 zeigen die charakteristischen Verläufe der Enzymaktivitäten und des Proteingehaltes im Kulturmedium der unterschiedlichen Kultivierungstechniken und Substratdarreichungsformen.

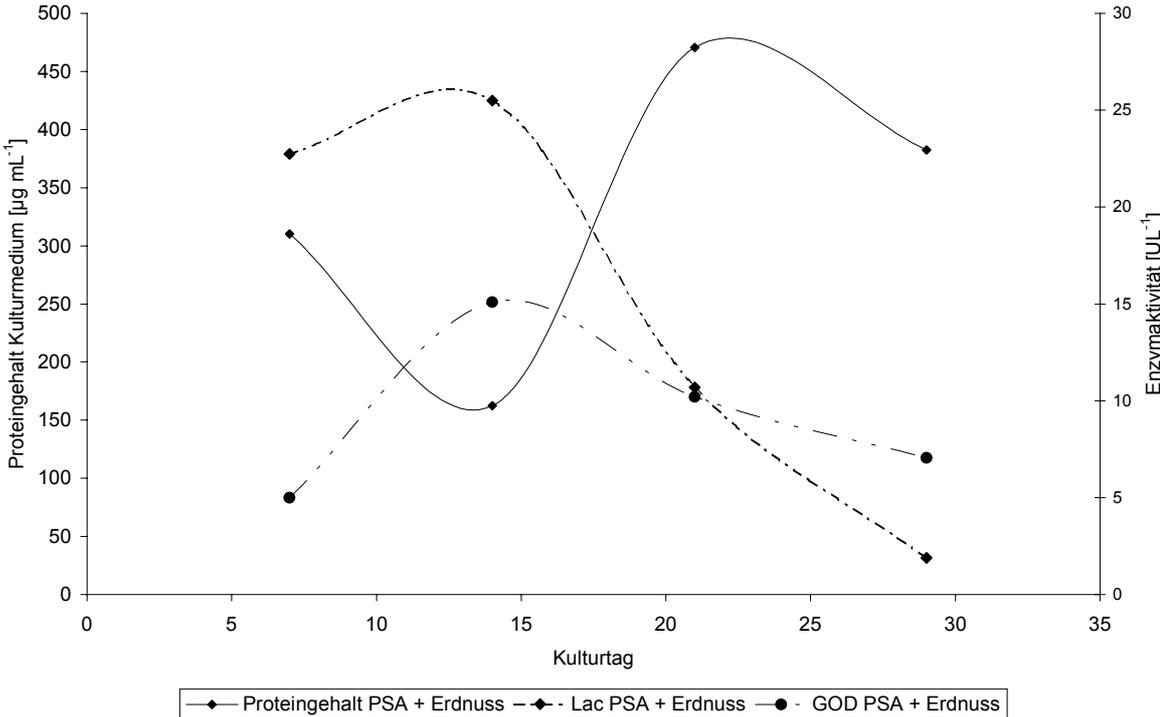


Abbildung 2-10: Enzymaktivität (Lac und GOD) und Exoproteingehalt im Kulturmedium: dynamische Kultivierung von PSA mit Erdnussschalpulver

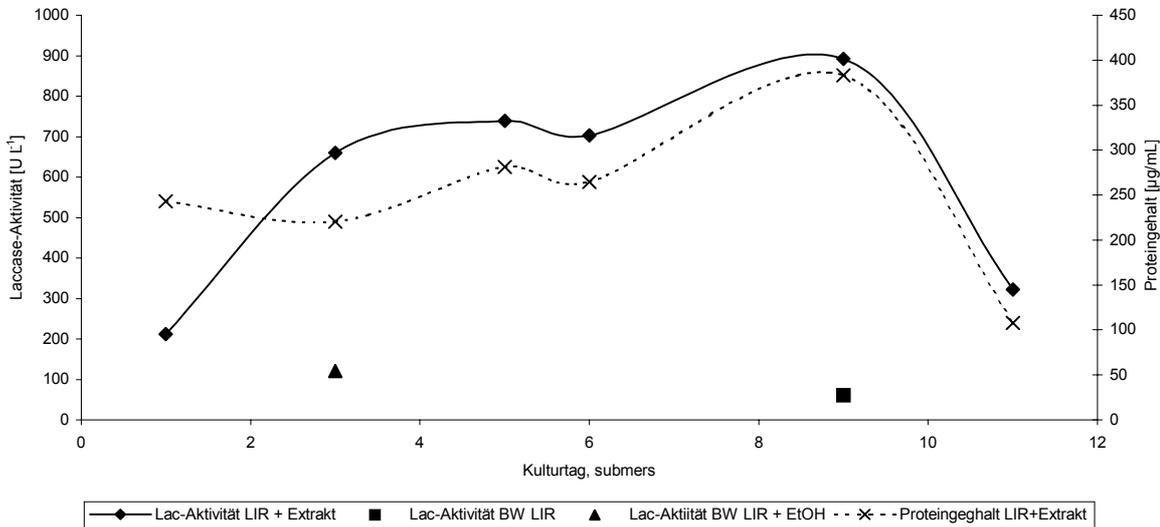


Abbildung 2-11: Laccase-Aktivität und Exoproteingehalt im Kulturmedium: dynamische Kultivierung von LIR mit Erdnussschalenextrakt

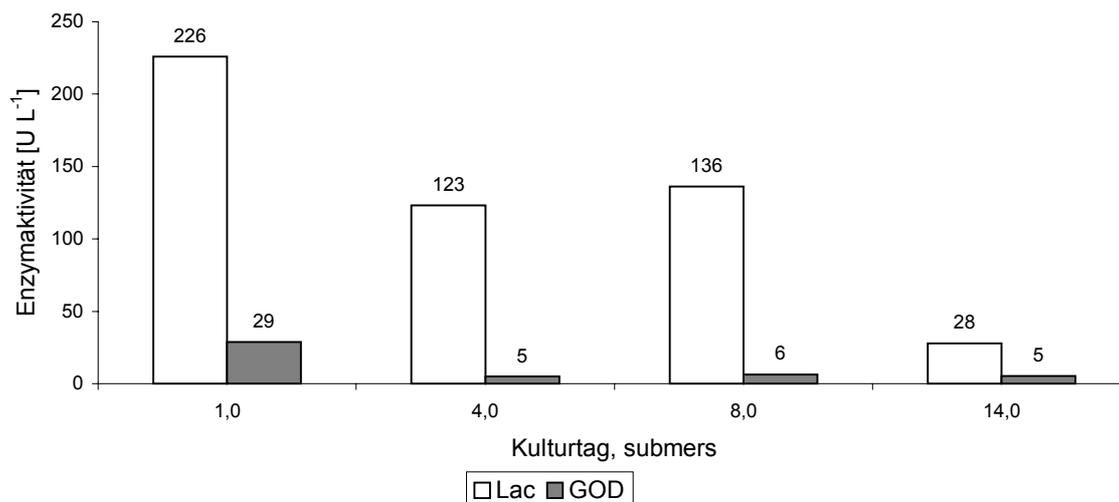


Abbildung 2-12: Enzymaktivitäten (GOD und Lac): statisch-dynamische Kultivierung von PSA mit Erdnussschalenpulver

2.3.2 Bestimmung und Steigerung des Ligninabbaus

Für folgende Substrate wurde der Ligningehalt im Filtrerrückstand nach Dence und Lin (1992) bestimmt: unbehandelte Erdnussschalen, vorbehandelter Rosmarin und vorbehandelte Sesamschalen. Als Referenzmaterial diente Erlenholz.

Tabelle 2-7: Ligningehalte in g·(100 g⁻¹) Substrat

Substrat	Ligningehalt
Erdnussschalen, unbehandelt	34,8
Rosmarin, vorbehandelt	16,6
Sesamschalen, vorbehandelt	4,9
Erlenholz (Referenzmaterial)	26,8

Nach der Methode von Dence und Lin (1992) wurden die Ligningehalte im Filtrerrückstand von *Pleurotus sapidus* nach Zusatz von Erdnussschalenpulver bestimmt. Da sich nicht verwertetes Erdnussschalenpulver und Pilzmycel nach Abtrennung vom Kulturmedium im Filtrerrückstand nicht voneinander trennen ließen, wurden sie gemeinsam zur Ligningehaltsbestimmung eingesetzt. Das Pilzmycel störte die Ligninbestimmung nach der Acetyl bromidmethode von Dence und Lin und führte in Abhängigkeit der Pilzmasse zu verfälschten, überhöhten Ligningehalten.

Um diesen störenden Einfluss auszuschalten, wurde eine modifizierte Ligninbestimmungsmethode nach Hatfield et al. (1999) verwendet (4.9.2). Die wesentlichen Unterschiede zu Dence und Lin liegen in einem Behandlungsschritt mit hydrolytischen Enzymen (Protease, Xylanase, Amyloglucosidase und α -Amylase). Es zeigte sich außerdem, dass die Verwendung von Perchlorsäure Ligningehalte im Pilzmycel vortäuschte. Bei der Bestimmung mit Enzymbehandlung und ohne die Verwendung von Perchlorsäure wurde in reinem Pilzmycel von *Pleurotus sapidus* ein Messwert ermittelt, der einem "Ligningehalt" von lediglich $4,4 \text{ g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$ Mycel entspricht. Angesichts des geringen Anteils von Pilzmycel an dem Pilz-Substrat-Gemisch war der Einfluss des Mycels durch die modifizierte Ligninbestimmungsmethode nach Hatfield et al. (1999) zu vernachlässigen.

In Tabelle 2-8 sind die ermittelten Ligningehalte mit den entsprechenden Abbauraten aus den verschiedenen Kultivierungen (dynamische und statisch-dynamische Kultivierung) von *Pleurotus sapidus* mit unbehandeltem Erdnussschalpulver aufgelistet. Als Referenzmaterial zur Überprüfung der Methode diente Erlenholz.

Tabelle 2-8: Ligninabbaurate: Kultivierung von PSA mit Erdnussschalpulver, modifizierte Hatfield-Methode (1999)

Kultivierung / Substrat	Ligningehalt $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$	Ligninabbau in%
BW Erdnussschalen	32,0	--
PSA dynamisch, 7. Kulturtag	28,8	10
PSA dynamisch, 28. Kulturtag	28,2	12
PSA statisch-dynamisch, 21. Kulturtag	25,3	25
Erlenholz (Referenzmaterial)	22,6	--

Bei den statisch-dynamischen Kultivierungen war die Ligninabbaurate doppelt so hoch wie bei den dynamischen Kultivierungen.

2.3.3 Fazit: Steigerung der lignolytischen Aktivitäten

Durch die Auswahl der Kulturführung und die Form der Substratzugabe ließen sich lignolytische Aktivitäten induzieren (Ligninabbaurate und Laccase-Aktivität) und dadurch steigern. Der Ligninabbau blieb jedoch partiell. Durch weitere Untersuchungen (HPLC und GC) sollte gezeigt werden, ob durch diese Steigerungen

der lignolytischen Enzymaktivitäten eine weitere Zugänglichmachung bereits vorhandener niedermolekularer, phenolischer Verbindungen in den Erdnussschalen möglich ist.

2.4 Abbau niedermolekularer, phenolischer Verbindungen durch *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus*

Die Ergebnisse der Screenings (Teil 1, siehe 2.2.1; Teil 2, siehe 2.2.2) haben gezeigt, dass bei der Degradation von hochpolymerem Lignin niedermolekulare Abbauprodukte oder Inhaltsstoffe mit antioxidativem Potenzial transient gebildet bzw. freigesetzt werden. Durch Variation der Kultivierungsbedingungen konnte gezeigt werden, dass die lignolytischen Aktivitäten gesteigert werden konnten. Durch Bilanzierung der Inhaltsstoffe vor und während der Kultivierung sollte eine Relation zwischen bereits vorhandenen und durch die Kultivierung zugänglich gemachter Inhaltsstoffe gefunden werden.

2.4.1 Identifizierung und Quantifizierung niedermolekularer Inhaltsstoffe in Erdnussschalenpulver

2.4.1.1 Identifizierung von monomeren aromatischen Verbindungen

Nach Fraktionierung mittels präparativer HPLC (Fraktionierungsprotokoll siehe Anhang, 6.3.1, HPLC-Peakzuordnung Tabelle 6-1) und nach gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion konnten 17 aromatische Verbindungen als originäre Inhaltsstoffe der Erdnussschalen identifiziert werden (Tabelle 2-9).

Tabelle 2-9: Identifizierte aromatische Verbindungen in Erdnussschalen per GC-MS

HPLC-Fraktion	Kováts-Index TMS-Derivate, DB 5	Molpeak TMS-Derivat m/z	Verbindung
D	1243	194	Benzoessäure
C	1366	194	p-Hydroxybenzaldehyd
C	1468	208	Hydroxyacetophenon
D	1526	224	p-Anissäure
C	1539	224	Vanillin
C	1622	238	Acetovanillon
C	1654	282	4-Hydroxybenzoessäure
C	1702	314	Syringaaldehyd
C	1722	254	3,4-Dimethoxybenzoessäure
C	1787	312	Vanillinsäure
C	1848	250	m-Methoxyzimtsäure
B	1854	370	3,4-Dihydroxybenzoessäure
C	1922	342	Syringasäure
C	1959	308	p-Cumarsäure
C	1964	324	Coniferylalkohol
C	2117	338	Ferulasäure
C	2177	396	Kaffeesäure

Die Identifizierung erfolgte über Vergleich der Massenspektren und Retentionsdaten mit denen originärer Standardverbindungen.

2.4.1.2 Identifizierung von Flavonoiden

Nach säulenchromatographischer Vorfraktionierung eines Ethylacetatextraktes von Erdnussschalenpulver an Kieselgel 60 wurden die Fraktionen D und E mittels präparativer HPLC an einer RP-18-Phase subfraktioniert (siehe Anhang, Abbildung 6-4 und Abbildung 6-5). Die HPLC-Chromatogramme sind im Anhang abgebildet.

Von den Subfraktionen wurden UV Spektren mittels HPLC-DAD aufgenommen. Ebenso wurden die Proben mithilfe der hochauflösenden HPLC-MS (TOF-Detektor) und GC-MS nach Silylierung mit BSTFA untersucht. Aufgrund der Massenspektren und der chromatographischen Daten wurde Peak E-P1 (= Peak Nummer 20) als

Eriodictyol und Peak E-P2 (= Peak Nummer 22) als Luteolin identifiziert und mit originären Standardverbindungen abgesichert.

Peak D-P1 (= Peak Nummer 13) wurde ebenfalls per HPLC-DAD (UV-Maxima bei 261 und 296 nm, Abbildung 2-13), und HPLC-MS (hochaufgelöste Masse 177,0192 u¹, C₉H₆O₄, 7 DBE) und GC-MS (Derivatisierung mit BSTFA und Essigsäureanhydrid) untersucht. Das Massenspektrum des TMS-Derivates (Abbildung 2-14) weist ein Molekül mit einem m/z von 322 mit geringer Intensität auf. Das Massenfragment M⁺ minus 15 ist deutlich intensiver. Das Fragmentierungsmuster deutet auf eine stabile aromatische Ringstruktur hin. Das entsprechende Massenspektrum des Acetylderivates (Abbildung 2-15) belegt die Anwesenheit von zwei acetylierbaren Gruppen. Mit den Daten der GC-Massenspektren, der hochaufgelösten Masse aus den HPLC-Untersuchungen und der Übereinstimmung des UV-Spektrums mit den Literaturdaten (Simon et al., 1994), konnte der Peak D-P1 als 5,7-Dihydroxychromen-4-on identifiziert werden.

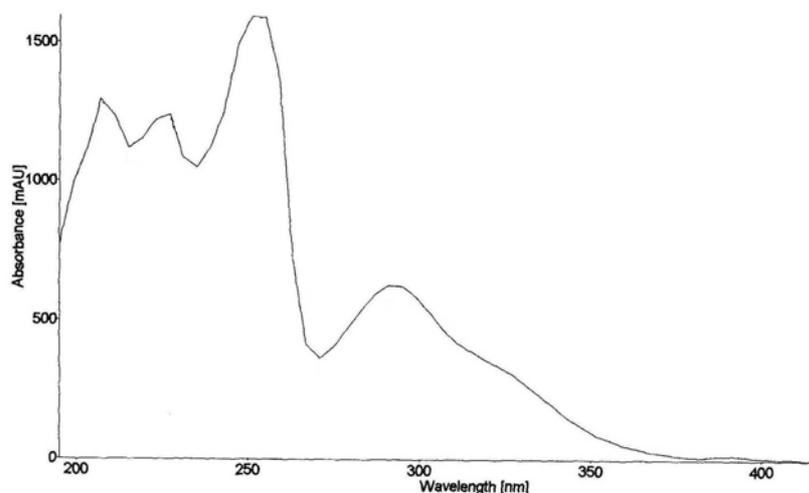


Abbildung 2-13: UV-Spektrum von 5,7-Dihydroxychromen-4-on, mit den UV-Maxima mit λ_{\max} 251 nm und 296 nm

¹ Massenabweichung von der tatsächlichen Masse 2,4 ppm

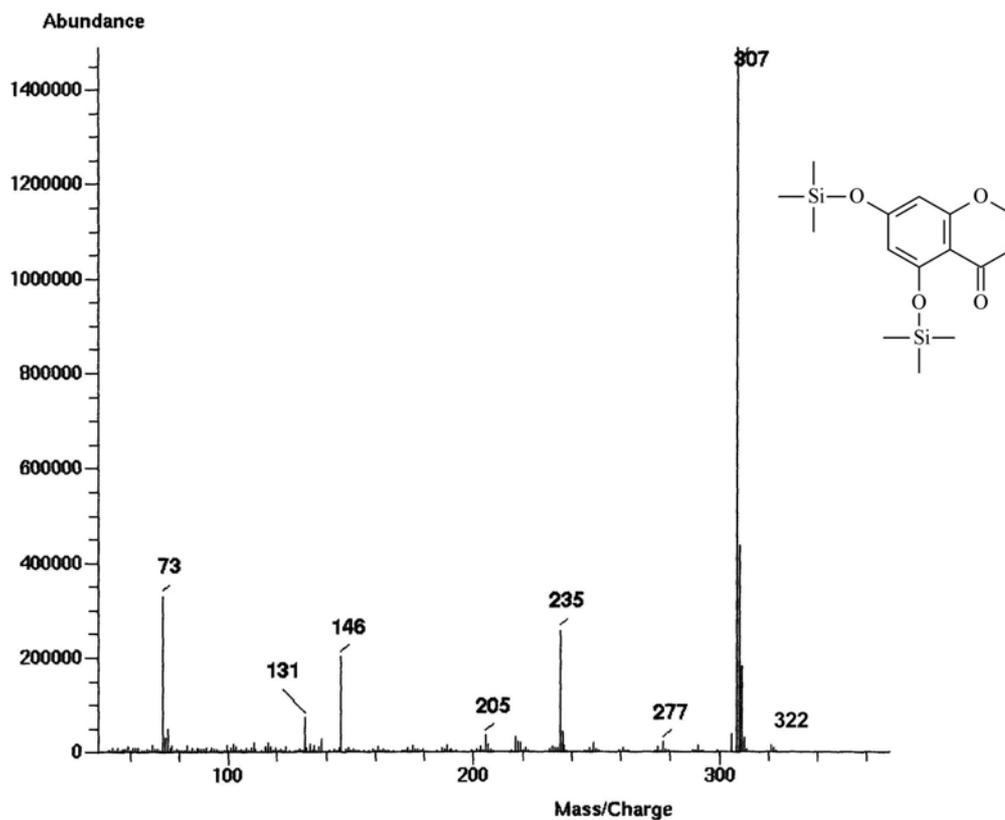


Abbildung 2-14: GC-Massenspektrum von 5,7-Dihydroxychromen-4-on-TMS nach Derivatisierung mit BSTFA

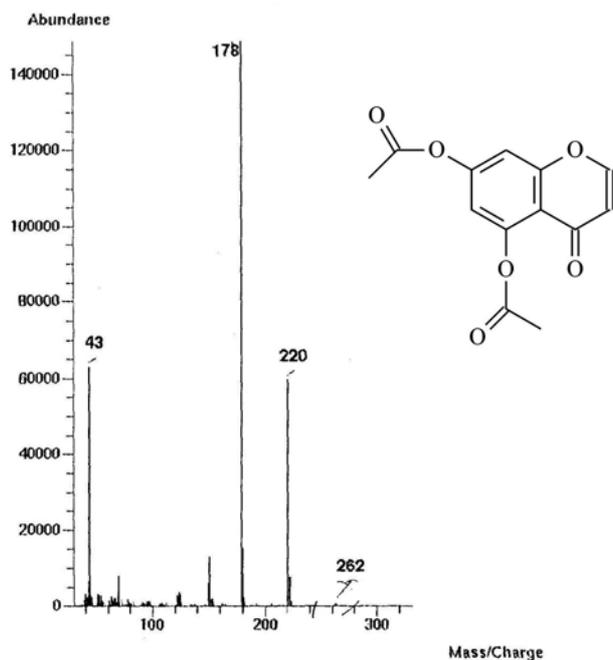


Abbildung 2-15: GC-Massenspektrum von 5,7-Dihydroxychromen-4-on nach Acetylierung mit Essigsäureanhydrid

2.4.1.3 Identifizierung von nicht Lignin relevanten monomeren Inhaltsstoffen

Folgende Verbindungen konnten im Gesamtethylacetatextrakt von Erdnussschalenpulver nach Fraktionierung mittels präparativer HPLC und Derivatisierung der Fraktionen mit BSTFA bzw. BSA als Trimethylsilylderivate mittels GC-MS nachgewiesen werden:

- β -Sitosterin
- 5-Hydroxymethyl-2-fufural (HMF)
- Stearinsäure
- Ölsäure
- Linolsäure
- Bernsteinsäure

Die Identifizierung erfolgte über die Massenspektren durch Vergleich mit Massenspektren aus Spektrenbibliotheken. 5-Hydroxymethyl-2-fufural wurde als originäre Standardverbindung zur Identifizierung herangezogen.

2.4.1.4 Quantifizierung der identifizierten Inhaltsstoffe in Erdnussschalen

Die Gehalte der identifizierten Inhaltsstoffe wurden bei HPLC-UV-Bestimmungen mittels externer Kalibration mit Standardverbindungen bzw. relativ bezogen auf den Internen Standard (Trolox) nach Derivatisierung mit BSTFA bei den GC-Untersuchungen bestimmt. Die Gehaltsbestimmung erfolgte sowohl in Extrakten der Erdnussschalen, des wässrigen Filtrates (Inkubation ohne Pilz), als auch in Extrakten der Filtrerrückstände (Inkubation ohne Pilz). Da es sich bei den eingesetzten Erdnussschalen um ein technologisch behandeltes Naturprodukt handelte und die ermittelten Gehalte Schwankungen unterlagen, wurde für jeden Versuchsansatz bzw. bei jeder neuen Charge die Gehaltsbestimmung erneut durchgeführt und für die Bilanzierung berücksichtigt. Die in Tabelle 2-10 aufgeführten Gehalte sind Durchschnittswerte aus sämtlichen Bestimmungen.

Tabelle 2-10: Gehaltsangaben der monomeren Inhaltsstoffe in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ unbehandeltem Erdnussschalenpulver

Inhaltsstoff	Filtrat	Filterrückstand	Gesamtextrakt	Quantifizierung
3,4-Dihydroxybenzoesäure	n.b.	n.b.	$22,1 \pm 2,3$	GC
3,4-Dimethoxybenzoesäure	n.b.	n.b.	$18,4 \pm 5,7$	GC
4-Hydroxybenzoesäure	14	n.b.	$14 \pm 3,4$	GC
5,7-Dihydroxychromen-4-on	99,7	22,2	$121,9 \pm 20,1$	GC
5-Hydroxymethyl-2-fufural	20	n.w.	$20 \pm 12,2$	GC
Acetovanillon	n.b.	n.b.	$16,1 \pm 6,2$	GC
Benzoesäure	4	n.w.	4 ± 2	GC
Coniferylalkohol	n.b.	n.b.	$15,3 \pm 5,3$	GC
Eriodictyol	82,6	524,9	$607,5 \pm 49,2$	GC, HPLC
Ferulasäure	3,7	n.w.	$3,7 \pm 3,2$	GC
Hydroxyacetophenon	n.b.	n.b.	$12,7 \pm 1,9$	GC
Kaffeesäure	4,8	n.w.	$4,8 \pm 4,3$	GC
Luteolin	< 25	831,5	$831,5 \pm 67,2$	GC, HPLC
m-Methoxyzimtsäure	26,9	2,1	$29 \pm 3,6$	GC
p-Anissäure	n.b.	n.b.	$17,3 \pm 5,2$	GC
p-Cumarsäure	n.b.	n.b.	$14,5 \pm 3,2$	GC
p-Hydroxybenzaldehyd	4,2	n.w.	$4,2 \pm 1,4$	GC
Syringaaldehyd	n.b.	n.b.	$13,2 \pm 3,7$	GC
Syringasäure	n.b.	n.b.	$17,8 \pm 4,2$	GC
Vanillin	44,6	11,6	$56,2 \pm 5,2$	GC, HPLC
Vanillinsäure	18,1	6,3	$24,4 \pm 8,9$	GC, HPLC

Die Bestimmungsgrenze (HPLC bei 280 nm) von Luteolin im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums wurde über die 6fache Standardabweichung des Blindwertes abgeschätzt und betrug $25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen.

Abbildung 2-16 zeigt ein HPLC-Chromatogramm des Gesamtethylacetatextraktes von BW Erdnussschalenpulver (unbehandelt). Eine Auflistung der Peakzuordnung befindet sich im Anhang (Tabelle 6-1).

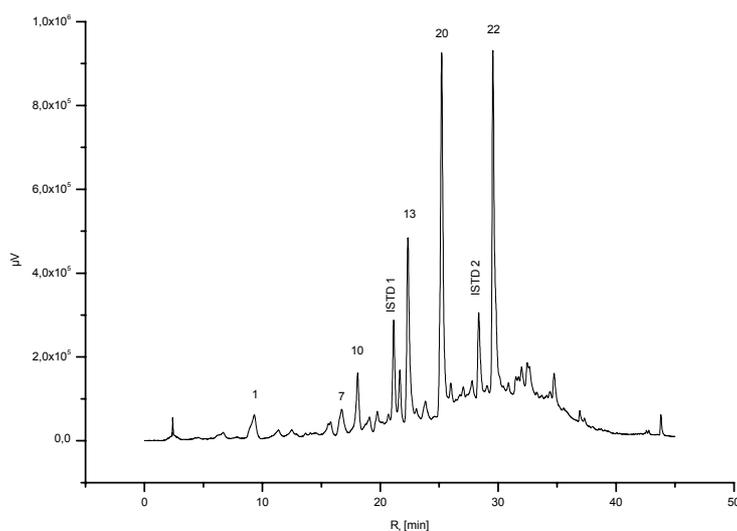


Abbildung 2-16: HPLC-Chromatogramm BW Erdnussschalenpulver, mit 1: unbekannte Verbindung, 7: Vanillinsäure, 10: Vanillin, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 20: Eriodictyol und 22: Luteolin

2.4.1.5 Bestimmung von Inhaltsstoffen in vorbehandelten Erdnussschalen

In den nach 4.6.4.2 vorbehandelten Erdnussschalen konnten folgende Inhaltsstoffe nach 24 h Agitation (100 rpm, 24 °C) in stickstoffarmer Nährlösung im Gesamtethylacetatextrakt (Filtrat mit Filtrerrückstand) per HPLC-DAD bestimmt werden (siehe Tabelle 2-11). Nach einer Inkubation des vorbehandelten Erdnussschalenpulvers mit Xylanase, α -Amylase und Amyloglucosidase (siehe 4.7.3.7), um Lignin und phenolische Bestandteile besser zugänglich zu machen, konnte eine Gehaltssteigerung der Inhaltsstoffe Luteolin, Eriodictyol und Vanillin festgestellt werden. Die Gehaltsangaben ohne und mit Enzymbehandlungsschritt werden in Tabelle 2-11 zusammengefasst.

Tabelle 2-11: Gehaltsangaben der monomeren Inhaltsstoffe in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ vorbehandeltem Erdnussschalenpulver ohne und mit Enzymzusatz

Inhaltsstoff	Gehalt ohne Enzymzusatz	Gehalt mit Enzymzusatz
Vanillin	7,3	24,7
Vanillinsäure	n.w.	n.w.
Eriodictyol	78,4	212,8
Luteolin	127,6	407,8

Die Behandlung mit den Enzymen (Xylanase, α -Amylase und Amyloglucosidase) zeigt deutlich, dass die Ausbeute an den Flavonoiden Eriodictyol und Luteolin um 170% bzw. 220% gesteigert werden konnte. Für Vanillin lag die Steigerung bei 240%.

2.4.2 Bilanzierung der Hauptinhaltsstoffe der Erdnussschalen beim Abbau durch *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus*

Je nach eingesetzter Kultivierungstechnik erfolgte ein unterschiedlicher Abbau der Hauptinhaltsstoffe (Vanillin, Vanillinsäure, 5,7-Dihydroxychromen-4-on, Eriodictyol und Luteolin) in Erdnussschalenpulver. Die Form der Verfügbarkeit der Inhaltsstoffe war wesentlich für die Abbaugeschwindigkeit (Kultivierung mit Erdnussschalenpulver und Erdnussschalenextrakt). Eine getrennte Untersuchung der Inhaltsstoffe im Kulturmedium und im Filtrerrückstand zeigte, dass die wasserlöslichen Bestandteile bevorzugt abgebaut worden sind (siehe Anhang, 6.4).

Es lag folgende Abbauaffinität der Hauptinhaltsstoffe von Erdnussschalen durch *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* vor:

Vanillin und Vanillinsäure > Eriodictyol > Luteolin >> 5,7-Dihydroxychromen-4-on

In Tabelle 2-12 ist eine Bilanzierung der Hauptinhaltsstoffe bei verschiedenen Kultivierungsmethoden von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* zusammengefasst.

Tabelle 2-12: Resumee zum Abbau von Erdnussschalenmehl durch *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina*

Mikroorganismus	Kultivierungsmethode	Abbau der monomeren, aromatischen Verbindungen	Abbau der Flavonoide			Abbauprodukte
			C	E	L	
<i>Pleurotus sapidus</i>	Dynamisch ¹	+	O	O	O	I
	statisch-dynamisch ¹	++	O	O	O	II
	mit vorbehandelten Erdnussschalen	++	+	+	O	I
<i>Pleurotus sapidus</i>	mit vorbehandelten Erdnussschalen plus Enzymzusatz	++	+	+	+	O
	mit Erdnussschalenextrakt	+++	++	+++	+++	I
<i>Lepista irina</i>	statisch-dynamisch	+	O/-	O	O	II
	mit vorbehandelten Erdnussschalen	O	O	O	O	O
	mit vorbehandelten Erdnussschalen plus Enzymzusatz	+/O	+/O	+/O	O	I
	mit Erdnussschalenextrakt	+++	++	+++	+++	III

Erläuterung zur Tabelle 2-12:

1: Es wurde eine getrennte Untersuchung von Kulturmedium und Filtrerrückstand durchgeführt.

Abbau der monomeren, aromatischen Verbindungen²:

Abbau +++ nach 24 h war der Abbau größer als 90%
 Abbau ++ nach 7 Tagen war der Abbau größer als 90%
 Abbau + nach 14 Tagen war der Abbau größer als 90%
 Abbau O zu Ende der Kultivierung waren noch mindestens 10% nachweisbar

Abbau der Flavonoide:

C: 5,7-Dihydroxychromen-4-on
 E: Eriodictyol
 L: Luteolin
 Abbau +++ nach 24 h war der Abbau größer als 90%
 Abbau ++ nach 5 Tagen war der Abbau größer als 90%
 Abbau + nach 10 Tagen war der Abbau größer als 90%
 Abbau O zu Ende der Kultivierung waren noch mindestens 10% nachweisbar

Abbauprodukte:

I 1 bis 2 Abbauprodukte nachweisbar
 II 3 bis 8 Abbauprodukte nachweisbar
 III 9 bis 12 Abbauprodukte nachweisbar
 O keine Abbauprodukte nachweisbar

2.5 Identifizierung von Abbauprodukten

Im Verlauf der Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* kam es beim Abbau der Erdnussschalen zu temporär auftretenden Abbauprodukten. Eine Auflistung der HPLC-Peaks (Abbauprodukte und Erdnussschaleninhaltsstoffe) befindet sich im Anhang (Tabelle 6-1).

² Vanillin und Vanillinsäure

2.5.1 Identifizierung und Quantifizierung von p-Methoxybenzaldehyd in Kulturen von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina*

Bei sämtlichen Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* konnte p-Methoxybenzaldehyd mittels HPLC und GC-MS nachgewiesen werden. Es handelt sich bei p-Methoxybenzaldehyd um einen *De-novo*-Metaboliten von *Pleurotus sapidus*.

Bei den Kultivierungen von *Lepista irina* in Gegenwart von Erdnussschalpulver und -extrakt konnte im Verlauf der Kultivierung ebenfalls p-Methoxybenzaldehyd nachgewiesen werden. In den entsprechenden Kontrollkulturen von *Lepista irina* allein (BW *Lepista irina*) konnte p-Methoxybenzaldehyd nicht nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze von p-Methoxybenzaldehyd in Extrakten von *Lepista irina* wurde mittels Verfahren der Standardaddition ermittelt (Funk et al.; 1992) und betrug $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Kulturmedium.

Die Kultivierungstechniken wirkten sich auf den Gehalt von p-Methoxybenzaldehyd im Kulturmedium aus (siehe Tabelle 2-13).

Tabelle 2-13: Gehalte des *De-novo*-Metaboliten p-Methoxybenzaldehyd im Kulturmedium der verschiedenen Kultivierungsbedingungen

Kultivierung	Gehalt p-Methoxybenzaldehyd [$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$]
PSA dynamisch	4,0 (7. d)
PSA statisch-dynamisch	2,4 (7. d)
PSA mit vorbehandelten Erdnussschalen	2,1 (28. d)
PSA mit vorbehandelten Erdnussschalen mit Enzymzusatz	2,3 (8. d)
PSA mit Erdnussschalenextrakt	7,6 (7. d)
BW PSA	maximal 3,2
LIR statisch-dynamisch	2,1 (8. d)
LIR mit vorbehandelten Erdnussschalen	0,8 (17. d)
LIR mit vorbehandelten Erdnussschalen mit Enzymzusatz	1,2 (19. d)
LIR mit Erdnussschalenextrakt	2,3 (11. d)
BW LIR	n.w.

d: Kulturtag

2.5.2 Abbauprodukte bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus*

Im Verlauf der dynamischen Kultivierung von *Pleurotus sapidus* konnte im Kulturmedium lediglich 2,5-Furandicarbonsäure als Abbauprodukt nachgewiesen werden (Massenspektrum siehe Anhang, Abbildung 6-7). Der Gehalt betrug am 21. Kulturtag $30,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen. HMF war im Kulturmedium von *Pleurotus sapidus* mit Erdnussschalen nicht mehr nachweisbar im Gegensatz zu BW Erdnussschalen (siehe 2.4.1.3). Des Weiteren konnten folgende Verbindungen aus der Tabelle 2-9 nachgewiesen werden: Vanillin, Vanillinsäure und m-Methoxyzimtsäure. Die Abbaurate betrug je nach Kulturzeitpunkt und Verbindung zwischen 70% (7. Kulturtag) und 100% (28. Kulturtag).

Im Filtrerrückstand konnte nach Silylierung ein nicht näher identifiziertes Abbauprodukt per GC-MS nachgewiesen werden (siehe Abbildung 2-17). Das Massenfragment 73 deutet auf eine derivatisierbare funktionelle Gruppe hin. Es wurde ein Gehalt von bis zu $170 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen nachgewiesen (berechnet als TMS-Derivat).

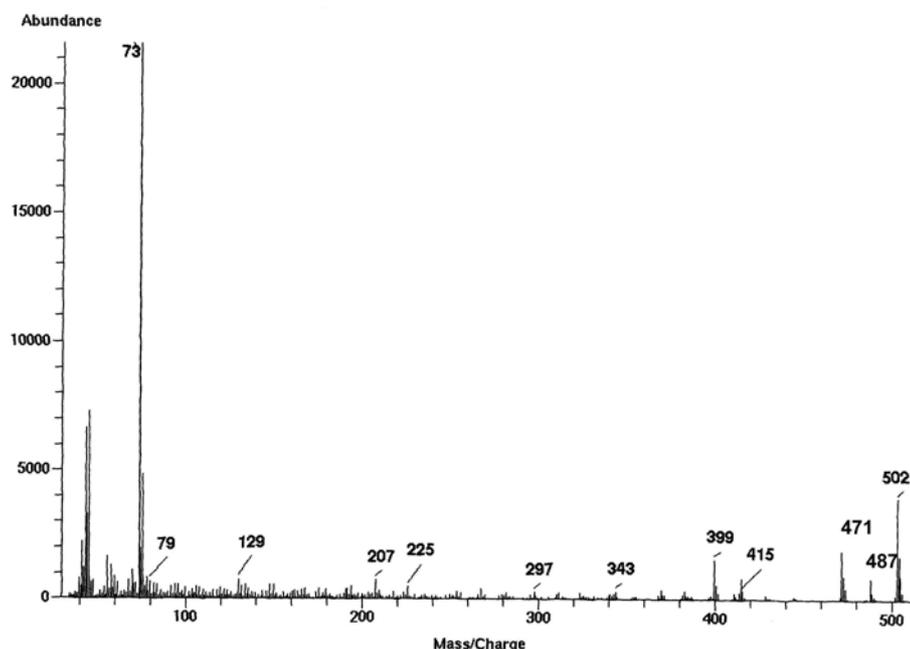


Abbildung 2-17: GC-Massenspektrum eines Ligninabbauproduktes (TMS-Derivat): dynamische Kultivierung von PSA mit Erdnussschalenpulver (unbehandelt)

Durch einen engen Mycel-Substrat-Kontakt konnte bei den statisch-dynamischen Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* mit unbehandeltem Erdnussschalpulver neben höheren lignolytischen Aktivitäten– im Vergleich zu dynamischen Kulturen (Tabelle 2-5) – auch eine höhere Anzahl an Abbauprodukten detektiert werden. Die Ethylacetatextrakte des Kulturmediums und des Filtrerrückstands vom 7. Kulturtag wurden vereint und mittels präparativer HPLC an einer RP-18-Phase fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden per HPLC-DAD und GC-MS untersucht. Durch den Vergleich mit entsprechenden Fraktionen von BW Erdnussschalen und BW *Pleurotus sapidus* konnten bei dieser Kulturführung im Gegensatz zum rein dynamischen Ansatz eine Reihe von Abbauprodukten nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2-14). Das Fraktionierungsprotokoll des Gesamtextraktes *Pleurotus sapidus* mit Erdnussschalen ist im Anhang (siehe 6.3.2) aufgelistet.

Tabelle 2-14: Ligninabbauprodukte: Kultivierung von PSA mit Erdnussschalpulver; Bestimmung mittels GC-MS als TMS-Derivate

HPLC-Fraktion	Kováts-Index TMS-Derivate, DB 5	Molpeak m/z TMS-Derivat	Identifizierung	Verweis
B	1547	220	E-Zimtsäure	Abbildung 2-19
B	1425	198	--	Abbildung 2-20
D	n.b.	650	--	Abbildung 2-21
B	2165	484	Trihydroxymimtsäure	Abbildung 2-40
B	1764	310	3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	Abbildung 2-39

Die Identität von E-Zimtsäure und von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure konnte durch Standardsubstanzen anhand der chromatographischen Daten und des Massenspektrums bestätigt werden. Des Weiteren konnten m-Methoxymimtsäure und Vanillin nachgewiesen werden, die jedoch auch im BW Erdnussschalen nachgewiesen wurden (90% Abbau im Vergleich zu BW Erdnussschalen). Die geschätzte Menge an Ligninabbauprodukten über den gesamten Kulturverlauf betrug ca. 300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen.

Die Überprüfung der Fraktion B per HPLC-DAD zeigte bei R_t 18,17 min das Spektrum von Trihydroxymimtsäure (siehe Abbildung 2-18, Identifizierung siehe 2.5.4).

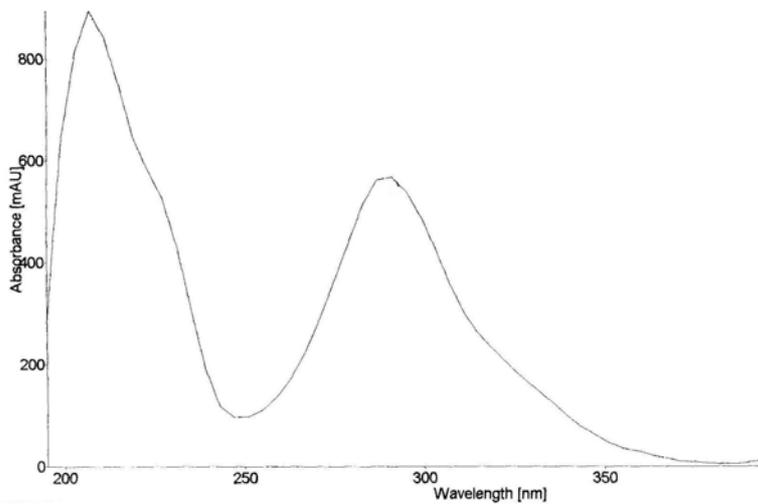


Abbildung 2-18: UV-Spektrum von Trihydroxycimtsäure, UV-Maximum mit λ_{max} bei 291 nm

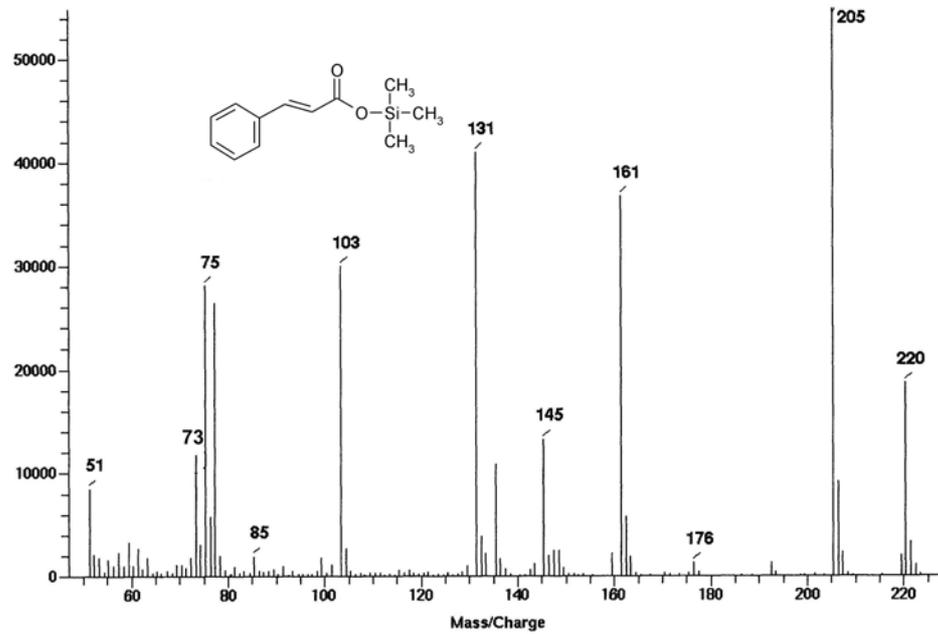


Abbildung 2-19: GC-Massenspektrum von Zimtsäure-TMS, Kováts Index 1547, Fraktion B

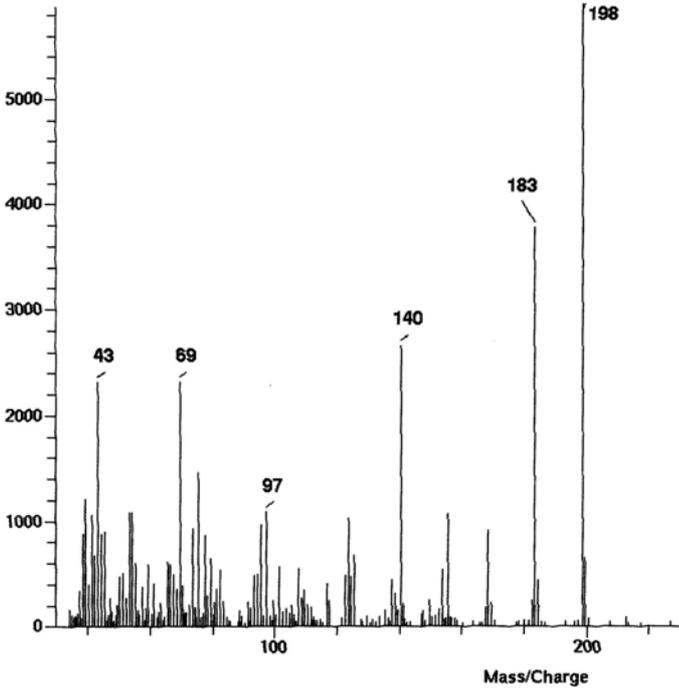


Abbildung 2-20: GC-Massenspektrum eines Ligninabbauproduktes (TMS-Derivat), Kováts Index 1425, Fraktion B

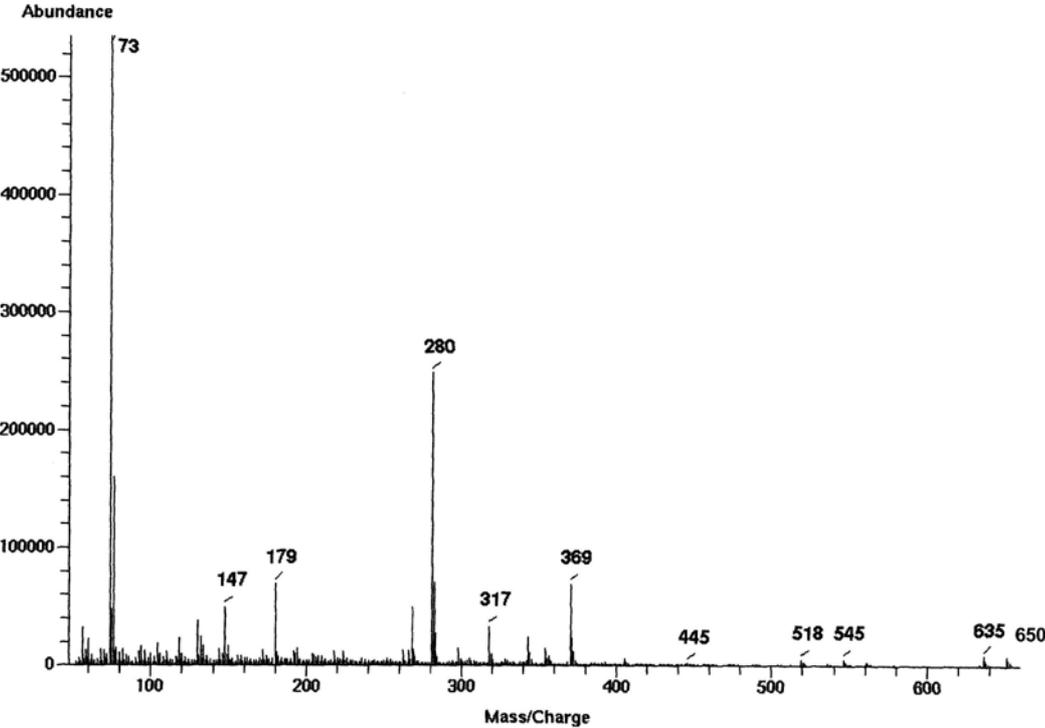


Abbildung 2-21: GC-Massenspektrum eines Ligninabbauproduktes (TMS-Derivat), Fraktion D

Das Fehlen von leicht zugänglichen phenolischen Verbindungen und Lignin, machten sich nicht nur in einer geringeren Laccase-Aktivität (Tabelle 2-5) bemerkbar, sondern auch in der geringeren Anzahl an Abbauprodukten im Vergleich zu den statisch-dynamischen Kultivierungen mit unbehandelten Erdnussschalen. Bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit vorbehandeltem Erdnussschalpulver und ohne Enzymzusatz konnte im Gesamtethylacetatextrakt (Kulturmedium mit Filtrerrückstand) ab dem 28. Kulturtag ein nicht näher identifiziertes Abbauprodukt nachgewiesen werden (HPLC-Chromatogramm siehe Abbildung 2-22, UV-Spektrum siehe Abbildung 2-23).

Pleurotus sapidus wurde ebenfalls auf vorbehandeltem Erdnussschalpulver und Enzymzusatz statisch-dynamisch kultiviert. Zu Beginn der dynamischen Phase erfolgte ein Zusatz von Xylanase, α -Amylase und Amyloglucosidase (um gebundenes Lignin besser aufzuschließen und zugänglich zu machen). Im Verlauf der Kultivierung konnte kein Abbauprodukt nachgewiesen werden.

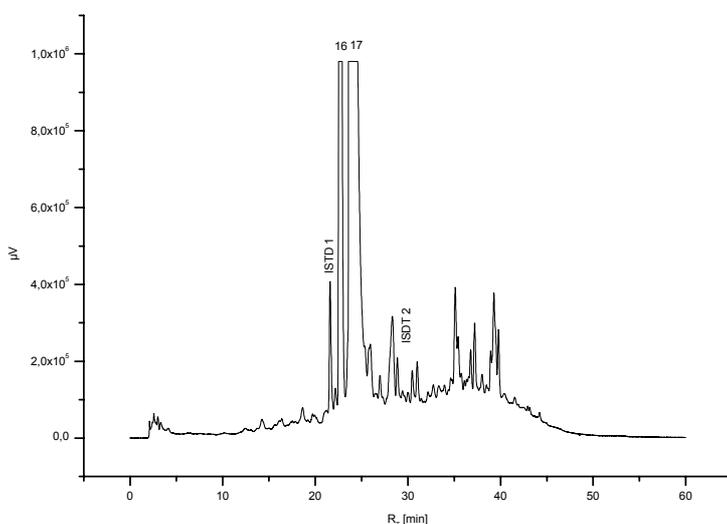


Abbildung 2-22: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von PSA mit vorbehandelten Erdnussschalen (28. Kulturtag), mit: 16: Ligninabbauprodukt, 17:p-Methoxybenzaldehyd

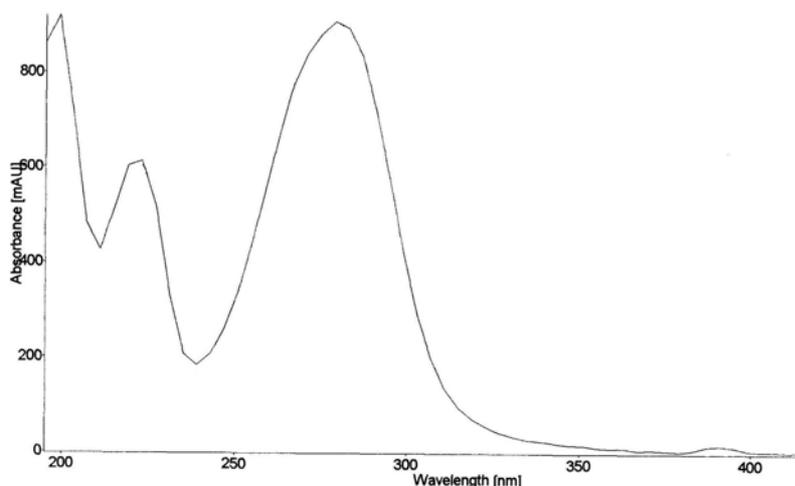


Abbildung 2-23: UV-Spektrum (HPLC-DAD) Peak Nummer 16 bei 22,35 min mit λ_{\max} bei 279 nm, 28. Kulturtag

Die einfache Bioverfügbarkeit von phenolischen Verbindungen und von Lignin durch einen ethanolischen Erdnussschalenextrakt, bewirkte eine schnelle Degradation dieser Inhaltsstoffe. Bei der Zugabe eines ethanolischen Erdnussschalenextraktes zu einer Kultur von *Pleurotus sapidus* erfolgte eine sofortige Aufnahme des farbigen Extraktes (braun bis orangefarben-gelblich) in das Pilzmycel. Bei den darauf folgenden Probenahmen zeigte sich, dass das Mycel dunkler gefärbt war als die entsprechenden Kontrollkulturen BW *Pleurotus sapidus*. Auch durch eine Ethylacetatextraktion des Mycels war eine vollständige Entfärbung nicht möglich. Für die Bilanzierungen im zeitlichen Verlauf der Kultivierungen wurden das Kulturmedium und der Filtrerrückstand (Mycel) mit Ethylacetat extrahiert. Bereits 5 h nach der Extraktzugabe konnte eine Abnahme der Konzentration von Eriodictyol, Luteolin und Vanillin beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde für Vanillinsäure und 5,7-Dihydroxychromen-4-on eine Zunahme nachgewiesen (Tabelle 2-15).

Tabelle 2-15: Bilanzierung der Inhaltsstoffe im Kulturmedium: PSA plus Extrakt (nach 5 h) vs. BW Extrakt, HPLC-Bestimmung, Inhaltsstoffe in $\mu\text{g}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$ Kulturmedium

Verbindung	PSA + Extrakt, 5 h nach Zugabe	BW Erdnussschalenextrakt nach 5 h	Abnahme gegenüber BW Extrakt
Vanillin	117	395	70%
Vanillinsäure	153	64	Zunahme um 139%
5,7-Dihydroxy- chroman	n.b.	n.b.	Zunahme um 28% ³
Eriodictyol	1417	1786	21%
Luteolin	1785	2130	16%

Bei der Bestimmung des 5,7-Dihydroxychromen-4-on-Gehaltes zeigte sich bereits am 2. Kulturtag nach der Substratzugabe ein Abbau von 90%; nach dem 4. Kulturtag war 5,7-Dihydroxychromen-4-on vollständig abgebaut.

24 h nach der Extraktzugabe war Trihydroxymitsäure nachweisbar, konnte jedoch bereits am 2. Kulturtag nicht mehr nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde ab dem 1. Kulturtag per HPLC-DAD ein weiteres Abbauprodukt nachgewiesen (Peak Nummer 16 R_t 22,35 min, UV-Maximum bei 279 nm, siehe Abbildung 2-23). Abbildung 2-24 bis Abbildung 2-26 zeigen den Abbauprozess des Erdnussschalenextraktes.

³ Es erfolgte eine Abschätzung anhand der Peak-Flächenwerte der HPLC-Bestimmungen

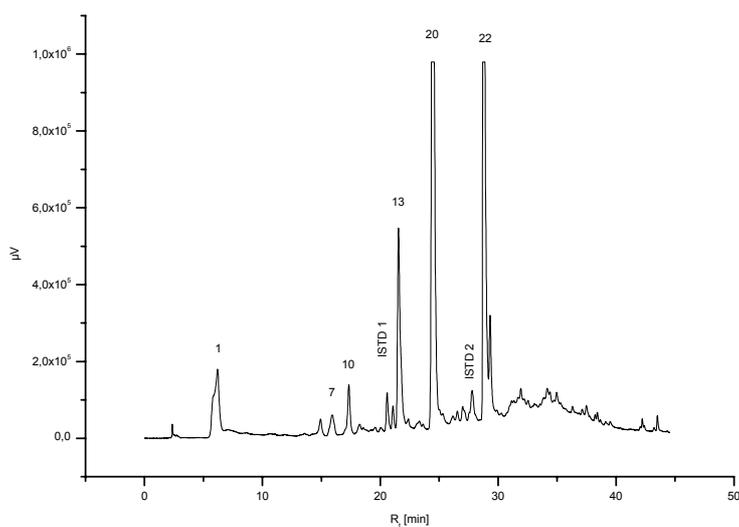


Abbildung 2-24: HPLC-Chromatogramm BW Erdnussschalenextrakt, mit 1: unbekannte Verbindung, 7: Vanillinsäure, 10: Vanillin, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 20: Eriodictyol und 22: Luteolin

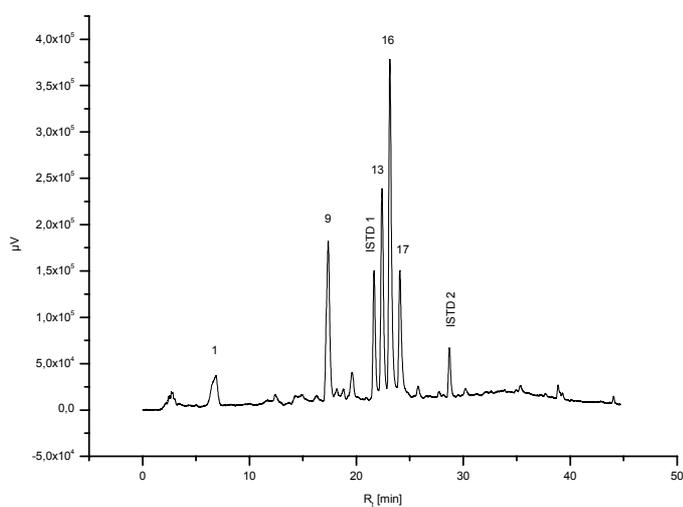


Abbildung 2-25: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von PSA mit Erdnussschalenextrakt (24 h nach der Extraktzugabe), mit 1: unbekannte Verbindung, 9: Trihydroxyzimtsäure, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 16: Ligninabbauprodukt, 17: p-Methoxybenzaldehyd

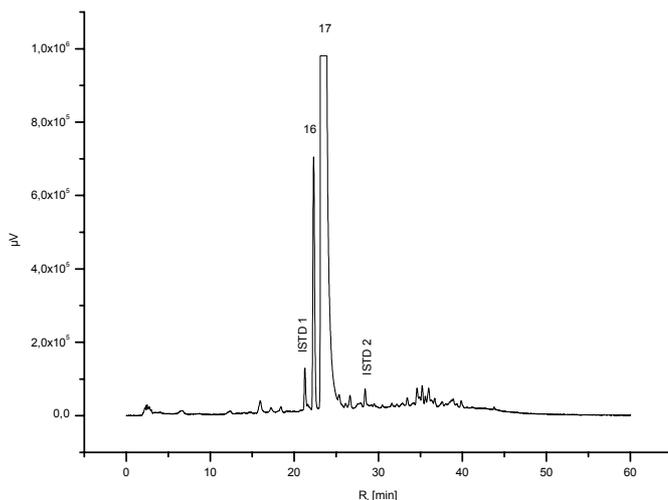


Abbildung 2-26: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von PSA mit Erdnussschalenextrakt (7. Kulturtag nach der Extraktzugabe), mit 16: Ligninabbauprodukt und 17: p-Methoxybenzaldehyd

2.5.3 Abbauprodukte bei den Kultivierungen von *Lepista irina*

Lepista irina zeichnete sich gegenüber *Pleurotus sapidus* durch ein weniger stark ausgeprägte Abbaurate (Abbaugeschwindigkeit) aus. Im Gegenzug dazu war die Anzahl der detektierbaren Abbauprodukte größer als bei *Pleurotus sapidus*.

Bei der statisch-dynamischen Kultivierung von *Lepista irina* mit Erdnussschalenspulver konnte gegen Ende der Kultivierung (17. Kulturtag, submers) eine Reihe von Abbauprodukten per HPLC nachgewiesen werden. Sämtliche Produkte (siehe Abbildung 2-27) wiesen UV-Spektren eines substituierten Aromaten auf. Die UV-Maxima lagen zwischen 260 und 291 nm. Es erfolgte keine nähere Identifizierung.

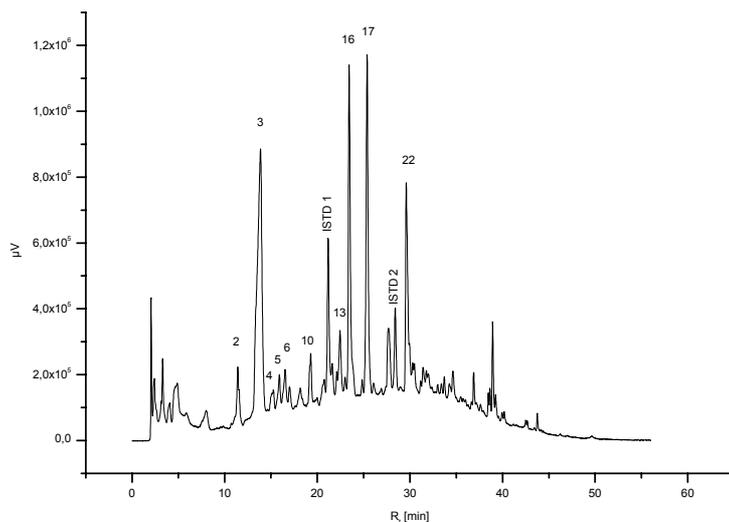


Abbildung 2-27: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von LIR mit Erdnussschalenpulver (17. Kulturtag), mit 2 bis 6 und 16: Ligninabbauprodukte, 10: Vanillin, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 17: p-Methoxybenzaldehyd und 22: Luteolin

Der Gesamtextrakt vom 3. und 17. Kulturtag wurde mittels präparativer HPLC an einer RP-18-Phase fraktioniert und per GC-MS auf das Auftreten neuer Verbindungen hin untersucht. Das Fraktionierungsprotokoll ist im Anhang aufgelistet (siehe 6.3.3). Die Fraktionen wurden entsprechend 4.12.1 aufgearbeitet und nach Derivatisierung mit BSTFA per GC-FID und GC-MS analysiert.

Es wurden entsprechende Kontrollproben, BW Erdnussschalen und BW *Lepista irina*, fraktioniert und per GC-FID und GC-MS untersucht. In Tabelle 2-16 sind die durch Vergleich ermittelten Abbauprodukte aus der Kultivierung von *Lepista irina* mit Erdnussschalen aufgelistet.

Tabelle 2-16: Ligninabbauprodukte: Kultivierung von LIR mit Erdnussschalpulver; Bestimmung mittels GC-MS als TMS-Derivate

HPLC-Fraktion	Kováts-Index TMS-Derivate, DB 5	Molpeak, TMS-Derivat	Identifizierung
3. Kulturtag, Fraktion B	1664	300	2,5-Furandicarbonsäure ⁴
3. Kulturtag, Fraktion D	1295	208	--, siehe Anhang
3. Kulturtag, Fraktion C	1439	212	--, siehe Anhang
3. und 17. Kulturtag, Fraktion C	2144	384	3,4,5-Trihydroxymzimtsäure ⁵
3. Kulturtag, Fraktion B	n.b.	555 570 fehlt	--, siehe Anhang

Bei allen in der Tabelle 2-16 aufgeführten Verbindungen liegt mindestens eine silylierbare funktionelle Gruppe vor. Ein Vergleich der Retentionszeiten und der Massenspektren mit denen von Standardverbindungen (siehe 4.2) sowie Massenspektren chemischer Ligninabbauprodukte bei Niemelä (1990) zeigten keine Übereinstimmung.

In der HPLC-Fraktion D vom 3. und vom 17. Kulturtag konnten Benzoesäure, Vanillin und p-Hydroxybenzaldehyd nachgewiesen werden. Diese Verbindungen konnten auch im Kontrollwert BW Erdnussschalen nachgewiesen werden. Die geschätzte Menge an Ligninabbauprodukten über den gesamten Kulturverlauf betrug ca. 700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen.

Die Fraktion A vom 17. Kulturtag (Abbildung 2-28) wurde mittels HPLC mit UV-Detektion und HPLC-MS im negativen ESI-Modus analysiert. Das Abbauprodukt wies ein UV-Maximum von 271 nm auf (siehe Abbildung 2-29).

⁴ siehe auch bei den Abbauprodukten von PSA

⁵ siehe auch bei den Abbauprodukten von PSA und LIR + Extrakt

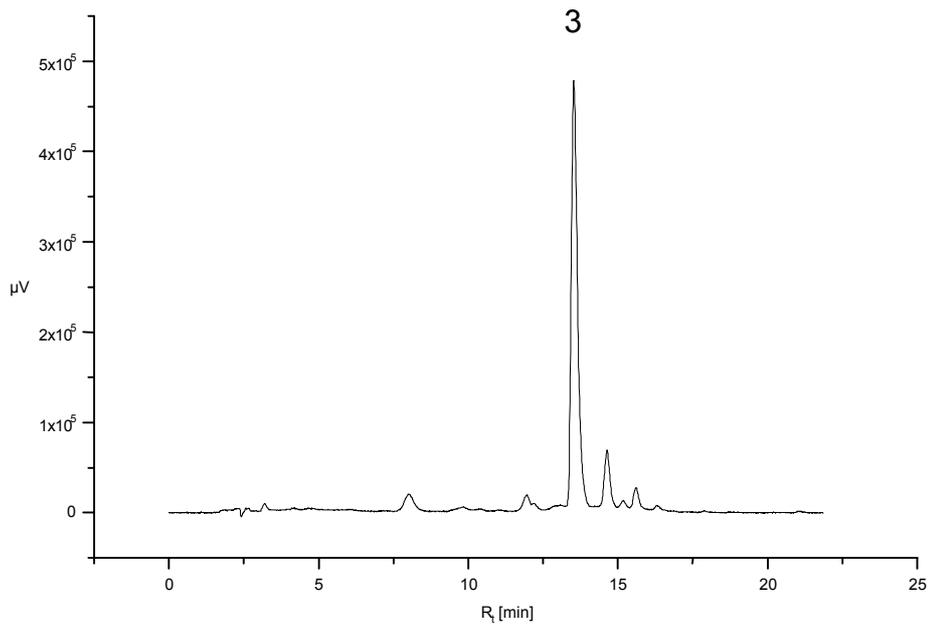


Abbildung 2-28: HPLC-Chromatogramm (280 nm) der Fraktion A (Peak Nummer 3) vom 17. Kulturtag

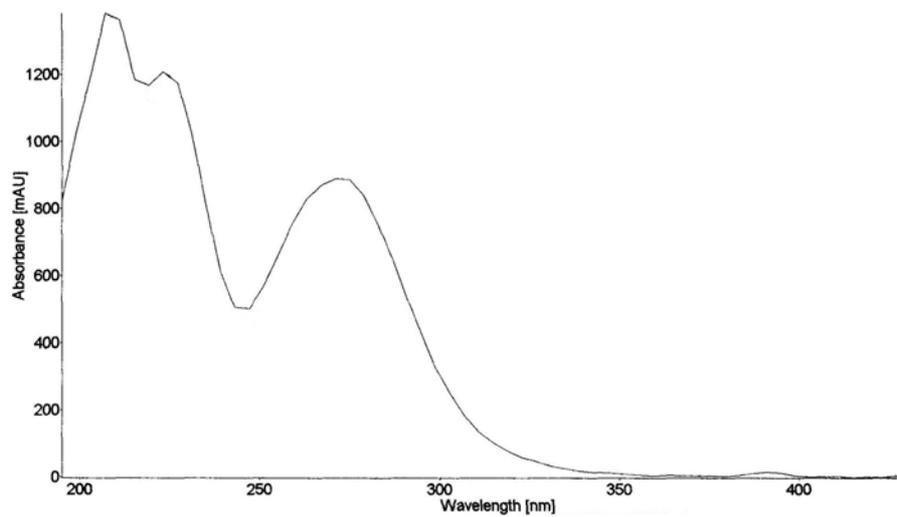


Abbildung 2-29: UV-Spektrum Peak Nummer 3 mit λ_{max} bei 271 nm

Die HPLC-MS ergab eine exakte Masse von 339,2301 u. Die Vorschläge für eine dazugehörige Summenformel und DBE sind in Tabelle 2-17 aufgelistet. Da das Vorkommen von Stickstoff in den Abbauprodukten als unwahrscheinlich angesehen wird, kommt nur eine Summenformel $C_{23}H_{32}O_2$ in Betracht. Da das hochaufgelöste Spektrum im negativen ESI-Modus aufgenommen worden ist, liegt die nominale Masse der Verbindung bei 340 u. Einschränkungen und Voraussetzungen zur Ermittlung der Summenformel aus der hochaufgelösten Masse sind in 4.12.3.4 aufgelistet.

Tabelle 2-17: Vorschläge für Summenformel und DBE für die exakte Masse 339,2301 u

Mögliche Summenformel	DBE	Massenabweichung [ppm] ⁶
$C_{21}H_{29}N_3O$	8,5	-2,8
$C_{18}H_{31}N_2O_4$	4	5,1
$C_{23}H_{31}O_2$	8	-6,8

Eine GC-MS-Untersuchung der Fraktion A vom 17. Kulturtag ergab keine zusätzlichen Hinweise auf die Identität der Verbindung, da keine Verbindung mit entsprechender Molmasse detektiert werden konnte. Mit der Annahme, dass im Molekül eine oder mehrere derivatisierbare Gruppen vorliegen, wurde die GC-MS-Untersuchung der Fraktion zur Steigerung der Empfindlichkeit im Single Ion Monitoring (SIM-Modus) gezielt nach den Massenspuren 340 (keine silylierbare Gruppe liegt vor), 412 (eine silylierbare Gruppe, $340 + 1 \times 72$) und 484 (zwei silylierbare Gruppen, $340 + 2 \times 72$) wiederholt. Ebenso wurde nach den aufgeführten Massenspuren abzüglich der Masse 15 (Abspaltung einer Methylgruppe) gesucht. Keine der verwendeten Massenspuren ließ sich dem GC-MS-Chromatogramm zuordnen. Das Abbauprodukt wurde nicht weiter identifiziert.

Wie auch bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* zeigte sich, dass durch eine geringere Bioverfügbarkeit von phenolischen Verbindungen und von Lignin entsprechend weniger Abbauprodukte gebildet worden sind.

⁶ Massenabweichung der berechneten ermittelten hochaufgelösten Massen von der theoretischen Masse

Bei den statisch-dynamischen Kultivierungen von *Lepista irina* mit vorbehandeltem Erdnussschalpulver konnte lediglich p-Methoxybenzaldehyd als Abbauprodukt des Ligninabbaus nachgewiesen werden (siehe Diskussion).

Lepista irina wurde auf vorbehandeltem Erdnussschalpulver statisch-dynamisch kultiviert. Zu Beginn der dynamischen Phase erfolgte ein Zusatz von Xylanase, α -Amylase und Amyloglucosidase. Zwei Abbauprodukte sowie p-Methoxybenzaldehyd konnten per HPLC-DAD nachgewiesen werden (siehe Diskussion):

- Peak Nummer 16, R_t 22,35 min, UV-Maximum bei 279 nm, siehe auch Abbildung 2-23
- Peak Nummer 3, R_t 13,35 min, UV-Maximum bei 271 nm, siehe auch Abbildung 2-29

Das HPLC-Chromatogramm vom 19. Kulturtag ist in Abbildung 2-30 dargestellt.

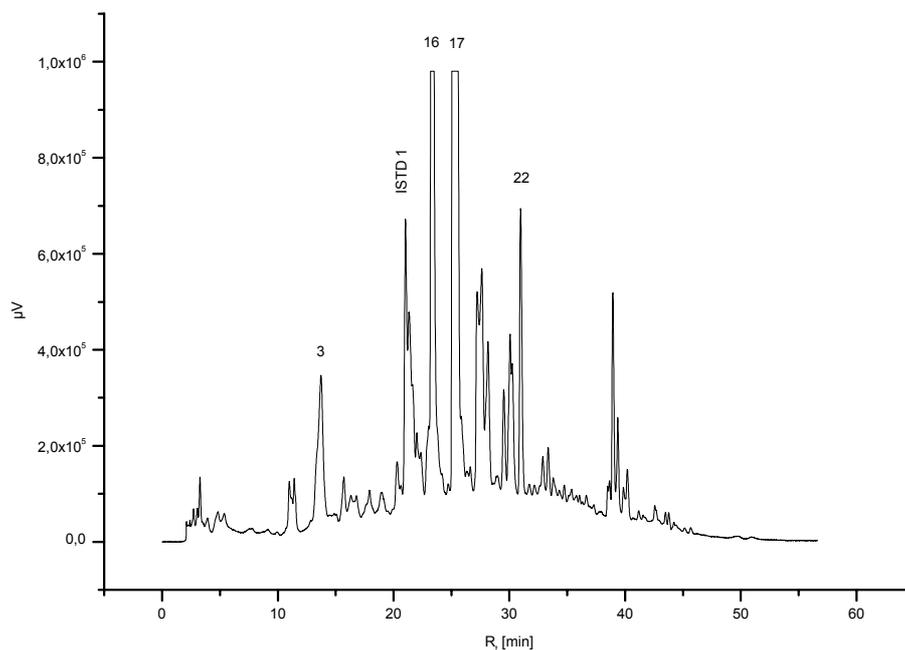


Abbildung 2-30: HPLC-Chromatogramm des Gesamt-Ethylacetatextraktes von LIR + vorbehandeltem Erdnussschalpulver mit Enzymzusatz (19. Kulturtag), mit 3 und 16: Ligninabbauprodukte, 17: p-Methoxybenzaldehyd und 22: Luteolin

Die leichte Bioverfügbarkeit von phenolischen Verbindungen und von Lignin machte sich in einer ausgeprägten Abbaudynamik bemerkbar.

Nach dreitägigem Anwachsen einer Submerskultur von *Lepista irina* erfolgte die Zugabe von ethanolischem Erdnussschalenextrakt. Es wurde ähnlich wie bei *Pleurotus sapidus* eine Aufnahme des Extraktes in das Mycel beobachtet. 24 h nach der Extraktzugabe konnten Abbauprodukte nachgewiesen werden. Im Verlauf der Kultivierung nahmen die Konzentrationen dieser Abbauprodukte wieder ab, dafür traten fünf neue Abbauprodukte auf, die mittels HPLC-DAD nachgewiesen wurden. Sämtliche Abbauprodukte wiesen charakteristische UV-Spektren substituierter Aromaten auf. Die UV-Maxima lagen zwischen 271 nm und 295 nm. Ab dem 11. Kulturtag nach der Substratzugabe war p-Methoxybenzaldehyd nachweisbar. Die Chromatogramme der Abbildung 2-31 bis Abbildung 2-34 unterstreichen die Dynamik des Abbauprozesses.

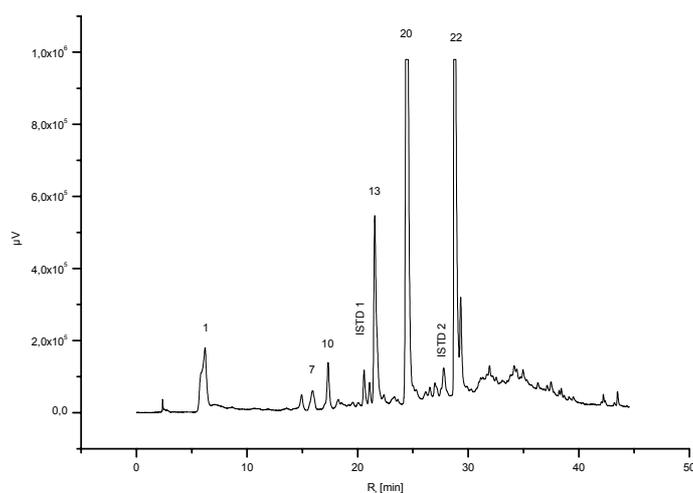


Abbildung 2-31: HPLC-Chromatogramm von BW Erdnussschalenextrakt, mit 1: unbekannte Verbindung, 7: Vanillinsäure, 10: Vanillin, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on, 20: Eriodictyol und 22: Luteolin

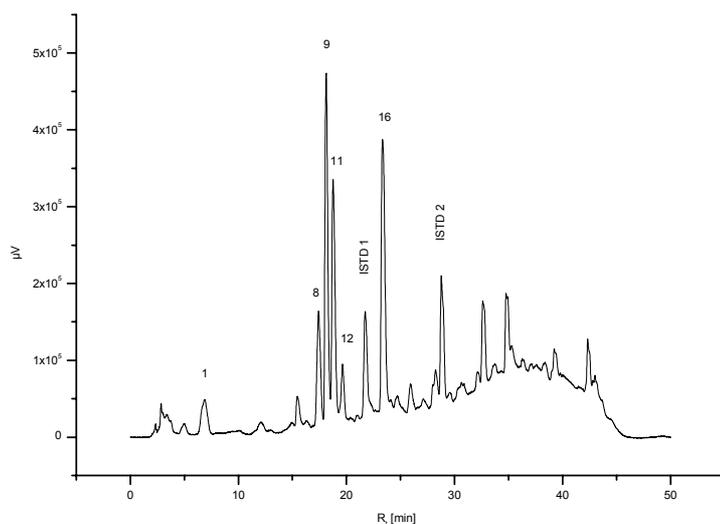


Abbildung 2-32: HPLC-Chromatogramm von LIR mit Erdnussschalenextrakt 24 h nach der Extraktzugabe, mit 1: unbekannte Verbindung, 8, 12, 16: Ligninabbauprodukte, 9: Z- und 11: E-Trihydroxycimtsäure

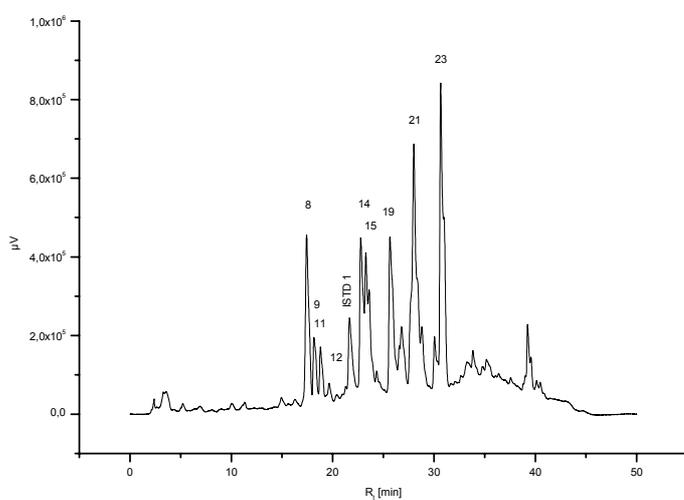


Abbildung 2-33: HPLC-Chromatogramm von LIR mit Erdnussschalenextrakt am 6. Kulturtag nach der Extraktzugabe, mit 8, 12, 14, 15, 19, 21 und 23: Ligninabbauprodukte, 9: Z- und 11: E-Trihydroxycimtsäure

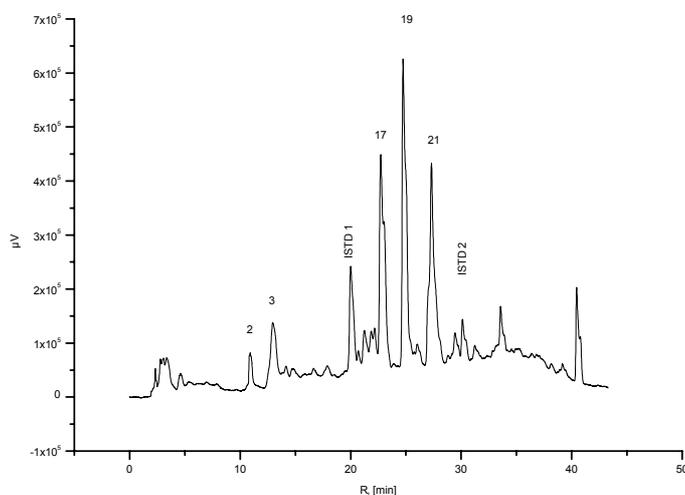


Abbildung 2-34: HPLC-Chromatogramm von LIR mit Erdnusschalenextrakt am 11. Kulturtag nach der Extraktzugabe, mit 2, 3, 19 und 21: Ligninabbauprodukte, 17: p-Methoxybenzaldehyd

Bei den neu gebildeten Verbindungen konnten E- und Z-Trihydroxymizimtsäure (Peak Nummer 9 und 11) nachgewiesen werden (Identifizierung siehe 2.5.4). Am 3. Kulturtag (nach der Extraktzugabe) wurde ein Trihydroxymizimtsäuregehalt von $110 \mu\text{g}\cdot(100 \text{ mL})^{-1}$ (GC-Bestimmung) nachgewiesen. Am ersten Kulturtag wurde der höchste Gehalt erreicht, ab dem 9. Kulturtag war Trihydroxymizimtsäure nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 2-35). Die Balken stellen die abgeschätzten Trihydroxymizimtsäuregehalte⁷ dar.

⁷ Abschätzung anhand der Peakflächenwerte der HPLC-Untersuchungen

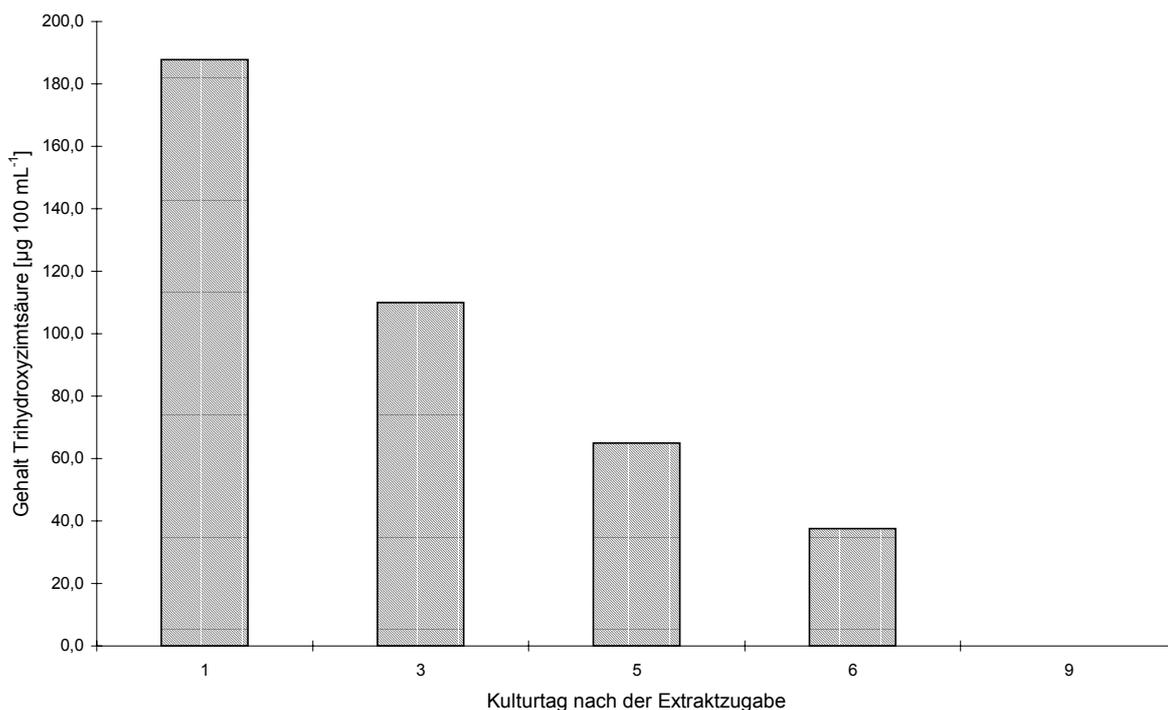


Abbildung 2-35: Trihydroxycinnamsäure-Abnahme: LIR mit Erdnussschalenextrakt

2.5.4 Fraktionierung und Identifizierung von Abbauprodukten aus der Kultivierung von *Lepista irina* mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt

Bei der Kultivierung von *Lepista irina* mit Erdnussschalenextrakt entstand im Verlauf der Kultivierung eine Reihe von Abbauprodukten. Einige dieser Verbindungen konnten auch bei anderen Kultivierungstechniken von *Lepista irina* gefunden werden, ebenso bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus*. Ein Extrakt von *Lepista irina* wurde per präparativer HPLC fraktioniert (siehe Abbildung 2-36).

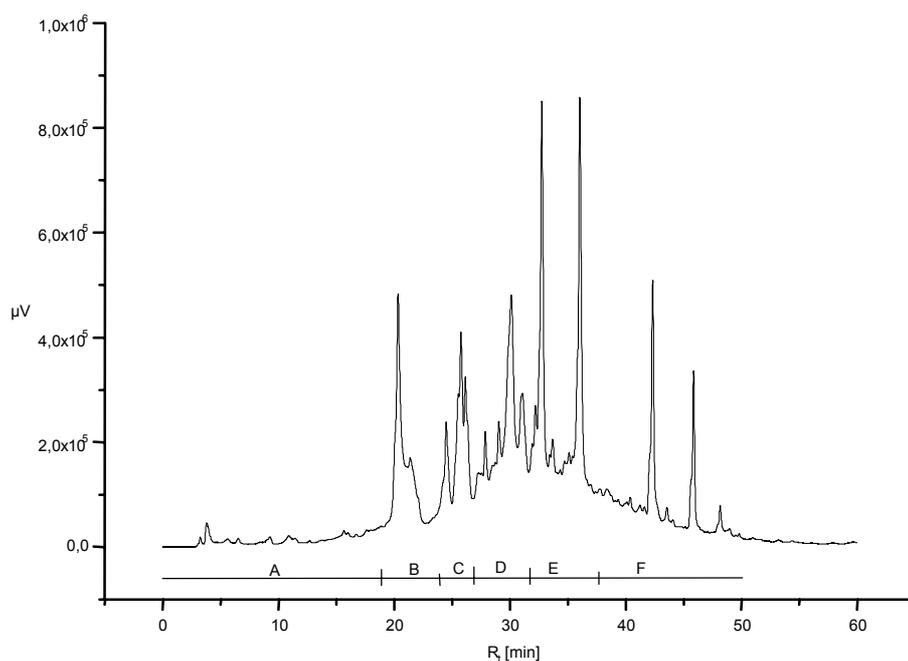


Abbildung 2-36: HPLC-Chromatogramm (280 nm): präparative HPLC der vereinten Proben LIR mit Erdnussschalenextrakt mit den Fraktionen A bis F

Die Fraktionen B und E wurden per hochauflösender HPLC-MS (TOF) untersucht. Die Überprüfung der Fraktion B per HPLC-DAD und -ELSD ist in Abbildung 2-37 dargestellt. Zugehörige UV-Spektren und die Retentionszeiten entsprechen den Peaks 8, 9, 11, 12.

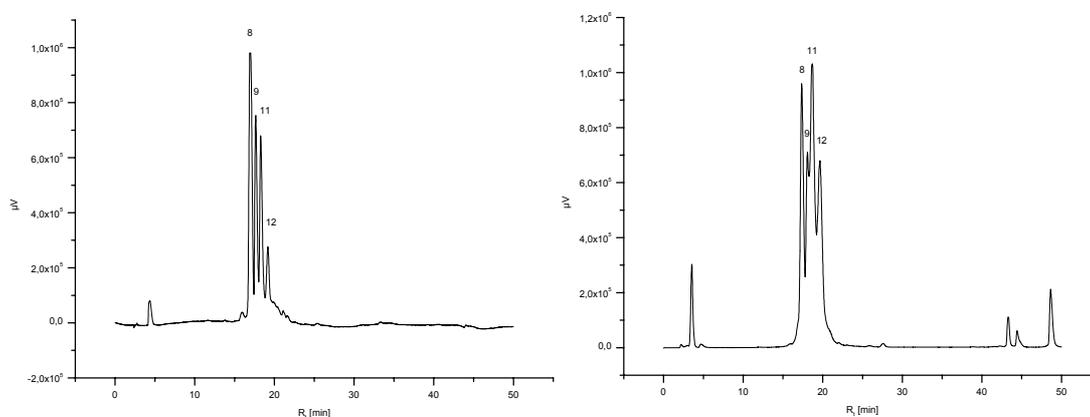


Abbildung 2-37: HPLC-Chromatogramme von Fraktion B: links bei 280 nm, rechts mit ELSD

Die Fraktion B wurde im negativen ESI-Modus per HPLC-MS (TOF) analysiert. In Abbildung 2-38 ist das entsprechende Chromatogramm mit den dominierenden Massen abgebildet.

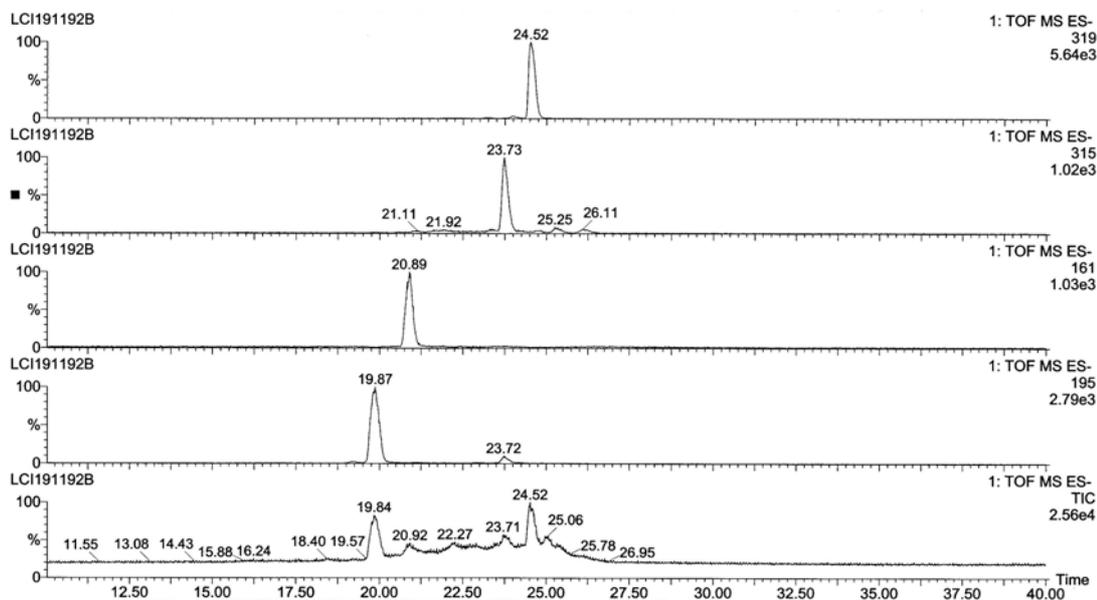


Abbildung 2-38: HPLC-MS (TOF) Chromatogramm im negativen Ionisierungsmodus mit Massenspuren, von oben nach unten: 319 u, 315 u, 161 u, 195 u und TIC (total ion count), R_t in min

Die hochaufgelösten Massen und die dazugehörigen Vorschläge für die Summenformeln und die DBE sind in Tabelle 2-18 aufgelistet. Einschränkungen und Voraussetzungen zur Ermittlung der Summenformel aus der hochaufgelösten Masse sind in 4.12.3.4 aufgelistet.

Tabelle 2-18: Mögliche Summenformeln für hochaufgelöste Massen der Fraktion B

Nr.	Hochaufgelöste Masse	Vorschlag Summenformel	DBE	Massenabweichung [ppm] ⁸
B-1	195,0288 u	C ₉ H ₇ O ₅	6	-2,8
B-2	161,0244 u	C ₉ H ₅ O ₃	7	3,2
B-3	319,1392 u	C ₁₄ H ₂₃ O ₈ oder C ₂₁ H ₁₉ O ₃	3 12	-0,3 18
B-4	315,1439 u	C ₁₅ H ₂₃ O ₇	4	-1,5

Die Fraktion B wurde per GC-MS nach Derivatisierung mit BSTFA untersucht. Eine Reihe von neu auftretenden Verbindungen, die in den entsprechenden Kontrollproben BW Erdnussschalen und BW *Lepista irina* nicht nachweisbar waren, wurden analysiert und z.T. identifiziert (siehe Tabelle 2-19).

Tabelle 2-19: Abbauprodukte in der Fraktion B: LIR plus Erdnussschalenpulver; Bestimmung per GC-MS als TMS-Derivate

Nr.	Kováts-Index TMS-Derivate, DB 5	Molmasse m/z, Identifizierung	Herleitung der TMS-Molmasse aus der hochaufgelösten Masse (HPLC-MS)
I	2014	354	--
II	2165	484, Trihydroxyzimtsäure	4·72 (TMS)+196 (Nr. 1) = 484
III	1440	226	--
IV	1635	302	--
V	1828	234	1·72 (TMS)+162 (Nr. 2) = 234
VI	2118	484, Trihydroxyzimtsäure	4·72 (TMS)+196 (Nr. 1) = 484
VII	1766	3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	--
VIII	2369	593, Molpeak nicht erkennbar	--

Die dazugehörigen Massenspektren sind in den Abbildung 2-39 bis Abbildung 2-41 sowie im Anhang abgebildet. Anhand des Massenspektrums (GC-MS) konnte der Verbindung die Struktur 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (Nr. VII) zugeordnet werden. Die Absicherung der Identifizierung erfolgte anhand der originären

⁸ Massenabweichung der ermittelten Masse von der kalkulierten in ppm

Verbindung (Retentionszeit und Massenspektrum). 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure lag in geringer Konzentration vor ($1,5 \mu\text{g}\cdot(100 \text{ mL})^{-1}$). Eine weitere Absicherung durch HPLC-DAD- und MS- Untersuchung (Retentionszeit, UV-Spektrum, exakte Masse) gelang aufgrund der geringen Konzentration nicht. Die eindeutige Identifizierung über die GC-MS machte weitergehende Untersuchungen überflüssig.

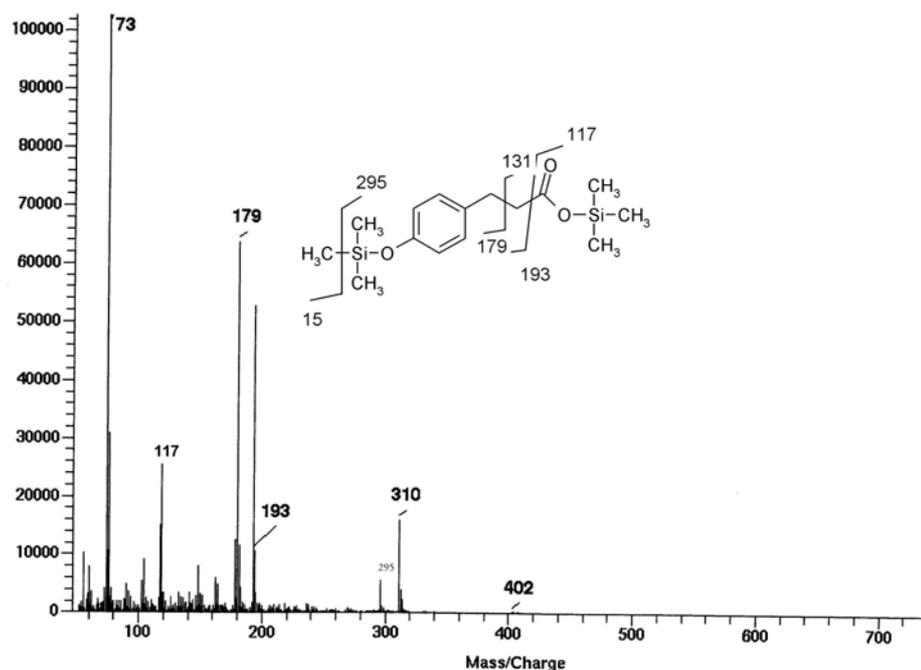


Abbildung 2-39: MS-Spektrum (GC-MS) von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure-TMS, Kováts-Index 1766

Anhand der per HPLC-MS in negativem ESI-Modus ermittelten hochaufgelösten Masse von $195,0288 \text{ u}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ ergibt sich eine nominale Masse von 196 u (siehe Tabelle 2-18, Nr. B-1). Mit dem dazugehörigen Summenformelvorschlag $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_5$ und den DBE 6, einem typischen UV-Spektrum eines substituierten Aromaten, sowie dem GC-Massenspektrum (Abbildung 2-40) mit dem Molpeak m/z 484 (Nr. II und VI, Tabelle 2-19), das auf einen stabilen Molpeak hindeutete, wurde die Substanz als Trihydroxizimtsäure identifiziert.

In den HPLC-Fractionen konnten zwei Peaks mit dem identischen UV-Spektrum nachgewiesen werden (Retentionszeitunterschied $0,63$ Minuten). Ebenso zeigte sich bei den GC-MS-Untersuchungen, dass bei zwei Peaks das identische

Massenspektrum vorlag, was durch die Z/E-Isomeren der Trihydroxymzimtsäure erklärt werden kann. Die Zuordnung erfolgte durch Analogievergleich mit Z- und E-Hydroxymzimtsäure mittels HPLC und GC. Es zeigte sich, dass auf einer analytischen RP-18 Säule Z-Hydroxymzimtsäure zuerst eluiert (Retentionszeitunterschied 1,12 Minuten). Bei den entsprechenden GC-Untersuchungen an einer unpolaren Phase eluierte Z-Hydroxymzimtsäure ebenfalls vor dem E-Stellungsisomer (Retentionsunterschied 3,6 Minuten). Durch Übertragung auf Trihydroxymzimtsäure ist sowohl bei der HPLC als auch bei der GC davon auszugehen, dass es sich bei der zuerst eluierenden Verbindung um (Z)-Trihydroxymzimtsäure handelt.

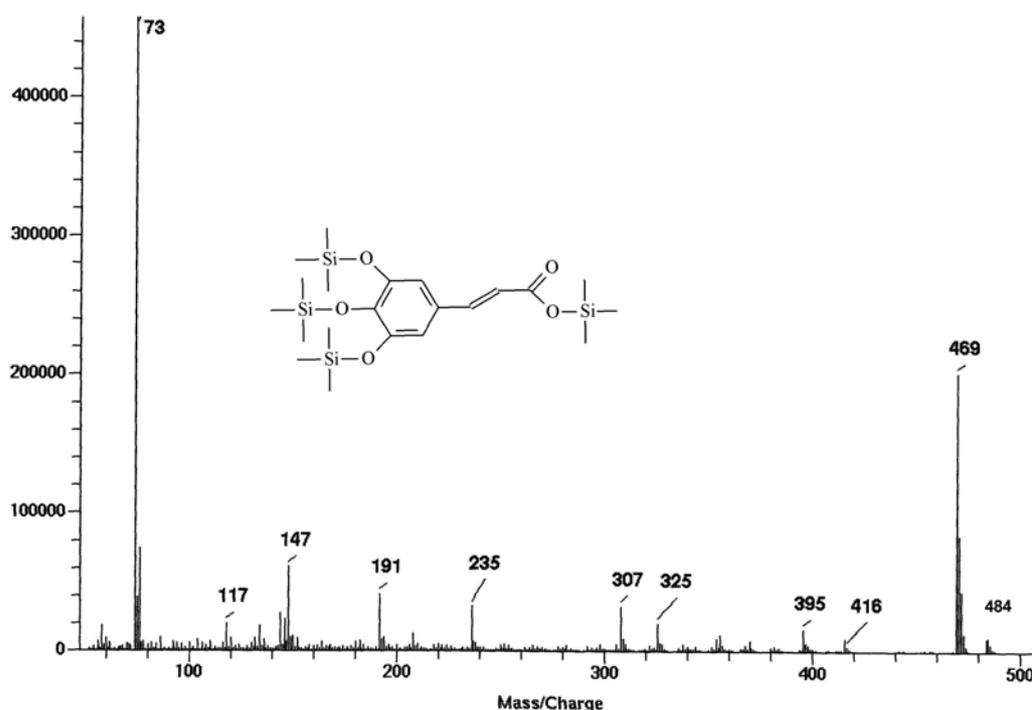


Abbildung 2-40: MS-Spektrum (GC-MS) von Trihydroxymzimtsäure-TMS, Kováts-Index 2118

Per HPLC-MS konnte die ermittelte Masse 161,0244 u nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2-18, Nr. B-2). Dies ergab einen Summenformelvorschlag mit 7 DBE, der auf ein zweifach kondensiertes Ringsystem hindeutete. Die Untersuchung der Fraktion B per GC-MS ergab ein TMS-Derivat (Abbildung 2-41) mit einem stabilen Molekülion von 234 (Tabelle 2-19, Nr. V) und einem Basispeak bei 219 ($M^{+\bullet}$ minus 15). Das Fragmentation mit m/z 73 zeigte, dass mindestens eine silylierbare funktionelle Gruppe vorliegt. Mit der Molmasse von 162 u und einer Hydroxygruppe erhält man durch die

Derivatisierung mit BSTFA das TMS-Derivat mit der Molmasse m/z 234. Die chromatographischen und spektralen Daten deuteten auf 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) als mögliche Struktur hin. Eine Co-Chromatographie (GC) mit der originären Verbindung zeigte einen Retentionszeitunterschied von 0,24 min. Das TMS-Derivat wies bei der GC-MS neben den Massenfragmenten (m/z) 73, 219 und 234 noch ein Massenfragment bei 163 auf. Dieses Massenfragment fehlte bei der betreffenden Verbindung. Es wurde ebenso eine Überprüfung mit 4-Hydroxycumarin durchgeführt, die ebenso keine Übereinstimmung im Massenspektrum zeigte.

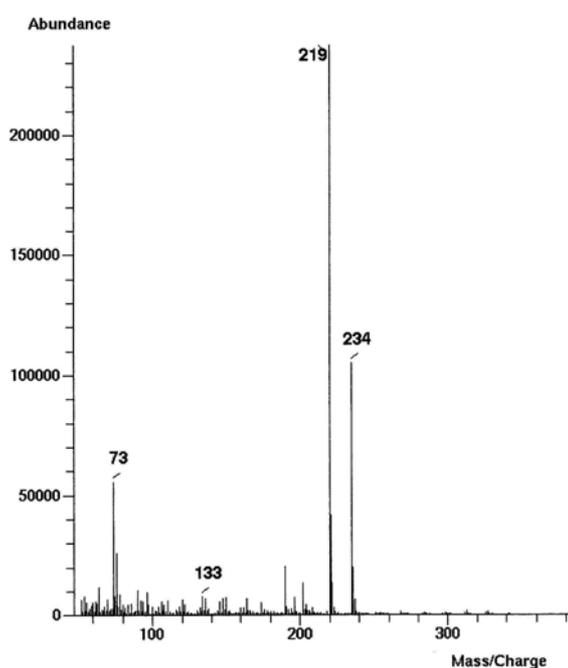


Abbildung 2-41: Massenspektrum GC-MS eines Ligninabbauproduktes (TMS-Derivat), Kováts-Index 1828

Die Substanz mit der exakten Masse von 315,1439 u der HPLC-MS-Untersuchung (siehe Tabelle 2-18, Nr. B-4) konnte bei den entsprechenden GC-MS-Untersuchungen nicht zu geordnet werden. Dabei wurde sowohl nach dem Molekülion als auch nach den Derivatisierungsprodukten gesucht. Die GC-MS-Untersuchung im SIM-Modus mit den ausgewählten Massen zeigte, dass die Massenspuren im Chromatogramm nicht vorkamen.

Gleiches traf auf die hochaufgelöste Masse 319,1392 u (Tabelle 2-18, Nr. B-3) zu, es konnte ebenfalls keine Zuordnung bei den GC-MS-Untersuchungen getroffen werden. Die die aus der hochaufgelösten ermittelte Verbindung mit der Summenformel $C_{14}H_{13}O_8$ zeigt mit 3 DBE, dass hier keine aromatische Verbindung vorliegen kann. Die alternativ ermittelte Summenformel zeigte eine Massenabweichung von 18 ppm.

Bei GC-MS-Untersuchungen der Fraktion B konnten weitere Abbauprodukte identifiziert werden (Tabelle 2-19). Die Spektren sind im Anhang abgebildet. Alle Verbindungen weisen mindestens eine silylierbare, funktionelle Gruppe auf. Ein Vergleich mit den Standardverbindungen ergab keine Übereinstimmung mit bekannten Verbindungen.

Die Fraktion E wurde im positiven ESI-Modus per HPLC-MS untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-20 aufgelistet. Die fettgedruckten Summenformelvorschläge zeigen die geringste Massenabweichung von dem ermittelten Wert. Einschränkungen und Voraussetzungen zur Ermittlung der Summenformel aus der hochaufgelösten Masse sind in 4.12.3.4 aufgelistet.

Tabelle 2-20: Aus der exakten Masse berechnete postulierte Summenformeln von Verbindungen der Fraktion E (ESI-HPLC-MS, hochauflösend)

Nr.	R _t [min]	hochaufgelöste Masse	Vorschlag Summenformel	DBE	Massenabweichung [ppm] ⁹
E-1	23,91	321,1667 u	C₁₆H₂₆O₅Na	4	-3,4
			C ₁₈ H ₂₃ O ₅	7	-6,3
E-2	22,45 und 23,17	291,1584 u	C₁₅H₂₄O₄Na	4	4,0
			C ₁₇ H ₂₁ O ₄	7	-6,9
E-3	23,3 und 24,57	323,1486 u	C₁₇H₂₃O₆	7	0,03
			C₁₅H₂₄O₆Na	4	4,8
			C ₂₄ H ₁₇ O	16	-6,3
			C ₂₂ H ₂₀ ONa	13	23,0
E-4	22,9 und 25,60	551,3207 u	C₂₈H₄₈O₉Na	5	2,0
			C ₃₀ H ₄₅ O ₉	8	-3,7
			C ₃₇ H ₄₁ O ₄	17	-3,7
			C ₃₅ H ₄₄ O ₄ Na	14	12,64

Die Fraktion E wurde nach Aufarbeitung und Derivatisierung per GC-MS analysiert. Durch den Vergleich mit entsprechenden Kontrollproben BW Erdnussschalen und BW *Lepista irina* konnten zwei Abbauprodukte identifiziert werden. In Tabelle 2-21 sind die mittels GC-MS-Untersuchungen ermittelten Abbauprodukte der Fraktion E aufgelistet.

Tabelle 2-21: Abbauprodukte in der Fraktion E: LIR plus Erdnussschalenpulver; Bestimmung per GC-MS als TMS-Derivate

Kováts Index TMS-Derivate, DB 5	Molmasse m/z	Herleitung der TMS-Molmasse aus der hochaufgelösten Masse (HPLC-MS)	Spektrum auf Abb.
2039	412	291-Na+2·x 72 (TMS) = 412	Abbildung 2-42
2112	370	321-Na+1·x 72 (TMS) = 370	Abbildung 2-43

Bei der exakten Masse von 291,1584 u (siehe Tabelle 2-20, Nr. E-2) handelte es sich um ein mono-Natrium-Addukt. Somit ergab sich eine Summenformel C₁₅H₂₄O₄ mit 4

⁹ Massenabweichung der ermittelten Masse von der kalkulierten in ppm

DBE. Bei der GC-MS-Untersuchung konnte in der Fraktion E ein Abbauprodukt mit der Molmasse m/z 412 (möglicherweise von zwei Hydroxygruppen) nachgewiesen werden (Abbildung 2-42). Das Fragment 280 deutet auf eine fragmentierbare Seitenkette des Aromaten hin. Anhand der Daten aus der HPLC-MS- und der GC-MS-Untersuchung sowie der HPLC-DAD-Untersuchung (typisches Aromatenspektrum) lassen sich folgende Fakten für das Abbauprodukt postulieren:

- aromatische Verbindung (4 DBE)
- keine weiteren Doppelbindungen
- keine Keto- oder Säurefunktion
- zwei freie Hydroxygruppen
- zwei Methoxygruppen oder zwei Sauerstoffatome in Etherbindungen
- aliphatische Seitenkette
- relativ unpolarer Charakter (Retentionsverhalten auf RP-18-Phase)
- nominale Masse 268 u, Summenformel: $C_{15}H_{24}O_4$

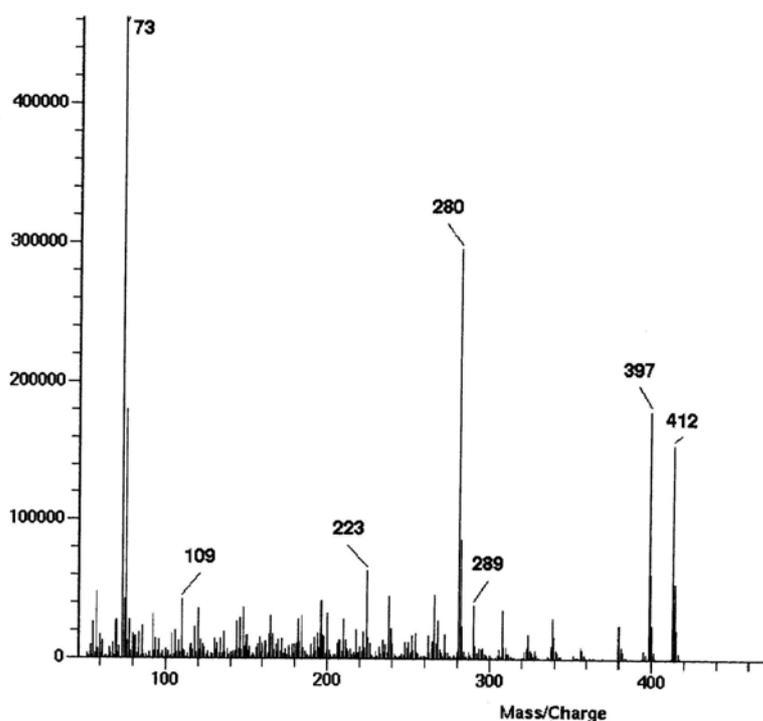


Abbildung 2-42: Massenspektrum (GC-MS) eines Ligninabbauproduktes in der Fraktion E (TMS-Derivat), Kováts-Index 2039

Bei der Verbindung mit der exakten Masse von 321,1667 u (siehe Tabelle 2-20, Nr. E-1) handelte es sich ebenfalls um ein mono-Natrium-Addukt. Mit einer nominalen Masse von 298 u und einer derivatisierbaren, funktionellen Gruppe konnte bei der GC-MS-Untersuchung ein Abbauprodukt mit der Molmasse m/z 370 nachgewiesen werden (Abbildung 2-43). Anhand der Daten aus der HPLC-MS- und der GC-Untersuchung sowie der HPLC-DAD-Untersuchung (typisches Aromatenspektrum) lassen sich folgende Fakten für das unbekannte Abbauprodukt postulieren:

- aromatische Verbindung (4 DBE)
- keine weiteren Doppelbindungen
- eine freie Hydroxygruppe
- keine Säure- oder Ketofunktion
- vier Methoxygruppen oder vier Sauerstoffatome in Etherbindungen
- relativ unpolarer Charakter (Retentionsverhalten auf RP-18-Phase)
- nominale Masse 298 u
- Summenformel: $C_{16}H_{26}O_5$

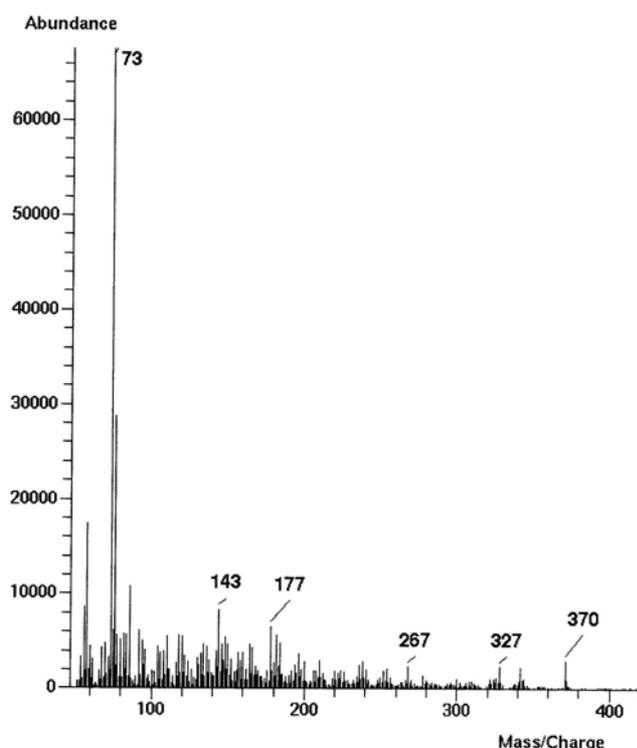


Abbildung 2-43: Massenspektrum (GC-MS) eines Ligninabbauproduktes in der Fraktion E (TMS-Derivat), Kováts-Index 2112

Bei der Verbindung mit der exakten Masse von 323,1486 u (Tabelle 2-20, Nr. E-3) handelte es sich um ein mono-Natrium-Addukt. Im SIM-Modus konnte per GC-MS mit der Massenspur m/z 357 (M^+ minus 15) eine Zuordnung getroffen werden (Kováts-Index 2140). Der Molpeak m/z 372 war nicht erkennbar (GC-Massenspektrum siehe Anhang). Es handelte sich somit um eine einfach silylierte Verbindung. Anhand der Daten aus der HPLC-MS- und der GC-Untersuchung sowie der HPLC-DAD-Untersuchung (typisches Aromatenspektrum) lassen sich folgende Fakten für das unbekanntes Abbauprodukt postulieren:

- nominale Masse 300 u
- Summenformel: $C_{15}H_{24}O_6$ mit 4 DBE
- eine Hydroxygruppe

Mit der exakten Masse von 323,1486 u (nominale Masse 322 u) wurde ebenfalls die alternative Summenformel $C_{17}H_{22}O_6$ ($[M+H]^+$, da Aufnahme im positiven ESI-Modus) für das Abbauprodukt ermittelt. Der Extrakt wurde nach entsprechender Aufarbeitung und Derivatisierung mit BSTFA per GC-MS untersucht. Es wurde nach den entsprechenden Massenspuren m/z 322 (keine derivatisierbare Gruppe), 394 (eine derivatisierbare Gruppe) etc. gesucht. Die SIM-Massenspuren (322, 394, 538 und 754) konnten dem GC-MS-Chromatogramm nicht zugeordnet werden.

Für die Verbindung mit der exakten Masse von 551,3207 u (Tabelle 2-20, Nr. E-4, mono-Natrium-Addukt) konnte per GC-MS im SIM- und Scan-Modus keine Zuordnung getroffen werden. Es wurde im SIM-Modus nach den Massenspuren 528 (keine derivatisierbare Gruppe), 600 (eine derivatisierbare Gruppe), 672 (zwei derivatisierbare Gruppen) und 744 (drei derivatisierbare Gruppen) gesucht.

In der Fraktion D konnte der interne Standard Trolox nachgewiesen werden. Der interne Standard Ethylvanillin sowie p-Methoxybenzaldehyd waren in der Fraktion C nachweisbar. In den Fraktionen A und F konnten keine Abbauprodukte nachgewiesen werden.

2.5.5 Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* im Fed-batch-Verfahren auf Erdnussschalen

Ziel war es, durch den Austausch des Nährmediums während der Kultivierung den weiteren Katabolismus der Abbauprodukte zu verhindern.

Pleurotus sapidus und *Lepista irina* wurden auf jeweils 7 g Erdnussschalpulver statisch-dynamisch kultiviert (siehe 4.7.3.13). Am 7. Kulturtag der dynamischen Phase wurde das Kulturmedium durch frisches ersetzt und weiter dynamisch kultiviert. Der zweite Zyklus wurde durch die Abtrennung des Kulturmediums am 14. Kulturtag (7. Kulturtag im 2. Zyklus) beendet. Die Kulturmedien wurden nach Ultrafiltration aufgearbeitet und mittels HPLC untersucht.

Im ersten Zyklus der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* war eine Reihe von Abbauprodukten nachweisbar, die im 2. Zyklus nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz dazu konnte ein p-Methoxybenzaldehydgehalt von $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kulturmedium nachgewiesen werden. Im ersten Kulturzyklus betrug der Gehalt nur $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Die HPLC-Chromatogramme sind im Anhang abgebildet (und Abbildung 6-16). Bei den Kultivierungen mit *Lepista irina* zeigte sich ein vergleichbares Bild.

Durch die Fed-batch-Kultivierungstechnik kam es zu keiner Akkumulation von Ligninabbauprodukten.

2.5.6 Zusammenfassung

Bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* mit Erdnussschalen konnte eine Reihe von Abbauprodukten nachgewiesen werden. In Tabelle 2-22 sind die identifizierten Abbauprodukte aufgelistet. Nicht weiter identifizierte Abbauprodukte sind in Tabelle 2-23 aufgeführt.

Tabelle 2-22: Identifizierte Abbauprodukte bei den Kultivierungen von PSA und LIR

Abbauprodukt	<i>Pleurotus sapidus</i>	<i>Lepista irina</i>
2,5-Furandicarbonsäure	dynamisch und statisch-dynamisch	statisch-dynamisch
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	statisch-dynamisch	mit Extrakt
E-Zimtsäure	statisch-dynamisch	--
Trihydroxymimtsäure	statisch-dynamisch und mit Extrakt	statisch-dynamisch und mit Extrakt
p-Methoxybenzaldehyd ¹⁰	sämtliche Kultivierungsmethoden	sämtliche Kultivierungsmethoden

Tabelle 2-23: Nicht identifizierte Abbauprodukte bei den Kultivierungen von PSA und LIR

Abbauprodukt mit chromatographischen Daten	<i>Pleurotus sapidus</i>	<i>Lepista irina</i>
HPLC Peak Nummer 2	Nicht nachweisbar	statisch-dynamische Kultivierung und mit Erdnussschalenextrakt
HPLC Peak Nummer 3 ¹¹	Nicht nachweisbar	statisch-dynamische Kultivierung, vorbehandelte Erdnussschalen mit Enzymzusatz und Kultivierung mit Erdnussschalenextrakt
HPLC Peak Nummer 16	vorbehandelte Erdnussschalen mit Erdnussschalenextrakt	statisch-dynamische Kultivierung mit vorbehandelten Erdnussschalen und Enzymzusatz und Kultivierung mit Erdnussschalenextrakt
GC-MS: m/z 502 ¹²	dynamische Kultivierung	Nicht nachweisbar
GC-MS: RI 1425 m/z 198	statisch-dynamische Kultivierung	Nicht nachweisbar
GC-MS: m/z 650	statisch-dynamische Kultivierung	Nicht nachweisbar
HPLC Peak Nummer 4, 5, 6	Nicht nachweisbar	statisch-dynamische Kultivierung
GC-MS: RI 1295 m/z 208	Nicht nachweisbar	statisch-dynamische Kultivierung
GC-MS: RI 1439 m/z 212	Nicht nachweisbar	statisch-dynamische Kultivierung
HPLC Peak Nummer 8, 12, 14, 15, 19, 21, 23 ¹³	Nicht nachweisbar	Kultivierung mit Erdnussschalenextrakt

¹⁰ wird von PSA *de novo* gebildet, bei LIR keine *de novo* Bildung

¹¹ HPLC-MS-Daten vorhanden

¹² im Filtrerrückstand

¹³ HPLC-MS und GC-MS Daten vorhanden

3 Diskussion

Lignin ist neben Cellulose das meist verbreitete Biopolymer. Die geschätzte Jahresproduktion der Erde beträgt ca. $2 \cdot 10^{10}$ t (Strasburger, 2002). Neben seiner Bedeutung als Werkstoff, Bindemittel, Stabilisator und als Dispergiermittel hat Lignin bisher keine weitere wirtschaftliche Bedeutung erlangt (Römpp, 1990).

Chemisch gesehen wird Lignin nach Sarkan und Ludwig (1971) als „polymeres Naturprodukt“, das durch enzymatisch initiierte Dehydrogenierungspolymerisation dreier primärer Vorstufen (Coniferyl-, Sinapin- und p-Cumarylalkohol, siehe Abbildung 3-1) entsteht, definiert.

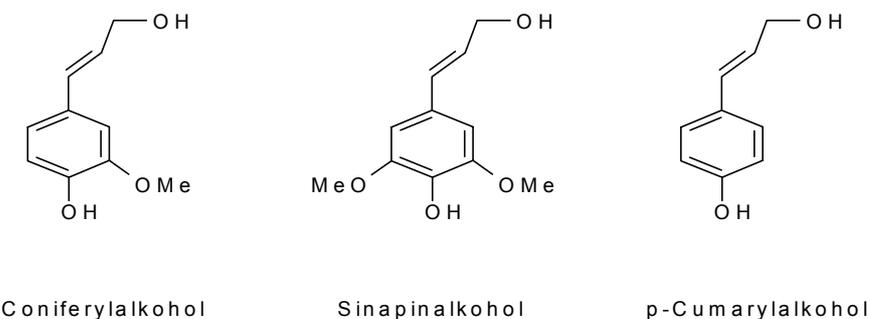


Abbildung 3-1: Ligningrundbausteine

Die Biosynthese von Lignin (Abbildung 3-2) ist eng mit den Synthesen von Stilbenen und Flavonoiden verknüpft.

Die komplexe Natur des Lignins entsteht durch die unterschiedlichen Verknüpfungsmöglichkeiten der Grundbausteine Coniferyl-, Sinapin- und p-Cumarylalkohol. Abbildung 3-3 zeigt einen Ausschnitt aus der Struktur des Fichtenholzlignins. Erkennbar sind die unterschiedlichen Grundbausteine und die möglichen Verknüpfungsarten.

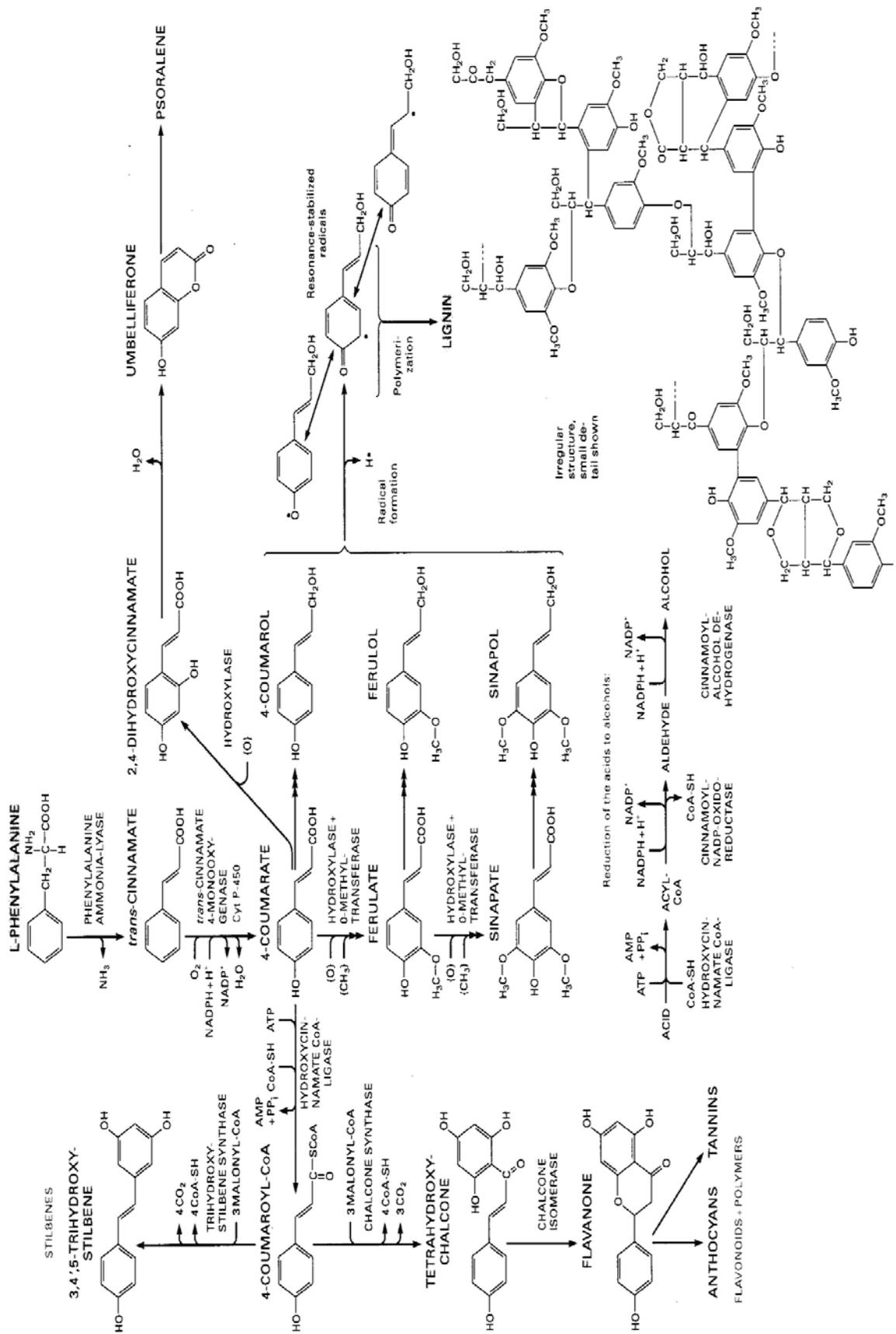


Abbildung 3-2: Biosynthese von Lignin, Stilbenen und Flavonoiden nach Michal (1999)

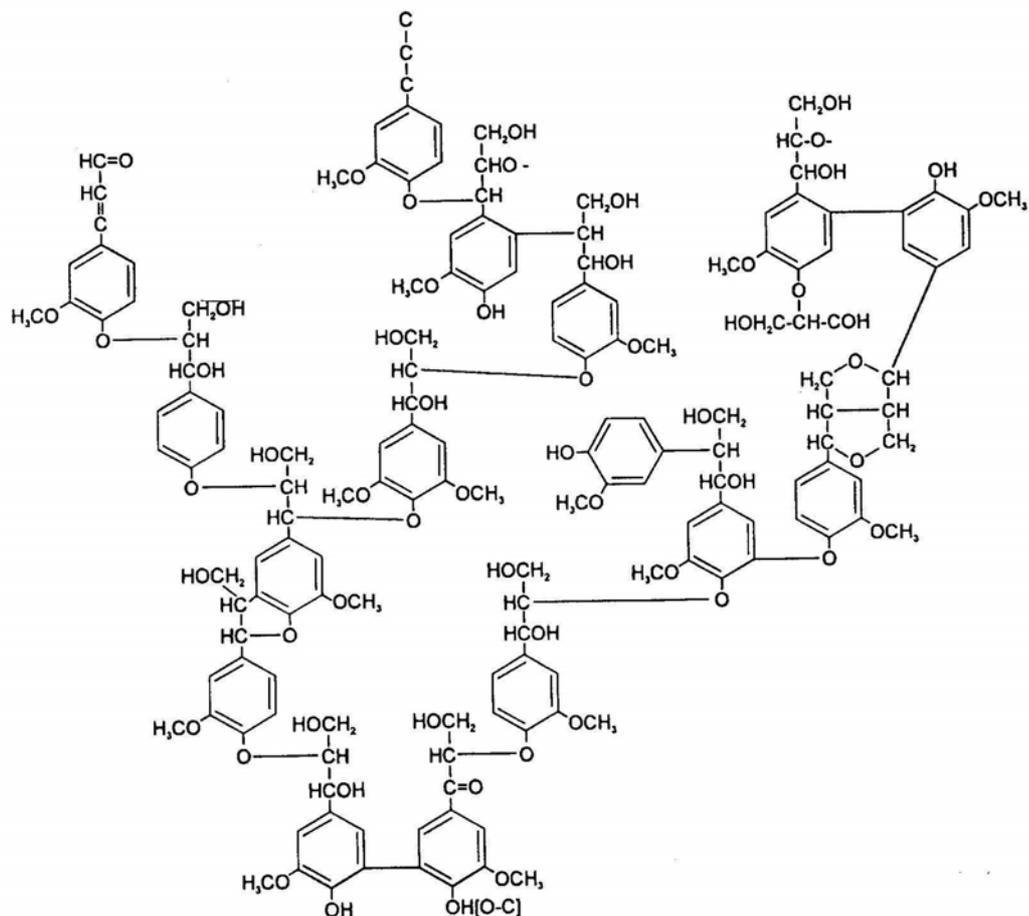


Abbildung 3-3: Ausschnitt aus Fichtenholzlignin nach Adler (Cho und Dreher, 2001)

In Pflanzen kommt Lignin als Zellwandbestandteil des Xylem vor und erfüllt wesentliche Funktionen wie Stabilität und mechanische Unterstützung, Regulation des Wassertransportes durch Hydrophobisierung sowie Schutz gegen das Eindringen von Mikroorganismen. Weitere Funktionen sind unter anderem UV-Schutz und Schutz gegen oxidative Einflüsse (Hofrichter und Steinbüchel, 2001). In der menschlichen Ernährung spielt Lignin als Ballaststoff eine wichtige Rolle (Belitz, Grosch und Schieberle, 2001).

Weitere Bestandteile in ligninhaltigen Pflanzen sind Cellulose, Hemicellulose, Lignocellulose, Xylane, veresterte Hydroxycimtsäure- und Ferulasäure-Derivate.

Entsprechende Verbindungen sind über Quervernetzungen mit Lignin verbunden (Bunzel et al., 2001; Bunzel et al., 2002; Renger et al., 2000).

Eine funktionelle Definition von Lignin geben Hatfield et al. (1999, b): "Lignin ist ein phenolisches Makromolekül (Polymer), das mit anderen Zellwandbestandteilen in Wechselwirkung tritt, um Integrität, Widerstand gegenüber dem Abbau und Wasserundurchlässigkeit zu gewährleisten."

Durch seine vielfältige, aromatische Struktur ist Lignin potenziell interessant für die Gewinnung aromatischer niedermolekularer Verbindungen. Dazu ist jedoch eine chemische oder enzymatische Depolymerisation notwendig. Die chemische Degradation ist mit hohem Energieeinsatz und Belastungen der Umwelt verbunden und stellt somit im Vergleich zu enzymatischen Verfahren einen geringeren wirtschaftlichen Anreiz dar. Nur wenige Mikroorganismen verfügen über eine enzymatische Ausstattung, Lignin zu degradieren. Zu den effizientesten Ligninabbauern gehören die so genannten Weißfäulepilze, die der Klasse der Basidiomyceten (Ständerpilze) zuzuordnen sind (Hofrichter und Steinbüchel, 2001). Eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten über den Ligninabbau beschäftigt sich mit molekularbiologischen und proteinbiochemischen Fragestellungen (Hofrichter und Steinbüchel, 2001). Arbeiten, die sich mit niedermolekularen Verbindungen aus dem Abbau von Lignin und Ligninmodellverbindungen beschäftigen, hatten unterschiedliche Zielsetzungen:

- Charakterisierung des Abbaus von nativem oder isoliertem Lignin durch GPC (Abraham, 1994),
- Charakterisierung wasserlöslicher Ligninabbauprodukte (radioaktiver) und Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ durch den Einsatz von radioaktiv markiertem Lignin (Hofrichter, 1999),
- Fraktionierung der Abbauprodukte und Charakterisierung durch ^{13}C -NMR (Tai, 1990; Medvedeva et al., 2000),
- Erfassung struktureller Veränderungen während des Ligninabbaus durch Pyrolyse-GC (Camareo, 1997) und ^{31}P -NMR und FTIR (Geng et al., 2002).

Es liegen zahlreiche Arbeiten vor, die sich mit dem chemischen Abbau von Lignin beschäftigen. Die umfangreichste Arbeit beschreibt die Identifizierung von mehr als 350 niedermolekularen Verbindungen in der Schwarzlaugung von Birkenholz per GC-

MS (Niemelä, 1990). Es handelt sich bei diesen Verbindungen um unterschiedliche Substanzklassen wie:

- acyclische Terpenoide,
- Sterole,
- Cyclopentenone,
- Benzochinone,
- phenolische Verbindungen (Aldehyde, Ketone, Alkohole, Säuren),
- Stilbene,
- Dilignone und Biphenyle,

Eine weitere Anzahl von Arbeiten beschäftigen sich mit dem enzymatischen Abbau von monomeren und dimeren Ligninmodellverbindungen. Kawai et al. (1999) zeigten, dass eine Laccase von *Trametes versicolor* in einem zellfreien Ansatz aus nicht-phenolischen β -O-4-Ligninmodellverbindungen (siehe Abbildung 3-4) β -Ether-spaltprodukte, C_{α} - C_{β} -Spaltprodukte sowie C_{α} -Oxidationsprodukte bildete.

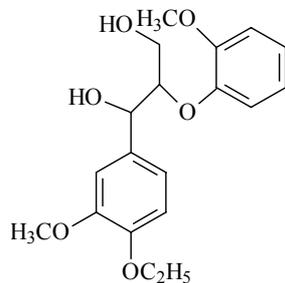


Abbildung 3-4: Nicht-phenolische β -O-4 Ligninmodellverbindung

Kawai et al. (1989) zeigten, dass durch Laccase von *Trametes versicolor* unter Zusatz von Syringaaldehyd methoxylierte Benzylalkohole (3,4,5-Trimethoxybenzylalkohol und Veratrylalkohol) oxidiert wurden. Als Abbauprodukte wurden Hydrochinone und Benzochinone mittels GC-MS nachgewiesen. Syringaaldehyd spielte eine wichtige Rolle bei der Oxidation der nicht-phenolischen Monomeren durch Laccase (Kawai et al., 1989).

Hattori et al. (1989) zeigten in einem zellfreien Ansatz mit Ligninperoxidase von *Phanerochaete chrysosporium*, dass Vanillinalkohol durch C-C-Kopplung zu

Dehydrovanillinalkohol umgesetzt wurde. Es konnten ebenso ein δ -Lacton (Ringspaltungsprodukt) und das Oxidationsprodukt (Vanillin) des Vanillinalkohols sowie Dimerisierungsprodukte nachgewiesen werden (Hattori et al., 1989).

Dastan (1985) zeigte durch GPC-Untersuchungen von einem Ligninextrakt¹⁴, dass es bereits in den ersten 5 Tagen zum Abbau von Lignin bei einer Submerskultivierung von *Polyporus versicolor* kam. Es wurde eine Abnahme im gesamten betrachteten Molekulargewichtsbereich registriert. Besonders stark war die Abnahme im hochmolekularen Bereich ausgeprägt. Durch die GPC-Untersuchungen von verschiedenen Extrakten konnte gezeigt werden, dass es zu einer Bildung von wasserlöslichen Abbauprodukten kam. Es konnte eine temporäre Zunahme von Abbauprodukten im niedermolekularen Bereich detektiert werden. Diese Abbauprodukte unterlagen jedoch einem weiteren Abbau. Ab dem 5. Kulturtag war eine Stagnation des Ligninabbaus feststellbar (Dastan, 1985).

Abraham (1994) untersuchte verschiedene Basidiomyceten in einer geschüttelten Submerskultivierung bezüglich ihres Ligninabbauverhaltens mittels GPC und GC. Bei den Substraten handelte es sich um verschiedene Ligninisolate, die den Submerskulturen als Suspension zugesetzt worden sind. Bei den Kultivierungen von *Phanerochaete chrysosporium* und *Pleurotus sapidus* erfolgte eine starke Abnahme des hochmolekularen Ligninanteils und eine Zunahme des Bereichs 0,1 bis 1,0 kDa. Im Verlauf der Kultivierungen konnten keine flüchtigen aromatischen Ligninabbauprodukte identifiziert werden. Durch den Zusatz von Lignin wurde lediglich die Konzentration bestimmter flüchtiger aromatischer *De-novo*-Metaboliten erhöht. Besonders ausgeprägt war die Bildung des *De-novo*-Metaboliten p-Methoxybenzaldehyd (Abraham, 1994).

Eine wirtschaftliche Nutzung zum enzymatischen Abbau von Lignin mit der Zielsetzung der Nutzung der niedermolekularen Abbauprodukte ist nicht bekannt. Es bestehen jedoch wirtschaftlich interessante Biokonversionen von Ferulasäure zu Vanillin. Dabei werden Vanillingehalte von bis zu 13,9 g·L⁻¹ erreicht (Müller et al., 1998). Ferulasäure ist ein billig verfügbarer Prekursor und kann z.B. durch den

¹⁴ Ligninisolat aus Birkenholz (76% Lignin und 24% Hemicellulose)

enzymatischen Abbau von Zuckerrübenfasern gewonnen werden (Lesage-Meessen et al., 1996). Biotechnologisch erzeugte Aromastoffe stellen einen besonderen wirtschaftlichen Nutzen dar, da diese Aromastoffe als natürlich bezeichnet werden können und somit den wachsenden Verbrauchererwartungen entgegenkommen (Krings und Berger, 1998).

Die vorliegende Arbeit zeigt den Abbau von Lignocellulose haltigen Substraten durch Basidiomyceten. Im Vordergrund stehen eine Bilanzierung des Ligninabbaus und die Identifizierung von niedermolekularen, phenolischen Abbauprodukten, die neben anderen Abbaustoffen für die Gewinnung von Antioxidantien interessant sein können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein für Basidiomyceten artifizielles Submerskulturverfahren gewählt, da dieses Verfahren besonders gut für ein kontrolliertes Wachstum der Basidiomyceten geeignet ist (Abraham, 1994). Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit eine geschüttelte (dynamische) Submerskultivierung gewählt, um höhere lignolytische Enzymaktivitäten zu erzielen. Dies ist nach einer von Ha et al. (2001) mit *Pleurotus ostreatus* durchgeführten Untersuchung zu erwarten gegenüber einer rein statischen Kultivierung. Für diese Arbeit wurde ein vitales Ganzzellensystem ausgewählt, um die für den Ligninabbau erforderliche Cofaktoren nicht auszuschließen.

3.1 Akkumulation von niedermolekularen, antioxidativ wirksamen Substanzen beim Abbauprozess

Ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Polyphenolen und antioxidativen (radikaleinfangenden) Eigenschaften ist in zahlreichen Arbeiten belegt. Mit steigendem Gehalt an Polyphenolen korreliert die Radikaleinfangrate, die als antioxidative Kapazität (AOC) bezeichnet wird (Prior und Cao, 1999; Porto et al. 2000; Simonetti et al., 1997; Mosca et al. 2000; Sanchez-Moreno et al., 1999). Zur Bewertung der antioxidativen Kapazität von Substanzen steht eine Vielzahl von Testmöglichkeiten zur Verfügung (Prior und Cao, 1999). Sie kann beispielsweise durch den ABTS- oder den DPPH-Test ermittelt werden. Beiden Tests ist gemeinsam, dass freie Radikale eingesetzt werden, die im visuellen Wellenlängenbereich absorbieren: ABTS-Kationradikal bzw. DPPH-Radikal. Diese werden von den zu untersuchenden Antioxidantien gequenchet. Die Abnahme der im

Test eingesetzten freien Radikale ist ein Maß für die antioxidativen Eigenschaften (AOC) der untersuchten Substanz.

Mit der Annahme, dass aus dem Ligninpolymer wasserlösliche Abbauprodukte unter Erhalt der phenolischen Struktur gebildet werden, wäre eine Zunahme des Gesamtpolyphenolgehaltes und damit der radikaleinfangenden (= antioxidativen) Eigenschaften ableitbar. Im Verlauf der Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Basidiomyceten auf vorbehandeltem Rosmarin, vorbehandelten Erdnussschalen und vorbehandeltem Zimt wurde jedoch keine Zunahme der Radikaleinfangrate und damit keine Zunahme phenolischer Bestandteile erreicht. Es war sogar eine Abnahme der Radikaleinfangrate zu verzeichnen gewesen, d.h., die vorhandenen phenolischen Strukturen wurden durch lignolytische Enzyme abgebaut. Eine Abnahme oder Verlust der Radikaleinfangrate (= AOC) ist gleich zu setzen mit:

- Verlust der phenolischen Hydroxygruppe(n)
- der Ringspaltung des Aromaten.

Lediglich eine temporäre Zunahme der AOC im niedermolekularen Bereich konnte bei den Kultivierungen mit vorbehandelten Erdnussschalen beobachtet werden (siehe 2.2.2.1).

Die Untersuchungen ergaben eine Korrelation (siehe 2.2.1.1) zwischen dem Abbau radikaleinfangender Eigenschaften (AOC), dem Abbau des Gesamtpolyphenolgehalt und der Abnahme der stabilisierenden Wirkung (Verzögerung der Autoxidation) auf 'stripped corn oil'.

3.1.1 Kultivierung mit vorbehandelten Erdnussschalen

Lin et al. (1999) konnten eine Reihe von antioxidativ wirksamen Flavonoiden in Erdnussschalen nachweisen. Hiernach war die Verbindung mit dem höchsten antioxidativen Potenzial Eriodictyol gefolgt von Luteolin. Die AOC wurde mithilfe einer $\text{Cu}^{2+}/\text{O}_2$ -induzierten LDL-Oxidation bestimmt.

Bei der dynamischen Kultivierung mit vorbehandelten Erdnussschalen konnte im Kulturmedium das antioxidativ wirksame Eriodictyol nachgewiesen werden, das bis zum 7. Kulturtag noch messbar war. Neben Eriodictyol macht der wasserlösliche Anteil des Lignins die Radikaleinfangeigenschaften des Kulturmediums aus. Bei den

Kultivierungen von *Lepista irina* konnte ein temporärer Zugewinn an radikaleinfangenden Eigenschaften erzielt werden (Abbildung 2-7). Besonders deutlich war die Zunahme der AOC im Kulturmedium (UF-Permeate) von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* (Abbildung 2-8). Diese Zunahme ist gleichzusetzen mit einer Zunahme von niedermolekularen, phenolischen wasserlöslichen Verbindungen, die durch den Abbauprozess gebildet worden sind. Dastan (1985) zeigte ebenfalls, dass es beim Abbau von Lignin zu einer temporären Bildung von wasserlöslichen Abbauprodukten kam. Die temporäre Bildung von Abbauprodukten wie z.B. Trihydroxymizinsäure war bei *Lepista irina* stärker ausgeprägt als bei *Pleurotus sapidus*. Trihydroxymizinsäure stellt durch seine phenolische Struktur ein potenzielles Antioxidans dar.

3.1.2 Kultivierung mit Sesamschalen

Bei Sesam (*Sesamum indicum*) handelt es sich um eine Ölsaart mit einem Ölgehalt von 50-60%. Sesamöl enthält neben Tocopherolen noch Sesamol (Abbildung 3-5) als ein weiteres Antioxidans (Römpp Lebensmittelchemie, 1995). Weitere Sesaminole, Lignane und Lignanglycoside mit antioxidativen Eigenschaften sind bereits beschrieben worden (Kang et al., 1998; Ryu et al., 1998). Da es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Sesamschalen um extrahierte Sesamschalen handelte, war ein Großteil der antioxidativen Substanzen nicht mehr vorhanden. Dementsprechend wurde bei einem Extrakt aus den vorbehandelten Sesamschalen eine geringere antioxidative Wirkung festgestellt als bei BHT (in einem Lagerversuch mit 'stripped corn oil', Abbildung 2-5). Durch die Kultivierung mit *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* ergab sich ferner ein vollständiger Abbau der phenolischen, antioxidativen Substanzen (Gesamtpolyphenolgehalt, AOC-Test und Lagerstabilitätstest mit 'stripped corn oil').

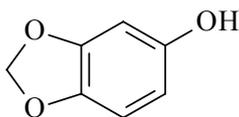


Abbildung 3-5: Sesamol

3.1.3 Kultivierung mit Zimt und Rosmarin

Zimt ist gerbstoffhaltig und weist einen hohen Anteil an Polyphenolen (0,46%) auf (Gerhardt, 1990). Antioxidative Eigenschaften von Zimt sind beschrieben worden (Lee und Shibamoto, 2002). Bei der vorliegenden Arbeit waren trotz eines Vorbehandlungsschritts noch Polyphenole und Gerbstoffe im Zimt vorhanden. Da diese Substanzen für die eingesetzten Basidiomyceten (*Bjerkandera adusta* und *Phanerochaete chrysosporium*) bei Submerskultivierung leicht zugänglich waren, stellten sie ein bevorzugtes Substrat gegenüber dem Ligninpolymer dar. Entsprechend stark war die Abnahme der Radikaleinfangrate (bis zu 90% Rückgang gegenüber dem Kontrollwert BW Zimt).

Auch für Rosmarin sind zahlreiche antioxidative Verbindungen beschrieben worden, (Weinreich, 1989) z.B. Rosmarinsäure (siehe Abbildung 3-6). Rosmarin weist wie Zimt einen hohen Polyphenolgehalt (0,7%) auf (Gerhardt, 1990).

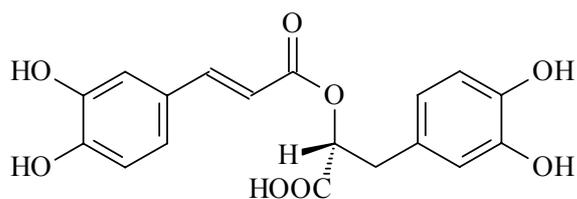


Abbildung 3-6: Rosmarinsäure

Die Substrate von vorbehandeltem Rosmarin und vorbehandeltem Zimt zeichneten sich durch einen hohen anfänglichen Gehalt an antioxidativ wirksamen Substanzen im Kulturmedium aus. Einhergehend mit einer leichten Verfügbarkeit dieser Inhaltsstoffe für die eingesetzten Basidiomyceten waren die Abbauraten der phenolischen Verbindungen entsprechend hoch.

3.1.4 ABTS- und DPPH-Test

Ziel war es in dieser Arbeit, durch den ABTS- bzw. den DPPH-Test eine Tendenz (Zunahme oder Abnahme) der AOC in den Kulturmedien im Vergleich zum BW Substrat zu detektieren. Bei der Ermittlung der AOC-Werte im Ethylacetatextrakt der Kulturmedien von *Phanerochaete chrysosporium* zeigte sich, dass ABTS- und DPPH-Test unterschiedliche AOC-Werte lieferten (siehe 2.2.1.1). Der ABTS-Test lieferte 3- bis 4 fach höhere TEAC-Werte. Bei der Bestimmung der TEAC-Werte von

ausgesuchten Standardsubstanzen. Die unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnisse zwischen DPPH- bzw. ABTS-Radikal und den Antioxidantien machen deutlich, dass hier unterschiedliche Reaktionskinetiken vorliegen. Das Redoxpotenzial von ABTS^{•+} (0,680 V gegenüber der Normalwasserstoffelektrode, Majacherczyk et al., 1999) zeigt, dass das ABTS-Radikal leichter reduziert werden kann als das DPPH-Radikal. Das Redoxpotenzial für DPPH[•] beträgt 1,667 V (Ionita et al., 2000).

Yu et al. (2002) untersuchten die antioxidativen Eigenschaften von Hafer mithilfe des ABTS- und des DPPH-Tests. Die Untersuchungen zeigten, dass je nach eingesetztem Haferprodukt mehr ABTS-Radikale gequenchet wurden und somit zu unterschiedlichen TEAC-Werten führten. Kim et al. (2002) untersuchten die antioxidative Kapazität von Äpfeln mithilfe des ABTS- und des DPPH-Tests. Es zeigte sich, dass der ABTS-Test 1,5-fach höhere VCEAC-Werte (Vitamin C antioxidative Kapazitäts-Äquivalente) in einem Gesamtextrakt der Äpfel lieferte.

Die TEAC-Werte, die man durch den ABTS- und den DPPH-Test erhält, sind nur bedingt direkt miteinander vergleichbar. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass ein einziger Test für die Quantifizierung und den Vergleich der AOC nicht ausreichend ist. Es ist möglich, dass man je nach AOC-Test (ABTS- oder DPPH-Test) zu unterschiedlichen TEAC-Werten gelangt.

3.1.5 Beeinflussung der Bestimmung der AOC durch Laccase-Aktivität

Bei dem Screenen nach antioxidativ wirksamen Substanzen bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* mit ligninhaltigen Substraten (Sesamschalen, Erdnussschalen) konnte im Kulturmedium indirekt Laccase-Aktivität nachgewiesen werden (siehe 2.2). Majcherczyk et al. (1999) zeigten, dass in Gegenwart von Laccase durch eine Ein-Elektronen-Übertragungsreaktion aus ABTS das ABTS-Radikalkation gebildet wird. Vorhandene Antioxidantien mindern bzw. verhindern eine Radikalbildung durch das Abfangen des im Entstehungsprozess befindlichen gebildeten ABTS-Radikalkations. Das ABTS-Reagenz wird ebenfalls für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität verwendet. So kann zum Beispiel durch eine Peroxidase oder Myoglobin und Wasserstoffperoxid aus ABTS das ABTS-Radikalkation gebildet werden.

Der ABTS-Test kann in zwei Varianten eingesetzt werden:

- Es wird erst das ABTS-Radikal gebildet, dann erfolgt die Zugabe des zu prüfenden Antioxidans und die Registrierung der Abnahme der Konzentration des ABTS-Radikals (Berg et al., 1999).
- Das Antioxidans wird bereits bei der Bildung des ABTS-Radikals zugesetzt, d.h., es wird eine im Entstehungsprozess befindliche Radikalbildung vermindert bzw. unterbunden (Miller et al., 1995).

In dieser Arbeit wurde das ABTS-Radikal aus ABTS durch Oxidation mit Kaliumperoxodisulfat gebildet. Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität wird zur chemisch erzeugten ABTS-Radikallösung die Antioxidanslösung (Extrakt aus dem Kulturmedium) hinzugefügt und die Abnahme des ABTS-Radikals nach definierter Zeit registriert. Bei der chemischen Erzeugung ist davon auszugehen, dass kein 100%iger Umsatz des ABTS zum ABTS-Radikal vorliegt. Wenn nun zur Reagenzlösung, die neben $ABTS^{\bullet+}$ auch noch ABTS enthält, laccasehaltiges Kulturmedium (*Lepista irina* oder *Pleurotus sapidus*) zugegeben wird, kann durch die Laccase weiteres ABTS zum ABTS-Radikal umgesetzt werden. Was nun registriert wird, ist eine Zunahme des $ABTS^{\bullet+}$ -Gehaltes im Vergleich zum Blindwert (nur $ABTS^{\bullet+}$ -Lösung). Rein rechnerisch bedeutet dies eine negative Radikaleinfangrate. Die Detektion einer negativen Radikaleinfangrate bei *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* bedeutet einen indirekten Laccasenachweis.

Abbildung 3-7 zeigt, erfolgt die Bildung von $ABTS^{\bullet+}$ aus ABTS durch die Aufnahme eines Elektrons.

Um die AOC in laccasehaltigen Kulturmedien bestimmen zu können, ist eine Abtrennung der Laccase - zum Beispiel durch Ultrafiltration - notwendig.

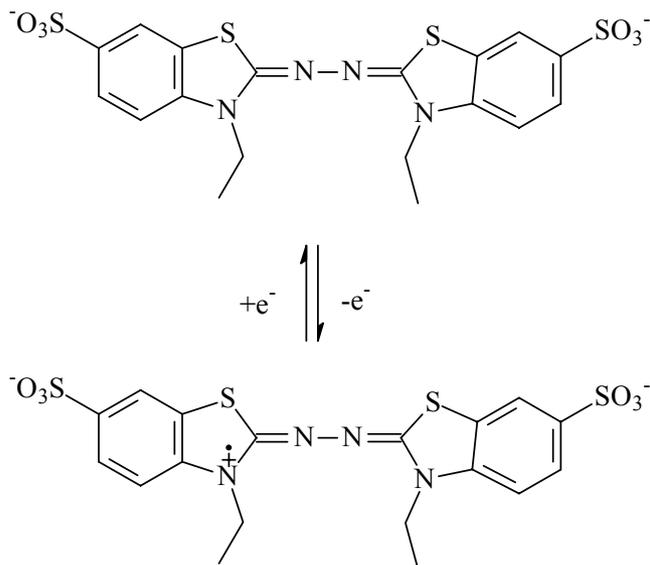


Abbildung 3-7: Bildung des ABTS-Kationradikals (unten) aus ABTS (oben) durch Laccase

3.2 Beeinflussung und Steigerung der lignolytischen Aktivitäten

3.2.1 Lignolytische Enzymaktivitäten

Für den Abbau von Lignin ist das Zusammenwirken einer Reihe von Enzymen verantwortlich: Peroxidasen (Lignin- und Mangan-), Laccase und weitere Enzyme wie zum Beispiel Oxidoreduktasen, Glucoseoxidasen, Glyoxaloxidasen, Arylalkoholoxidasen (Hofrichter und Steinbüchel, 2001). Leonowicz et al. (1999, b) zeigten, dass beim Abbau von 'Björkman Lignin' und von verschiedenen phenolischen Verbindungen ein Zusammenhang zwischen Glucoseoxidase- und Laccase-Aktivität einerseits und der lignolytischen Aktivität andererseits besteht. Es wurden 26 verschiedene Basidiomycetenstämme bezüglich ihrer Enzymaktivitäten und ihrer lignolytischen Aktivitäten getestet. Pilze, die keine GOD aufwiesen, zeigten auch keine Abbauaktivitäten (Leonowicz et al., 1999, b).

In der vorliegenden Arbeit zeigten *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* bei den Kultivierungen mit Erdnussschalen Glucoseoxidase- und Laccase-Aktivität, ebenfalls war ein Abbau von Lignin und von Flavonoiden zu beobachten.

Die Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* mit verschiedenen Erdnussschalensubstraten und Kultivierungstechniken (unbehandelte Erdnussschalen, vorbehandelte Erdnussschalen mit Enzymzusatz und Erdnussschalenextrakt; dynamische und statisch-dynamische Kultivierung) zeigten

deutliche Unterschiede bezüglich der Laccase-Aktivitäten. Wie bei der Ligninabbaurate war auch bei der Laccase-Aktivität ein Zusammenhang zwischen der Kultivierungstechnik (Mycel-Substrat-Bindung) und Enzymaktivität erkennbar (siehe 3.2.2). Dies zeigte sich bei der statisch-dynamischen Kultivierung von *Pleurotus sapidus* im Vergleich zur rein dynamischen Kultivierung. Eine feste Mycel-Substrat-Bindung, die durch den statischen (ersten) Kultivierungsschritt erreicht wurde, war mit höheren lignolytischen Aktivitäten verbunden als eine lose Mycel-Substrat-Bindung (wie den rein dynamischen Kultivierungen, Tabelle 2-7 und 2-12). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von leicht zugänglichen phenolischen Bestandteilen wie z.B. Flavonoiden (Eriodictyol, 5,7-Dihydroxychromen-4-on, Luteolin), Vanillin und Vanillinsäure mit höheren Laccase-Aktivitäten verbunden ist. Besonders deutlich wurde dies bei den Kultivierungen mit vorbehandelten Erdnussschalen. Durch den Vorbehandlungsschritt (Extraktion) war der Gehalt an leicht zugänglichen phenolischen Bestandteilen deutlich geringer als bei den unbehandelten Schalen. Dies spiegelte sich auch bei den Laccase-Aktivitäten von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* wieder. So betrug bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit vorbehandelten Erdnussschalen (extrahierte Erdnussschalen) die Laccase-Aktivität maximal 36% des Laccase-Maximums, das bei der Kultivierung mit unbehandelten Erdnussschalen erreicht wurde. Bei den Kultivierungen von *Lepista irina* mit vorbehandelten Erdnussschalen lag die maximale Laccase-Aktivität lediglich bei 20% der Aktivität bei den Kultivierungen mit unbehandelten Erdnussschalen (keine Extraktion). Ein Enzymzusatz (Xylanase, Amyloglucosidase und α -Amylase) bewirkte bei den Kultivierungen mit vorbehandelten Erdnussschalen eine weitere Freisetzung von Vanillin und Flavonoiden. Dies zeigte sich in deutlich höheren Laccase-Aktivitäten (bei *Lepista irina* 126% Zunahme im Vergleich zur Kultivierung ohne Enzymzusatz, bei *Pleurotus sapidus* 70% Zunahme). (Tabelle 2-5 und Tabelle 2-6) zeigen eine Übersicht über die maximalen erreichten Laccase-Aktivitäten.

Bei der Kultivierung von *Lepista irina* mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt konnten die höchsten Laccase-Aktivitäten erreicht werden (360% Zunahme im Vergleich zu den Kultivierungen mit unbehandelten Erdnussschalen). Diese Steigerung der Laccase-Aktivität lässt sich mit einer leichteren Verfügbarkeit der aromatisch-phenolischen Verbindungen erklären (Tabelle 2-6).

Mai et al. (2000) zeigten eine stabilisierende Wirkung von phenolischen Verbindungen (Phloroglucin, 3,5-Dihydroxybenzoesäure etc.) auf die Laccase-Aktivität von *Trametes versicolor*. Rubia et al. (2002) zeigten, dass durch Vanillin und p-Hydroxybenzaldehyd die Laccase-Aktivität von *Phanerochaete flavid-alba* am effizientesten gesteigert werden konnte. Eine Induktion von Laccase und Manganperoxidase bei *Phanerochaete flavid-alba* durch phenolische Verbindungen aus der Olivenölproduktion konnte durch Perez et al. (1998) sowie durch Ruiz et al. (2002) gezeigt werden.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit haben bestätigt, dass niedermolekulare Verbindungen eine Rolle bei den lignolytischen Aktivitäten spielen. Sie fungieren als Mediatoren im Ligninabbau. In der Literatur sind zahlreiche solcher Mediatoren beschrieben: Veratrylalkohol, Oxalsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure etc. (Leonowicz et al., 1999). Die Funktion der Verbindungen sind unterschiedlich. So chelatisieren zum Beispiel Säuren wie Fumar-, Oxal- oder Malonsäure Mn^{3+} -Ionen, die als Oxidantien bei der Mangan-Peroxidase eine wichtige Rolle spielen. Niedermolekulare Phenole spielen eine wichtige Rolle zur Erzeugung von Phenoxyradikalen. Abbildung 3-8 zeigt anhand des Manganperoxidase-Systems die Funktion von niedermolekularen Verbindungen.

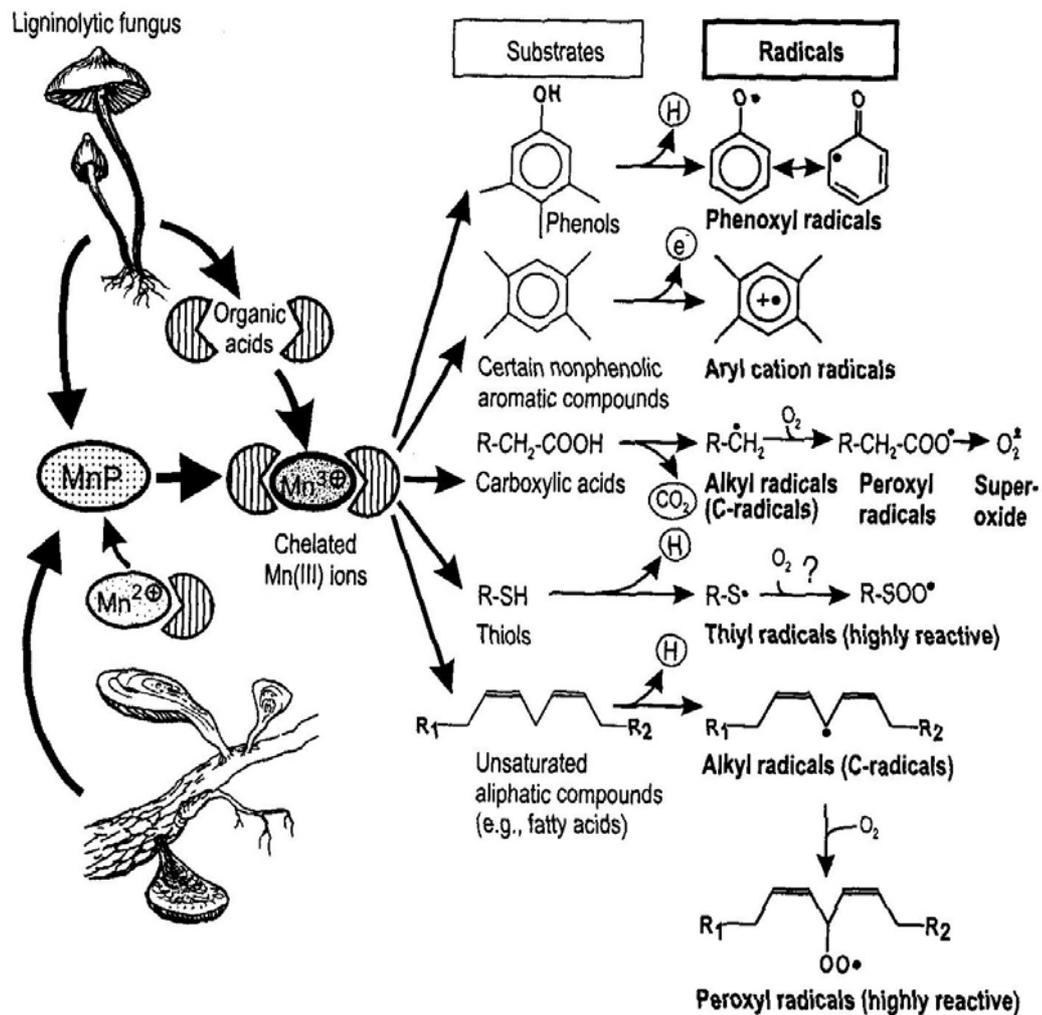


Abbildung 3-8: Reaktionsmechanismus für den mikrobiellen Ligninabbau durch Manganperoxidase (Hofrichter und Steinbüchel, 2001)

3.2.2 Bestimmung des Ligningehaltes und der Ligninabbaurate

Um den Abbau ligninhaltiger Substrate (insbesondere Erdnusschalen) durch Basidiomyceten (z.B. *Pleurotus sapidus*) quantifizieren zu können, war es notwendig, eine für dieses komplexe System adäquate Ligninbestimmungsmethode zu etablieren. Es existieren zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Quantifizierung von Lignin in pflanzlichem Material beschäftigen. Bei den direkten Bestimmungsmethoden handelt es sich um gravimetrische Verfahren. Ein gravimetrisches Verfahren zur Bestimmung des Ligningehaltes ist die Klason-Methode, bei der die Probe nach mehreren Extraktionsschritten und Behandlung mit 72%iger

Schwefelsäure zur Hydrolyse und Auflösung der Kohlenhydratbestandteile behandelt wird. Die Ermittlung des Ligningehaltes erfolgt durch die Differenzbildung zwischen Einwaage und Auswaage nach den Behandlungsschritten (Dence und Lin, 1992). Der Nachteil dieser standardisierten Methode ist der hohe Zeitaufwand, bedingt durch die vielen Extraktionsschritte. Zudem handelte es sich bei den Untersuchungsproben der vorliegenden Arbeit um ein schwer trennbares Gemisch aus Substratpulver und Pilzmycel. Das Pilzmycel besteht zum großen Teil aus Chitin und Protein (Schlegel, 1992). Chitin ist in Wasser, organischen Lösungsmitteln sowie verdünnten Säuren und Laugen unlöslich. Durch starke Säuren findet eine Hydrolyse in D-Glucosamin und Essigsäure statt (Römpp, 1989). Durch die oben genannte Klason-Methode werden unter anderem auch Strukturproteine miterfasst (Bunzel et al., 2003), die bei der Ligninbestimmung störend sind, sodass die Klason-Methode für die hier vorliegende Aufgabenstellung nicht geeignet war.

Neben den direkten existieren eine Reihe indirekter Ligninbestimmungsmethoden: spektroskopische Methoden (NMR, UV etc.), chemische Summenparameter (Kappa-Nummer, Permanganat-Nummer, Chlor-Nummer) (Dence und Lin, 1992). Die Acetylbromid-Methode erwies sich als die praktikabelste Methode, da sie ohne großen instrumentellen Aufwand, ohne Kalibrierung und mit kleinen Probenmengen durchführbar ist.

Bei der Bestimmung des Ligningehaltes im Filtrerrückstand (Erdnussschalen und Pilzmycel) zeigte sich ein störender Einfluss des Mycels von *Pleurotus sapidus* (siehe 2.3.2). Neben Chitin enthält das Mycel auch Melanine und Proteine. Yoshida et al. (1996) haben die Zusammensetzung verschiedener Basidiomycetenstämme untersucht. So betrug der Rohproteingehalt zwischen 28,4% und 44,6%, bezogen auf die Trockenmasse. Durch Behandlung des Filtrerrückstands mit Acetylbromid und Perchlorsäure gehen Proteine und Melanine in Lösung und werden dadurch spektrophotometrisch bei 280 nm miterfasst und täuschen so einen höheren Ligningehalt vor.

Es lässt sich vermuten, dass auch durch den Trocknungsprozess des Filtrerrückstands aus Aminokomponenten (Proteine) und Carbonylgruppen (Zellwandbestandteile) durch die Maillard-Reaktion Melanoide entstehen. Diese können ebenfalls einen Beitrag zum 'Ligningehalt' leisten. Durch die Behandlung des Filtrerrückstands nach einer modifizierten Methode nach Hatfield (1999) konnten die störenden Einflüsse des Mycels beseitigt werden.

Mit der Ligningehaltsbestimmung nach Dence und Lin (1992) wurde bei den hier eingesetzten Erdnussschalen ein 'Ligningehalt' von 35% ermittelt. Da Erdnussschalen neben Lignin und Cellulose auch noch Xylane sowie Protein (letzteres bis zu 8% nach Kerr et al., 1986) enthalten, werden diese bei der Ligningehaltsbestimmung nach Dence und Lin miterfasst. Mit der modifizierten Ligninbestimmungsmethode nach Hatfield (1999) wurde für die Erdnussschalen ein "bereinigter Ligningehalt" von 32% ermittelt. Dieser Wert liegt innerhalb des Bereichs, der in der Literatur angegeben wird: Childs und Abajian (1976) geben für Erdnussschalen einen Ligningehalt von 34,6% an. Der Ligningehalt schwankt zwischen 23% und 32% je nach Varietät und Erntezeitpunkt (Kerr et al., 1986).

Wie bei der Laccase-Aktivität war auch bei der Ligninabbaurate ein Zusammenhang zwischen Mycel-Substrat-Bindung und lignolytischer Aktivität erkennbar. Für Kultivierungen nach dem statisch-dynamischen Kultivierungsverfahren lagen die Ligninabbauraten um mehr als 100% über den Abbauraten bei den dynamischen Kultivierungen. Bei den statisch-dynamischen Kultivierungen lag ein intensiver Substrat-Mycel-Kontakt vor. Das Substrat war vollständig vom Mycel umschlossen. Hingegen war bei den dynamischen Kultivierungen keine feste Bindung zwischen Mycel und Substrat gegeben (Tabelle 2-8).

Die in der Literatur beschriebenen Abbauraten sind nur eingeschränkt mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten vergleichbar, da:

- unterschiedliche Basidiomycetenstämme,
- unterschiedliche ligninhaltige Substrate oder
- unterschiedliche Substratformen (festes Substrat, Ligninextrakt oder -suspension) eingesetzt worden sind.

Tabelle 3-1 zeigt die Ligninabbauraten bei unterschiedlichen Substraten, Basidiomyceten und unterschiedlicher Kulturführung.

Tabelle 3-1: Ligninabbauraten verschiedener Basidiomyceten

Organismus	Substrat / Kulturführung	Abbaurate / Bestimmungsmethode	Literatur
<i>Pleurotus sapidus</i>	Erdnussschalen, dynamische Kultivierung	12% in 28 d, modifizierte Acetylbromid-Methode	vorliegende Arbeit
<i>Pleurotus sapidus</i>	Erdnussschalen, statisch-dynamische Kultivierung	25% in 28 d, modifizierte Acetylbromid-Methode	vorliegende Arbeit
<i>Coriolus versicolor</i>	Erdnussschalen, statische Kultivierung	26% in 90 d	Kerr et al., 1986
<i>Polyporus versicolor</i>	LPA-Suspension ¹⁵ , statische Kultivierung	bis zu 50% in 11 d, GPC	Dastan, 1985
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Birkenholz	8% in 8 Wochen, GPC und ¹³ C-NMR	Tai et al., 1990
<i>Pleurotus eryngii</i>	Weizenstroh, solid-state-Fermentation, Zufuhr von Luft	47% in 80 d, Py-GC/MS	Camarero et al., 1997
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Weizenstroh, solid-state-Fermentation, Zufuhr von Luft	45% in 30 d, Py-GC/MS	Camarero et al., 1997
<i>Nematoloma frowardii</i>	¹⁴ C-markiertes Weizenstrohlignin	9,7% in 6 d, ¹⁴ CO ₂ -Bildung	Hofrichter et al., 1999
<i>Pleurotus sapidus</i>	Organosolv-Lignin ¹⁶	90% in 3 d, säureunlösliches Lignin	Abraham, 1994

Das Verhältnis zwischen Coniferyl- und Sinapinalkohol sowie die Verknüpfungsart (siehe Abbildung 3-9) sind maßgebend für die Unterscheidung zwischen dem Lignin der Gymnospermen (Weichholz), Angiospermen (Hartholz) und Monokotyledonen (Gräsern).

¹⁵ hydrothermal isoliertes Birkenholzlignin

¹⁶ etherunlösliches Organosolv-Lignin

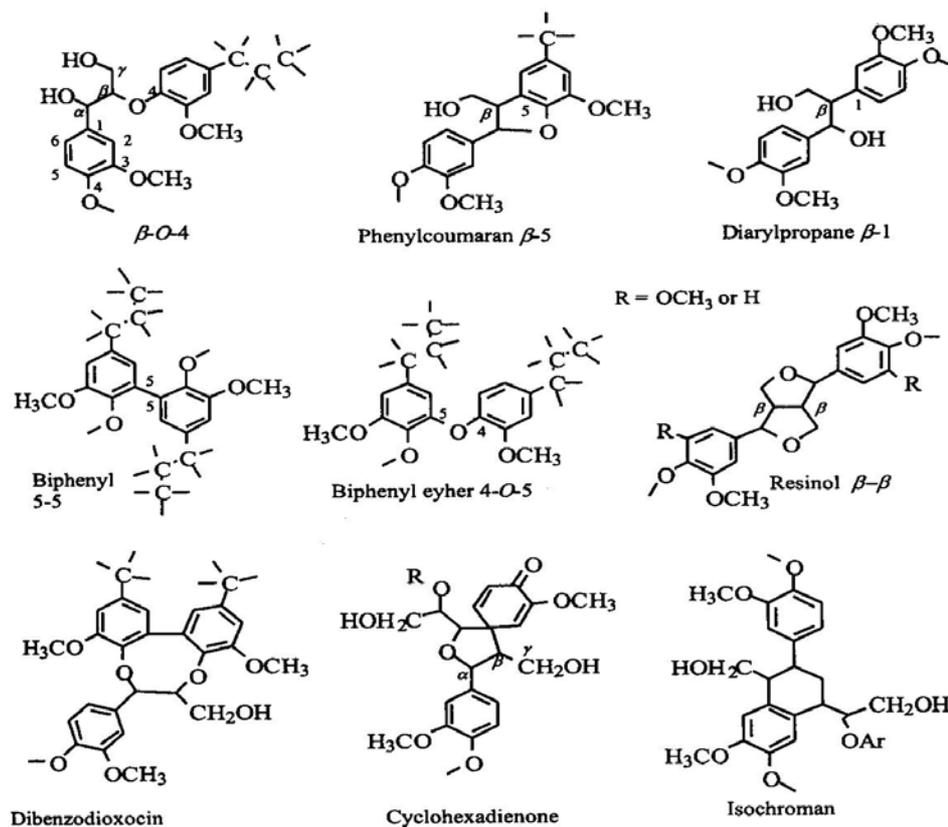
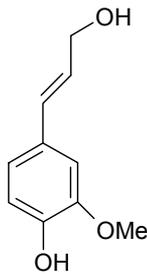
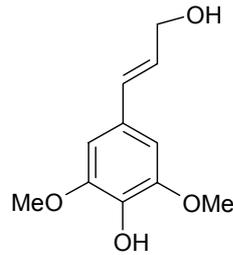


Abbildung 3-9: Übersicht der Bindungsarten und dimeren Ligninstrukturen (Hofrichter und Steinbüchel, 2001)

Der Unterschied zwischen Angiospermen- und Gymnospermenlignin zeigt sich in der Zusammensetzung der Coniferyl- und Syringyleinheiten (siehe Abbildung 3-10). Gymnospermenlignin setzt sich aus Coniferyleinheiten zusammen, während sich Angiospermenlignin aus Coniferyl- und Syringyleinheiten zusammensetzt (Adler, 1977). Faix et al. (1985) zeigten, dass *Phanerochaete chrysosporium* und weitere Basidiomyceten bevorzugt Syringyleinheiten im Lignin gegenüber Coniferyleinheiten, die resistenter gegenüber einem Abbau sind, abbauen. Durch die Ermittlung des Verhältnisses von Syringyl zu Vanillin zeigten Sato et al. (1972), dass es sich bei Erdnussschalenlignin um Gymnospermenholz handelt. Erdnussschalen setzen sich nahezu vollständig aus Coniferyleinheiten zusammen und stellen somit eine weniger bevorzugte Ligninquelle für Basidiomyceten dar. Es konnte dennoch ein Ligninabbau von 25% innerhalb von vier Wochen erreicht werden (Tabelle 2-8).



Coniferylalkohol: Guaiacyltyp (G)



Sinapylalkohol: Syringyltyp (S)

Abbildung 3-10: Coniferyl- und Syringylligninbindungstyp

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass entsprechend hohe lignolytische Enzymaktivitäten mit entsprechenden Ligninabbauraten korrelieren. Durch leicht verfügbare niedermolekulare, phenolische Verbindungen und durch eine statisch-dynamische Kulturführung kann eine effiziente Steigerung der Enzymaktivitäten (Laccase) erreicht werden, die wiederum für eine kommerzielle Produktion von lignolytischen Enzymen genutzt werden könnte.

3.3 Abbau von niedermolekularen Inhaltsstoffen im Erdnussschalpulver durch Basidiomyceten

Bei den Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* mit Erdnussschalpulver und ethanolischem Erdnussschalenextrakt konnten eine Reihe von Abbauprodukten nachgewiesen werden. Zum Teil entstanden die Abbauprodukte aus niedermolekularen Verbindungen der Erdnussschalen. Ein Teil der Abbauprodukte ist aus dem Ligninpolymer ableitbar.

3.3.1 Inhaltsstoffe der Erdnussschalen

Als Hauptinhaltsstoffe der Erdnussschalen im niedermolekularen Bereich wurden aromatischen Verbindungen wie Flavonoide, Vanillin und Vanillinsäure nachgewiesen (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Gehaltsangaben zu niedermolekularen Inhaltsstoffen in Erdnussschalen

Verbindung	Ermittelter Gehalt [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen]	Gehalt Literatur [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen]	Quelle	Strukturformel
5,7-Dihydroxy- chromen-4-on	122		--	Abbildung 3-13
Eriodictyol	608		--	Abbildung 3-12
Luteolin	832	750 bis 3160	Yen et al., 1995	Abbildung 3-11
Vanillin	56	78	Sobolev, 2001	Abbildung 3-14
Vanillinsäure	24		--	Abbildung 3-14

Es handelt sich bei Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon) um ein Flavon, das in verschiedenen Pflanzen vorkommt. Luteolin weist neben antioxidativen zahlreiche physiologische sowie bioaktive Eigenschaften auf (Shimoi et al., 1998; Karakaya et al., 1999; Lu et al., 1999). Bei den Submerskultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* und im Kontrollwert BW Erdnussschalen konnte Luteolin im Filtrerrückstand bestimmt werden. Im Ethylacetatextrakt des Kulturmediums lag Luteolin unterhalb der Nachweisgrenze. Dies lässt sich mit der schlechten Wasserlöslichkeit von Luteolin erklären (Römpp Naturstoffe, 1997).

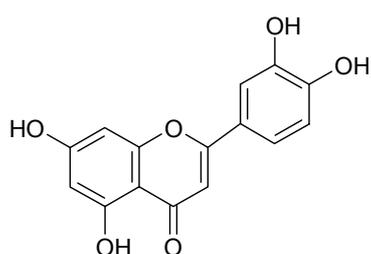


Abbildung 3-11: Luteolin

Bei Eriodictyol (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanon) handelt es sich um ein Flavanon, das antioxidative Eigenschaften aufweist und ebenfalls in Erdnussschalen nachgewiesen wurde (Lin et al., 1999). Eriodictyol ist in unreifen Erdnussschalen das dominierende Flavonoid, während Luteolin in reifen Erdnussschalen dominiert (Daigle et al., 1988). Bei den Kultivierungen und im Kontrollwert BW Erdnussschalen zeigte sich, dass Eriodictyol sowohl im Filtrerrückstand als auch im Ethylacetatextrakt des

Kulturmediums (14% vom Gesamtgehalt) nachweisbar war – im Gegensatz zu Luteolin. Eriodictyol unterscheidet sich von Luteolin durch das Fehlen einer Doppelbindung in Ring C. Der logP-Wert von Luteolin liegt bei 2,53, der logP-Wert von Eriodictyol bei 2,13 (Syracuse Research Cooperation). Angaben über die Wasserlöslichkeit von Eriodictyol und Luteolin liegen nicht vor.

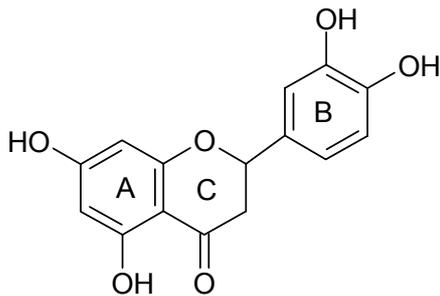


Abbildung 3-12: Eriodictyol

Knapp 82% des 5,7-Dihydroxychromen-4-ons waren im Kulturmedium zu finden. 5,7-Dihydroxychromen-4-on weist phytotoxische und antimikrobielle Eigenschaften gegenüber *Rhizoctonia solani* und *Sclerotium rolfsii* auf und wurde in Erdnussschalen nachgewiesen. Bei 5,7-Dihydroxychromen-4-on handelt es sich um ein Flavonoid-Abbauprodukt (Vaughn et al., 1995; DeLucca et al., 1987).

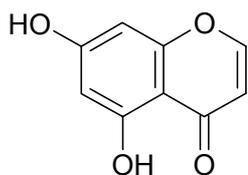
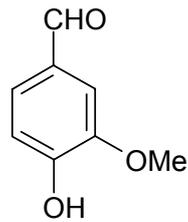
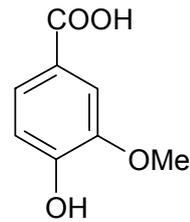


Abbildung 3-13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on

Vanillin und Vanillinsäure (siehe Abbildung 3-14) wurden in den Erdnussschalen nachgewiesen. Knapp 80% der Gehalte von Vanillin und Vanillinsäure waren im Kulturmedium zu finden.



Vanillin



Vanillinsäure

Abbildung 3-14: Vanillin und Vanillinsäure

Eine Reihe weiterer aromatischer Verbindungen konnte außerdem im Verlauf dieser Arbeit identifiziert werden (siehe Tabelle 2-9). Javor et al. (2000) konnten mittels Capillarelektrophorese (CZE) eine Reihe phenolischer und nicht phenolischer Holzabbauprodukte bestimmen. Holz wurde mit NaOH bei 170 °C behandelt. Als Abbauprodukte konnten u.a. 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin, Acetovanillin, Syringaaldehyd und Acetovanillon nachgewiesen werden (Javor et al., 2000). Maman et al. (1996) wiesen ebenfalls eine Reihe von chemisch erzeugten Ligninabbauprodukten (CuO-Oxidation bei 150 °C) nach. Durch CZE konnten Ferulasäure, p-Cumarsäure, Syringasäure, Vanillinsäure, p-Hydroxybenzoesäure, Acetosyringon, Acetovanillon, p-Hydroxyacetophenon, Syringaaldehyd, Vanillin und p-Hydroxybenzaldehyd quantifiziert werden. Alle diese Abbauprodukte (außer Acetosyringon) waren hier auch in den Erdnussschalen zu finden.

In den Erdnussschalen konnte 5-Hydroxymethyl-2-furalaldehyd (HMF, siehe Abbildung 3-15) nachgewiesen werden, ein Reaktionsprodukt der Holzverzuckerung (Römpf, 1989). Durch den Röstprozess sowie durch Autoklavieren der Erdnussschalen kann HMF als Reaktionsprodukt entstanden sein. In der Literatur ist HMF als Inhaltsstoff von Erdnussschalen bisher nicht beschrieben worden.

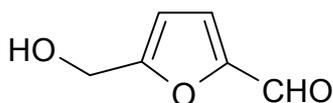


Abbildung 3-15: 5-Hydroxymethyl-2-furalaldehyd (HMF)

3.3.2 Abbau der Inhaltsstoffe von Erdnussschalen

Bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt zeigte sich bereits 5 h nach der Substratzugabe eine Zunahme des Vanillinsäuregehaltes (siehe Tabelle 2-15). Bei dem Abbau von Lignin sind zahlreiche oxidative Enzyme (Ligninperoxidasen, Manganperoxidase, Laccase etc.) beteiligt (Leonowicz et al., 1999). Durch die Beteiligung solcher Exoenzyme ist eine Oxidation von Vanillin zu Vanillinsäure möglich (siehe Abbildung 3-16). 24 h nach der Substratzugabe waren Vanillin und Vanillinsäure nicht mehr nachweisbar.

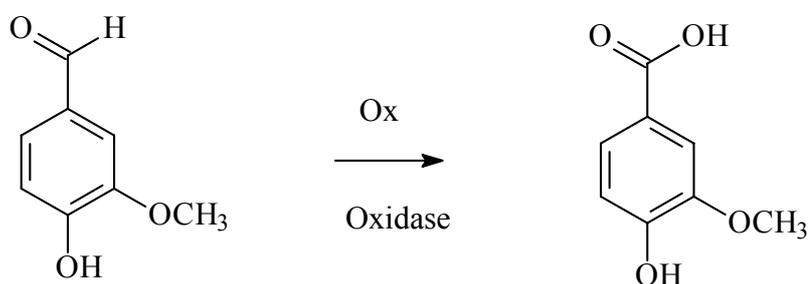


Abbildung 3-16: Oxidation von Vanillin zu Vanillinsäure

Es zeigte sich ebenfalls 5 h nach der Substratzugabe (ethanolischer Extrakt) eine Zunahme des 5,7-Dihydroxychromen-4-on-Gehaltes gegenüber BW Erdnussschalen. Es es ist davon aus zu gehen, dass Luteolin unter Beteiligung von lignolytischen Enzymen zu 5,7-Dihydroxychromen-4-on abgebaut wird, welches wiederrum schon nach kurzer Zeit vollständig verstoffwechselt wird.

Bei Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* mit Erdnussschalen konnte 2,5-Furandicarbonsäure als Abbauprodukt nachgewiesen werden. Im Gegenzug dazu war 5-Hydroxymethyl-2-furalaldehyd (HMF) im weiteren Verlauf der Kultivierungen nicht mehr nachweisbar. Dies lässt den Schluss zu, dass HMF durch oxidative Enzyme zu 2,5-Furandicarbonsäure oxidiert wurde (siehe Abbildung 3-17). Masselter et al. (1995) konnten 2,5-Furandicarbonsäure als thermisch-oxidativ erzeugtes Abbauprodukt von Weizenstroh / Zuckerrohrrückstand per CZE nachweisen.

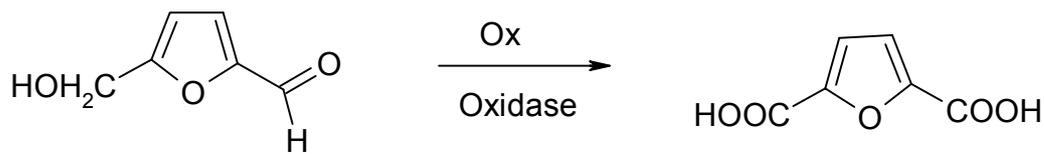


Abbildung 3-17: Postulierter Bildungsweg von 2,5-Furandicarbonsäure

Bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* wurde gezeigt, dass die monomeren Bestandteile der Erdnussschalen (Vanillin, Vanillinsäure, Eriodictyol etc.) schon nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar waren. Die Abbauraten der verschiedenen monomeren Verbindungen waren abhängig von der Kultivierungstechnik (dynamisch, statisch-dynamisch), der Substratdarreichungsform (Erdnussschalenextrakt, vorbehandelte und unbehandelte Erdnussschalen) und von den eingesetzten Basidiomyceten (*Pleurotus sapidus*, *Lepista irina*). Bei den Kultivierungen mit Erdnussschalenextrakt zeigte sich der effizienteste Abbau (Tabelle 2-12). Dies lässt sich mit der einfachen Verfügbarkeit des Substrates erklären.

Der wesentlich bessere Mycel-Substrat-Kontakt bei der statisch-dynamischen Kultivierung ist mit höheren lignolytischen Aktivitäten verbunden. Dies zeigte sich bei der Laccase-Aktivität und den Abbauraten ausgewählter Verbindungen (Vanillin, Vanillinsäure, 5,7-Dihydroxychromen-4-on, Eriodictyol und Luteolin). Besonders deutlich wurde dies bei der Kultivierung von *Lepista irina* mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt. Es wurden hierbei die höchsten Laccase-Aktivitäten von knapp $900 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht. Sämtliche monomeren Hauptbestandteile des Erdnussschalenextrakts waren 24 h nach der Substratzugabe nicht mehr nachweisbar. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Aktivität dieses Biosystems.

Durch die Extraktion der Erdnussschalen mit Ethanol wird neben den Flavonoiden (5,7-Dihydroxychromen-4-on, Eriodictyol und Luteolin) auch ein Teil des Gesamtlignins extrahiert. Bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* mit Erdnussschalenextrakt lag das Lignin als Lösung bzw. als Suspension vor. Im Gegensatz dazu war bei den Kultivierungen mit Erdnussschalenpulver ein Teil des Lignins und der Flavonoide für *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* direkt verfügbar. Dies wurde besonders deutlich in dem unterschiedlichen Abbauverhalten im Kulturmedium und im Filtrerrückstand, in dem die Inhaltsstoffe für den Pilz schwerer zugänglich sind (siehe Anhang, 6.4).

Es ist im Verlauf der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* zum Abbau von niedermolekularen phenolischen und antioxidativ wirksamen Verbindungen gekommen. Diese Verbindungen stellen durch ihre leichte Verfügbarkeit ein bevorzugtes Substrat gegenüber dem Ligninpolymer für den Pilz dar.

3.4 Identifizierung von Ligninabbauprodukten und hypothetischer Abbauweg

3.4.1 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure

Bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* (siehe 2.5.4) mit unterschiedlichen Erdnussschalensubstraten (Erdnussschalenextrakt, unbehandelte und vorbehandelte Erdnussschalen im statisch-dynamischen Kulturverfahren) konnte mittels HPLC-MS und GC-MS Trihydroxyzimtsäure (siehe Abbildung 3-18) als Abbauprodukt nachgewiesen werden. Der maximale Gehalt betrug bis zu $188 \mu\text{g}\cdot(100 \text{ mL})^{-1}$ (24 h nach Substratzugabe). Trihydroxyzimtsäure war jedoch nur ein Zwischenprodukt im Verlauf des Abbauprozesses, das einem weiteren Abbau unterlag und gegen Ende der Kultivierung nicht mehr nachweisbar war. Bei der Kultivierung von *Lepista irina* mit Erdnussschalenextrakt war die Bildung von Trihydroxyzimtsäure am stärksten ausgeprägt.

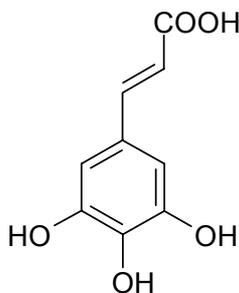


Abbildung 3-18: E-3,4,5-Trihydroxyzimtsäure

Crestini et al. (1996) inkubierten Ferulasäure mit einem exoenzymhaltigen Rohextrakt von *Lentinus edodes*. Im Verlauf der Inkubation wurde 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure durch einen Demethylierungs- und Hydroxylierungsschritt gebildet. Es erfolgte jedoch unter Ringspaltung ein weiterer Abbau zu Hepta-2-oxo-3,5-dien-1,7-dicarbonsäure, deren Bildung nicht bis ins letzte Detail aufgeklärt werden konnte. Ausgehend von E-Ferulasäure wurde durch Isomerisierung Z-Ferulasäure gebildet. GC-MS-Untersuchungen identifizierten Z-4,5-Dihydroxy-3-methoxyzimtsäure

(Hydroxylierungsprodukt von Ferulasäure) als primäres Abbauprodukt neben zwei Dimerisierungsprodukten. Durch Demethylierung der 3-Methoxygruppe entstand 3,4,5-Trihydroxyzimtsäure (siehe Abbildung 3-19). Crestini et al. (1996) zeigten, dass bereits 30 min nach der Substratzugabe ein Ferulasäureabbau von 30% zu verzeichnen war. Nach 72 h konnte keine Ferulasäure mehr nachgewiesen werden. Im Verlauf der Kultivierung von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* mit Erdnussschalen bzw. Erdnussschalenextrakt konnte Ferulasäure nicht nachgewiesen werden.

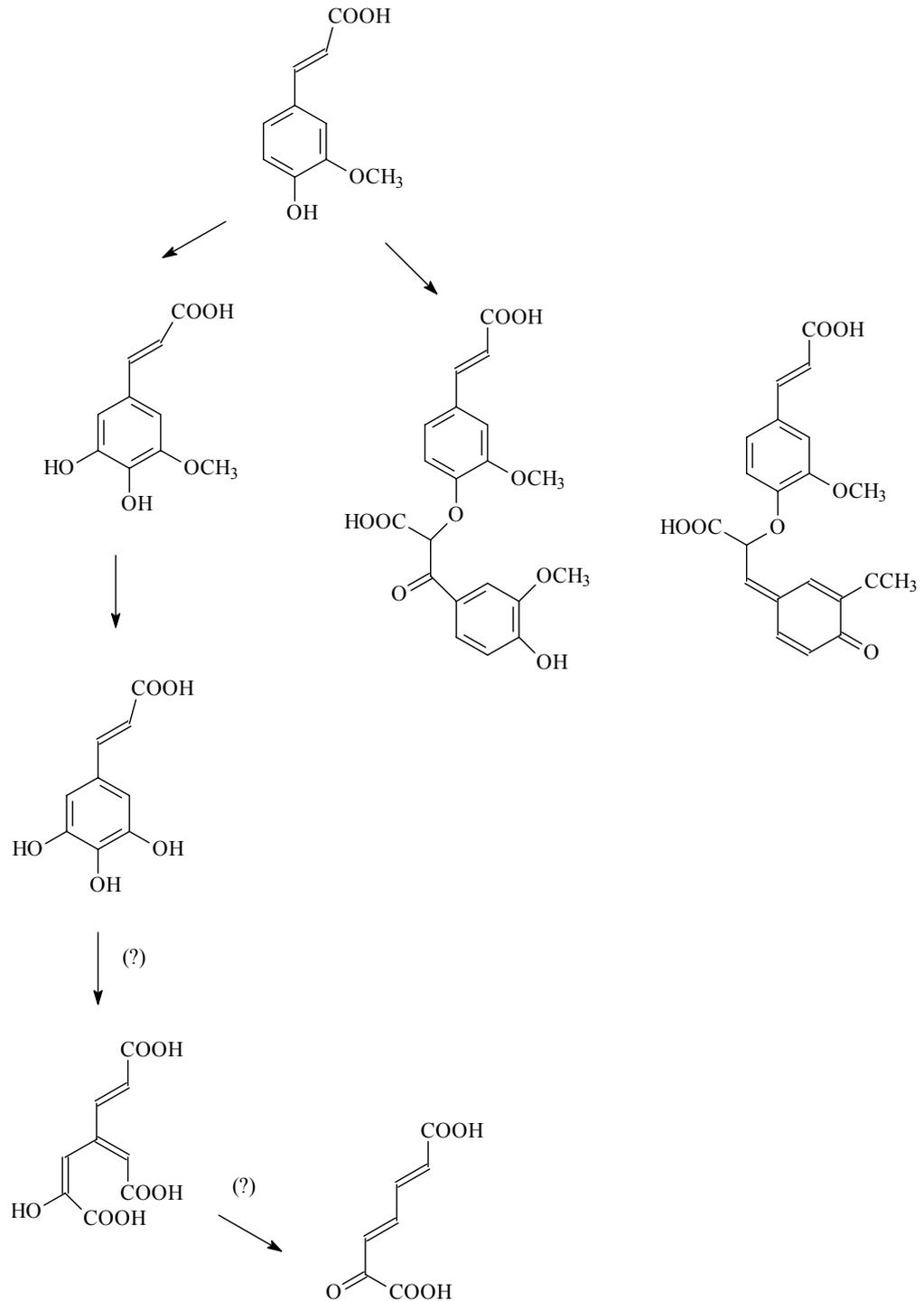


Abbildung 3-19: Metabolismus von Ferulasäure mit einem Exoenzymrohextrakt von *Lentinus edodes* nach Crestini et al. (1996)

Weitere von Crestini et al. (1996) beschriebene Abbauprodukte der Ferulasäure konnten bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* mit Erdnussschalen ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und von *Lepista irina* wurden jedoch keine Modellverbindungen eingesetzt. Es wurde natürlich vorkommende Lignocellulose oder ein ethanolischer Ligninextrakt als Substrat eingesetzt. Das Lignin der Erdnussschalen besteht fast ausschließlich aus Coniferylleinheiten. Eine β -Oxidation der Seitenkette konnte nicht beobachtet werden. Krings et al. (2001) zeigten, dass es bei dem Abbau von Ferulasäure durch *Pycnoporus cinnabarinus* zuerst in einem der β -Oxidation von Fettsäuren analogem Weg zur Verkürzung der Seitenkette um 2 C-Atome und durch Decarboxylierung zur Bildung von 2-Methoxychinon kommt. Anschließend kommt es zur oxidativen Ringöffnung und letztendlich zum vollständigen Katabolismus. Dieser postulierte Weg in *Pycnoporus cinnabarinus* wurde durch Submerskultivierung mit [5- 2 H] markierter Ferulasäure belegt. Als Abbauprodukte der Phenylpropanseitenkette der Ferulasäure konnten neben Vanillin, Vanillinsäure, E-Coniferylalkohol, E-Coniferylaldehyd und Vanillinalkohol nachgewiesen werden. Es konnten ebenso vier Lignanene als Dimerisierungsprodukte der Ferulasäure nachgewiesen werden (Krings et al., 2001).

Die Untersuchungen von *Pleurotus sapidus* und von *Lepista irina* mit Erdnussschalen und Erdnussschalenextrakt haben gezeigt, dass ein möglicher Abbauweg des Ligninpolymers erst über Demethylierungs- und Hydroxylierungsreaktionen am Ring verlief, bevor es zu einer Abspaltung der Seitenkette vom Ligninpolymer kam (Abbildung 3-20).

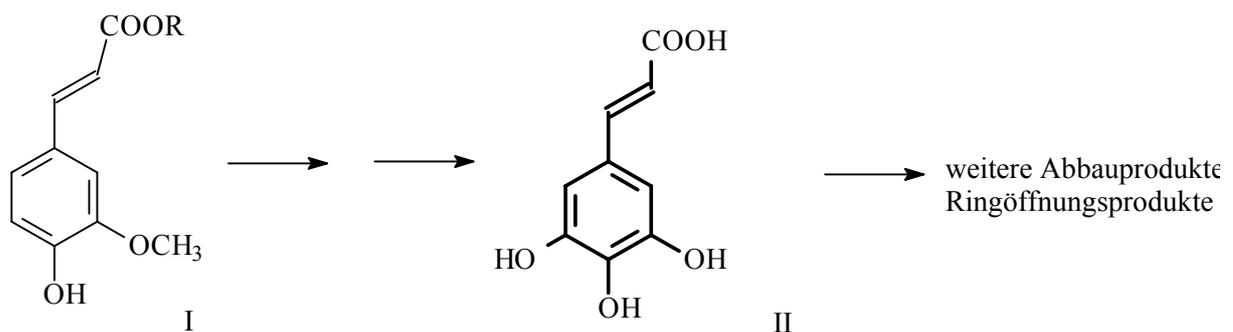


Abbildung 3-20: Hypothetischer Abbauweg von Ligninconiferylleinheiten (I) in Erdnussschalen über das Intermediat 3,4,5-Trihydroxycinnamsäure (II), R: Ligninpolymer

3.4.2 Hydroxycumarin und strukturell verwandte Stoffe

Crestini et al. (1996) untersuchten mit dem Weißfäulepilz *Lentinus edodes* in zellfreier Kulturführung den Abbau von löslicher Lignocellulose. Bei der Inkubation

von Lignocellulose mit einem Enzymrohextrakt von *Lentinus edodes* konnten sie 7-Hydroxycumarin (siehe Abbildung 3-21) mittels GC-MS und $^1\text{H-NMR}$ als Abbauprodukt nachweisen. GPC-Untersuchungen zeigten eine Abnahme der Konzentration im hochmolekularen Bereich und eine Zunahme im niedermolekularen Bereich. Die Gesamtkonzentration der Inhaltsstoffe war nach der Inkubation mit dem Enzymrohextrakt jedoch deutlich geringer.

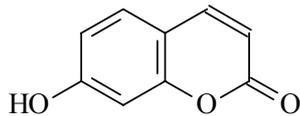
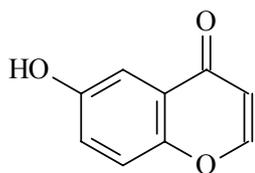
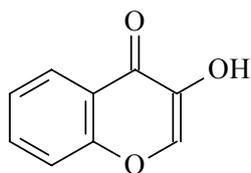


Abbildung 3-21: 7-Hydroxycumarin

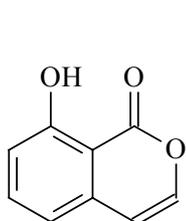
Bei den Kultivierungen von *Lepista irina* mit Erdnussschalenextrakt konnte ein Abbauprodukt nachgewiesen werden (siehe 2.5.4), dessen chromatographische Daten aus HPLC-MS- und GC-MS- Untersuchungen einen Rückschluss auf 7-Hydroxycumarin zuließen. Eine Überprüfung mit den Standardverbindungen 7-Hydroxycumarin und 4-Hydroxycumarin zeigte jedoch geringfügige Abweichungen im chromatographischen Verhalten (HPLC und GC). Auch die GC-MS-Spektren zeigten keine vollständige Übereinstimmung mit dem Abbauprodukt. Der Schluss liegt nahe, dass es sich um ein strukturell ähnliches Produkt bzw. Stellungsisomer (siehe Abbildung 3-22) handeln könnte. Die aus der HPLC-MS-Untersuchung ermittelte hochaufgelöste Masse ergibt als Summenformelvorschlag $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$ mit sieben Doppelbindungsäquivalenten und deutet auf ein binäres Ringsystem hin. Mit der Kenntnis, dass es sich bei der Verbindung um einen Aromaten (UV-Spektrum) mit drei Sauerstoffatomen handelt, und der Kenntnis aus den GC-MS-Untersuchungen ist ersichtlich, dass nur ein Sauerstoffatom mit Hydroxy- oder auch Säurefunktion vorliegen kann. Das TMS-Massenspektrum zeigt, dass neben dem Molpeak und der Masse 73 u lediglich das Massenfragment $\text{M}^{+•}$ minus 15 ausgeprägt ist (siehe Abbildung 3-25). Das zeigt, dass eine leicht fragmentierbare Seitenkette des Aromaten nicht vorliegen kann. Eine weitere Interpretationsmöglichkeit lässt auch auf ein Benzofuranderivat (siehe Abbildung 3-23) schließen, das möglicherweise durch den Abbau einer Phenylcumarin- β -5-Lignineinheit (siehe Abbildung 3-24) entstanden ist.



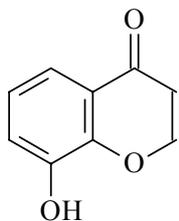
6-Hydroxy-chromen-4-on



3-Hydroxy-chromen-4-on

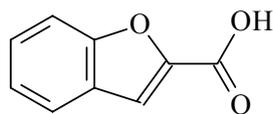


8-Hydroxyisochromen-1-on

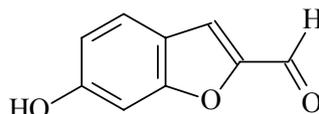


8-Hydroxy-chromen-4-on

Abbildung 3-22: Hydroxychromenderivate



Benzofuran-2-carbonsäure



6-Hydroxy-benzofuran-2-carbaldehyd

Abbildung 3-23: Benzofuranderivate

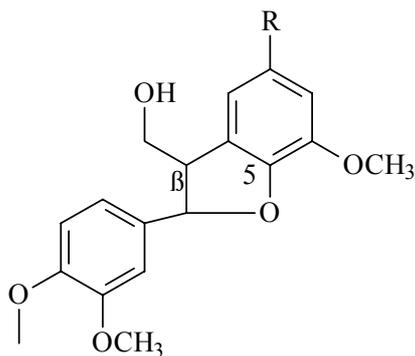


Abbildung 3-24: Phenylcumaran-β-5-Einheit

Durch eine mögliche Abspaltung von CHO kann das $(M-CHO)^+$ -Ion entstehen (m/z 205). Durch eine weitere Umlagerung und Abspaltung eines Protons wäre der Peak m/z 204 ableitbar (siehe Abbildung 3-25).

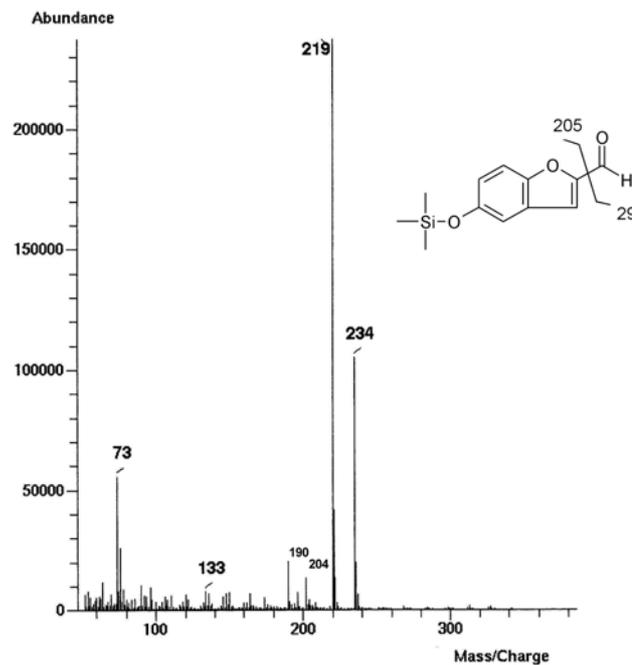


Abbildung 3-25: Massenspektrum, interpretiert als Hydroxyfuranaldehyd-TMS-Derivat

Kuroda et al. (2002) haben durch GC-MS-Pyrolyse-Untersuchungen an Ligninmodellen, an synthetischem Lignin und Zedernholz verschiedene Arylbenzofurane nachgewiesen. Diese Benzofurane ließen sich aus β -5-Substrukturen ableiten. Ein entsprechendes Hydroxyfuranaldehyd kann als Ligninabbauprodukt durch die Biodegradation von Erdnussschalen entstehen.

3.4.3 Weitere interessante Abbauprodukte

Als weitere Abbauprodukte konnten bei den Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* weitere aus der Ligninstruktur ableitbare Verbindungen nachgewiesen werden: 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (siehe Abbildung 3-26) und E-Zimtsäure (siehe Abbildung 3-27, nur bei *Pleurotus sapidus*).

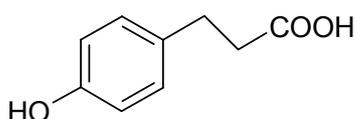


Abbildung 3-26: Strukturformel von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure

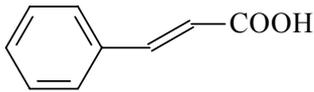


Abbildung 3-27: Strukturformel von E-Zimtsäure

Im Verlauf der Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* wurde eine Reihe weiterer niedermolekularer Abbauprodukte detektiert, deren Strukturen im Rahmen dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt wurden. Einige der Abbauprodukte konnten per HPLC-DAD und –MS nachgewiesen werden, nach Derivatisierung entsprechender Extrakte mit BSTFA konnten die Abbauprodukte per GC-MS nicht nachgewiesen werden (2.5.4). Dies lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um instabile Verbindungen handeln muss, die im Verlauf der weiteren Probenaufarbeitung abgebaut werden bzw. weiter reagieren (z.B. zu Polymerisationsprodukten). Da per GC-MS nur ein Massenbereich (m/z) bis 800 bestimmt werden kann und nach Derivatisierung mit BSTFA für jede derivatisierbare Gruppe die Molmasse um 72 zunimmt, kann der Massenbereich des GC-MS überschritten werden. Dies kann beispielweise bei den Verbindungen $C_{17}H_{22}O_6$ (E-3) und $C_{28}H_{48}O_9$ (E-4) der Fall sein (Tabelle 2-20).

Ein Vergleich mit den eingesetzten Standardverbindungen (siehe 4.2) und den von Niemelä (1990) beschriebenen chemischen Abbauprodukten von Birkenholz ergab keine Übereinstimmung. Alle Abbauprodukte wiesen mindestens eine derivatisierbare, funktionelle Gruppe auf. Die Ergebnisse deuteten teilweise auf hochoxidierte Verbindungen hin. Die UV-Spektren der HPLC-Untersuchungen ließen Rückschlüsse auf eine aromatische Struktur zu.

Crestini et al. (1996) identifizierten als weitere Abbauprodukte von löslicher Lignocellulose durch *Lentinus edodes* Vanillin, Ferulasäure, Vanillinalkohol, p-Cumarsäure sowie weitere Produkte. Keine dieser Verbindungen konnte als Abbauprodukt bei den Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* nachgewiesen werden. Vanillin, p-Cumarsäure und Ferulasäure wurden jedoch als Inhaltsstoffe der Erdnussschalen nachgewiesen. In den experimentellen Kulturen war Vanillin je nach Kultivierungstechnik im Verlauf der Kultivierungen noch nachweisbar. Ob diese Verbindung auch durch den Abbau des Ligninpolymers entstanden ist, lässt sich eindeutig nur durch Verwendung von markiertem Lignin ermitteln.

3.4.4 Bildung von p-Methoxybenzaldehyd (Anisaldehyd) bei Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus*

Zahlreiche Basidiomyceten sind in der Lage, p-Methoxybenzaldehyd *de novo* zu synthetisieren: *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus sapidus*, *Lentinus lepidus* u.a.. Eine Übersicht über entsprechende Basidiomyceten ist bei Lamascolo et al. (1999) zu finden. Einige Basidiomyceten sind in der Lage, p-Methoxybenzaldehyd durch Biotransformation von Lignin als Prekursor zu bilden: *Pleurotus* ssp., *Bjerkandera adusta* und *Ischoderma benzoinum* (Gutierrez et al., 1994, Beck, 1997).

Abraham (1994) konnte bei den Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* mit Ligninextrakt eine Steigerung des p-Methoxybenzaldehydgehaltes um bis zu $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gegenüber den nicht induzierten Kulturen beobachten. Bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* auf Erdnussschalen konnte kein Unterschied zwischen induzierten und nicht-induzierten Kulturen beobachtet werden, jedoch aber bei den Kultivierungen mit Erdnussschalenextrakt. Hierbei konnte eine Steigerung des p-Methoxybenzaldehydgehaltes um $2,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gegenüber den nicht-induzierten Kulturen beobachtet werden (siehe Tabelle 2-13).

Bei der Kultivierung von *Lepista irina* mit Erdnussschalen bzw. mit Erdnussschalenextrakt wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls p-Methoxybenzaldehyd, das *de novo* ohne Ligninzusatz nicht gebildet wurde, gegen Ende der Kultivierungen nachgewiesen. *Bjerkandera adusta* bildet durch Supplementierung mit Zimtsäure, Benzoessäure, 4-Hydroxybenzoessäure und p-Anissäure: p-Methoxybenzaldehyd (Mester et al., 1997). De Jong et al. (1994) stellten die besondere Rolle von Arylalkoholen in der Physiologie lignolytischer Pilze dar. Extrazelluläre Peroxidasen benötigen H_2O_2 für ihre Aktivität. Eine Arylalkoholoxidase (AAO) generiert H_2O_2 durch Oxidation aromatischer Alkohole zu den entsprechenden aromatischen Aldehyden und reduziert O_2 zu H_2O_2 (siehe Abbildung 3-28). Die AAO stellt nicht das einzige Enzymsystem zur Bildung von H_2O_2 dar. Glyoxaloxidasen, Glucoseoxidasen und weitere Enzyme besitzen ebenfalls die Fähigkeit, H_2O_2 zu generieren.

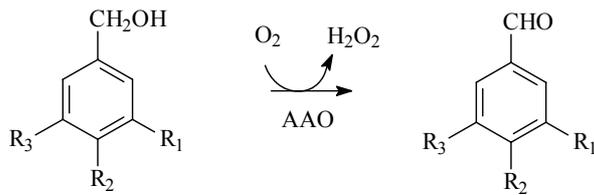


Abbildung 3-28: Reaktionsmechanismus von Arylalkoholoxidase (AAO) mit Aryl-Alkoholen mit: Benzylalkohol / Benzaldehyd $R_1=R_2=R_3=H$; Anisalkohol / Anisaldehyd $R_1=R_3=H$, $R_2=OCH_3$ und Veratrylalkohol / Veratrylaldehyd $R_1=R_2=OCH_3$, $R_3=H$

Ein weiterer möglicher Mediator für die AAO ist Veratrylalkohol (siehe Abbildung 3-28). Kofujita et al. (1989) untersuchten bei *Lentinus edodes* die Bildung von Veratrylalkohol durch Kultivierungen mit Holzlignin und Supplementierung mit ^{14}C -Phenylalanin. Es zeigte sich, dass *Lentinus edodes* Veratrylalkohol durch den Holzabbau und durch *De-novo*-Synthese aus Phenylalanin bildete.

Ob es sich bei den Kultivierungen von *Lepista irina* bei p-Methoxybenzaldehyd um ein Ligninabbauprodukt oder einen durch Lignin induzierten *De-novo*-Metaboliten handelt, lässt sich nur durch Experimente mit markierten Prekursoren abschließend klären.

3.4.5 Bilanzierung der Abbauprodukte und hypothetischer Abbauweg

Aufgrund der ermittelten Ligninabbaurate von 25% in 28 Tagen bei der statisch-dynamischen Kultivierung von *Pleurotus sapidus* mit Erdnussschalen (Ligningehalt 32%) müssten 80 mg potenzielle Ligninabbauprodukte pro g Erdnussschalen nachweisbar sein, wenn sämtliche Produkte akkumulieren würden. Zusätzlich müssen die in Erdnussschalen enthaltenen Flavonoide berücksichtigt werden, die durch *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* abgebaut worden sind. Bei der Ermittlung des Ligningehaltes wurden die Flavonoide nicht mit erfasst (siehe 4.9.2). Es erfolgte ein Abbau der Flavonoide (5,7-Dihydroxychromen-4-on, Eriodictyol und Luteolin) um ca. 70% (Tabelle 6-7 bis Tabelle 6-10).

Tabelle 3-3 zeigt eine grobe Bilanzierung des Ligninabbaus durch die verwendeten Basidiomyceten. Die Gesamtmenge der im Verlauf der Kultivierung entstandenen Abbauprodukte wurde anhand der Peakflächen der HPLC-Untersuchungen und der ermittelten Gehalte der GC-MS Bestimmungen durch Summierung der Gehalte aller Abbauprodukte abgeschätzt.

Tabelle 3-3: Bilanzierung der Abbauprodukte vs. Lignin- und Flavonoidabbau¹⁷, Angaben in mg·g⁻¹ Erdnussschalen

	PSA	LIR
erwartete Menge Flavonoidabbauprodukte	1,09	1,09
erwartete Menge an Ligninabbauprodukte	+ 80	+ 80 ¹⁸
geschätzte Menge an Abbauprodukten	- 0,300	- 0,700
Bilanzlücke	~ 80,8	~ 80,4

Aus dieser Betrachtung ergibt sich, dass eine Akkumulation der Abbauprodukte nicht gegeben war. Die im Verlauf der Kultivierung ermittelte Menge an Abbauprodukte stellen nur einen verschwindend kleinen Bruchteil (0,4% für PSA bzw. 0,9% für LIR) der potenziellen Ligninabbauprodukte da.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass ein Ligninabbau mit auftretenden intermediären Abbauprodukten direkt am Ligninpolymer stattfinden muss. Ausgehend vom Ligninpolymer erfolgte ein Abbau zu Oligomeren durch Exoenzyme und membranperiphere Enzyme, anschließend erfolgt ein intrazellulärer sowie ein extrazellulärer Abbau mit den oben aufgeführten Abbauprodukten. Bei den Kultivierungen mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt konnte eine Aufnahme des Extraktes in das Pilzmycel optisch beobachtet werden (siehe 2.5.2 und 2.5.3). Es ist anzunehmen, dass unter Ringspaltung eine vollständige Mineralisierung zu CO₂ und Biomasse erfolgt. Nähere Aufschlüsse zu dieser Hypothese können nur Experimente mit radioaktiv markiertem, natürlichen Ligninkomplex geben.

Leonowicz et al. (1999) postulieren, dass der Abbauprozess von Lignocellulose über Diphenole und Ketosäuren verläuft und schließlich im Krebszyklus endet. Die Holzpolysaccharide werden im Pentosephosphatzyklus vollständig abgebaut (siehe Abbildung 3-29). Dies macht deutlich, dass im Verhältnis zu dem ermittelten Ligninabbau nur ein Bruchteil an Ligninabbauprodukten nachgewiesen werden konnte.

¹⁷ Es handelt sich hierbei um die statisch-dynamischen Kultivierungen mit unbehandeltem Erdnussschalenpulver

¹⁸ Annahme: Vergleichbare Ligninabbaurate wie bei *Pleurotus sapidus*

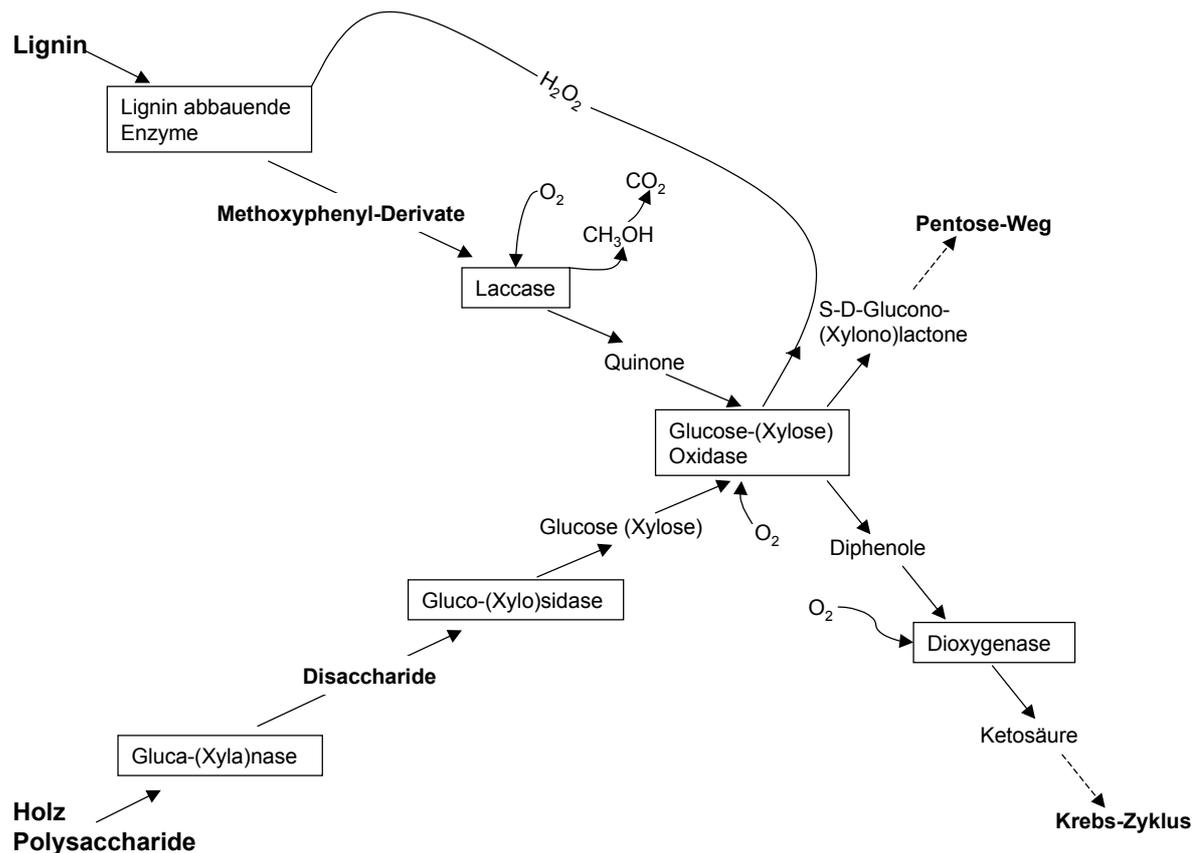


Abbildung 3-29: Hypothetischer Abbauweg von Lignocellulose durch die Enzyme der Weißfäulepilze (Leonowicz et al., 1999)

Durch die Kultivierungstechnik (statisch-dynamisch) konnten die Ligninabbaurate und die Laccase-Aktivität gesteigert werden. Diese Steigerung der lignolytischen Aktivitäten machte sich jedoch nicht in einer Steigerung des Gehaltes an Abbauprodukten bemerkbar. Es kann die Annahme getroffen werden, dass beim Ligninabbau Exoenzyme und membranaußenständige Enzyme der Pilze eine wesentliche Rolle spielen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass durch den Mycel-Substrat-Kontakt ein enges räumliches Umfeld geschaffen wird, in dem ein effizienter Ligninabbau stattfindet. Die mikroskopischen Untersuchungen der zellfreien Versuche mit Erdnusschalen haben gezeigt, dass durch das Ausbleiben dieses engen räumlichen Substrat-Mycel-Kontaktes kein erkennbarer Ligninabbau beobachtet werden konnte (siehe 2.2.2.3).

Ander und Marzullo (1997) beschreiben eine Interaktion zwischen Enzymen in den Pilzhyphen, z.B. Veratrylalkoholoxidase (VAO) und Mediatoren während des Abbaus von Lignocellulose (siehe Abbildung 3-30).

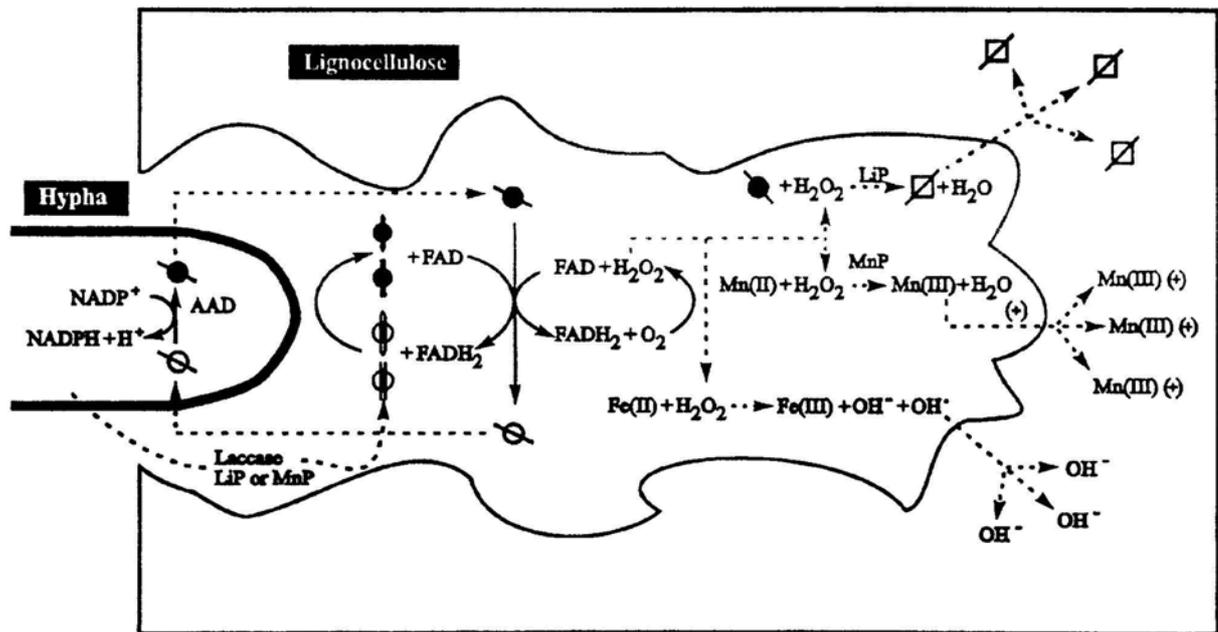


Abbildung 3-30: Interaktion der Pilzhyphenenzyme (VAO) mit Mediatoren und gebildeten Radikalen während der Transformation von Lignocellulose, nach Ander und Marzullo (Leonowicz et al., 1999)

Durch Immunogold-Färbung zeigten Messner et al. (1987), dass bei Holz abbauenden Pilzen die Konzentration von lignolytischen Enzymen in der Nähe und an der extrazellulären Plasmamembran am höchsten ist.

3.4.6 Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* im Fed-batch-Verfahren auf Erdnussschalen

Ein Fed-batch-Verfahren ist eine Prozessvariante, die eine Zwischenstellung zwischen einer geschlossenen Chargenkultur und einer kontinuierlichen Kultur einnimmt. Die hier angewandte Kultivierungstechnik unterschied sich von dem klassischen Fed-batch-Verfahren dadurch, dass das kompette Kulturmedium entfernt und durch frisches ersetzt wurde. Bei dem klassischen Fed-batch-Verfahren wird frische Nährstofflösung hinzugefügt (Römpf Lexikon der Biotechnologie, 1992).

Peters (2003) zeigte, dass durch einen kompletten Austausch des Kulturmediums die Laccase-Aktivitäten mit fortschreitenden Kulturzyklen gesteigert werden konnten.

Die Steigerung der Laccase-Aktivität spiegelte sich nicht in der Produktbildung wieder. Lediglich eine Steigerung des p-Methoxybenzaldehydgehaltes im Kulturmedium konnte durch den Austausch des Kulturmediums beobachtet werden.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Screening (ABTS- und DPPH-Test) nach phenolischen Metaboliten aus dem Abbau ligninhaltiger Substrate zeigte, dass ein geringer temporärer Zugewinn an antioxidativ wirksamen Abbauprodukten im niedermolekularen Bereich gegenüber den Kontrollwerten beobachtet werden konnte. Eine Akkumulation von niedermolekularen, antioxidativ wirksamen Verbindungen war jedoch nicht gegeben.

Die Submerskultivierung von *Pleurotus sapidus*, *Lepista irina*, *Bjerkandera adusta* und *Phanerochaete chrysosporium* mit ligninhaltigen Substraten (Rosmarin, Zimt, Sesam- und Erdnussschalen) zeigte lignolytische Aktivitäten. Am Beispiel der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* mit Erdnussschalen konnte gezeigt werden, dass durch einen engen Mycel-Substrat-Kontakt die lignolytischen Aktivitäten (Ligninabbaurate, Enzymaktivitäten) gegenüber den Kultivierungen mit einem losem Mycel-Substrat-Kontakt gesteigert werden konnten. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Enzymaktivitäten durch niedermolekulare, phenolische Substrate gesteigert werden konnten. Besonders war dies bei der Kultivierung von *Lepista irina* mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt ersichtlich. Die Untersuchungen machen deutlich, dass für einen effizienten Abbau von polymerer Lignocellulose ein enger Substrat-Hyphen-Kontakt zwingend erforderlich sein muss.

Es zeigte sich bei Kultivierungen von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* mit Erdnussschalen, dass Flavonoide, Vanillin und Vanillinsäure schon nach kurzer Kultivierungsdauer abgebaut worden sind. Die Abbauprodukte der Flavonoide (Ausnahme 5,7-Dihydroxychromen-4-on), von Vanillin und Vanillinsäure konnten nicht nachgewiesen werden. Die Abbauraten waren abhängig von der Substratdarreichung und Bioverfügbarkeit der monomeren Verbindungen. Eine weitere Zugänglichmachung von bereits vorhandenen antioxidativen Verbindungen in den Erdnussschalen - durch eine Steigerung der lignolytischen Aktivität - war nicht gegeben.

Durch die Kultivierung von *Lepista irina* und *Pleurotus sapidus* mit einem nahezu unbehandelten Lignocellulosesubstrat konnten eine Reihe von niedermolekularen Abbauprodukten nachgewiesen werden:

- Zimtsäure
- 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure
- Trihydroxymimtsäure
- 2,5-Furandicarbonsäure
- weitere nicht näher identifizierte aromatische Abbauprodukte

Unter allen untersuchten Fällen ergab die Kultivierung von *Lepista irina* mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt die größte Anzahl von Abbauprodukten. Bei der Kultivierung von *Lepista irina* trat außerdem p-Methoxybenzaldehyd auf, das entweder durch Lignocellulose-Induktion oder als Ligninabbauprodukt entstanden sein kann. *De novo* konnte p-Methoxybenzaldehyd nur bei *Pleurotus sapidus* nachgewiesen werden. Hier konnte nur bei Zusatz von ethanolischen Erdnussschalenextrakten eine deutliche Steigerung des p-Methoxybenzaldehydgehaltes festgestellt werden. Das gleiche Ergebnis erzielte Abraham (1994) bei Kultivierungen von *Pleurotus sapidus* mit hochpolymerem Ligninextrakt.

Eine Bilanzierung des Ligninabbaus und der gebildeten Produkte macht deutlich, dass es sich bei dem Ligninabbau um keinen reinen extrazellulären Prozess handelt. Es ist anzunehmen, dass nur die ersten Schritte extrazellulär ablaufen und der weitere Abbau gebildeter Oligomere und Monomere intrazellulär sowie weit gehend direkt am Ligninpolymer stattfindet. Eine Akkumulation von Abbauprodukten im Kulturmedium konnte nicht nachgewiesen werden.

Für weitere Untersuchungen ist es notwendig, vorbehandeltes Material einzusetzen, um den Abbau von wertvollen phenolischen Inhaltsstoffen (z.B. Luteolin und Eriodictyol) zu verhindern. Folgende Auflistung zeigt, in welchen Bereichen noch Aufklärungs- und Forschungsbedarf besteht, um Basidiomyceten Erfolg versprechend und wirtschaftlich für die Gewinnung von niedermolekularen Wertstoffen (z. B. Antioxidantien, Aromastoffe, pharmazeutisch wirksame Stoffe etc.) durch den Abbau von Lignin einzusetzen:

- *In situ* Abtrennung intermediär akkumulierender Ligninabbauprodukte
- Aufklärung von Transportvorgängen zwischen Medium und Pilzmycel,
- Aufklärung intramolekularer Abbauvorgänge,
- Mutagenesen von geeigneten Basidiomyceten, um einen vollständigen Abbau des Lignins zu verhindern (Nutzung einer anderen C-Quelle als Lignin) und
- Zusammenspiel und Beeinflussung aller am Ligninabbau beteiligter Enzyme.

4 Material und Methoden

4.1 Mikroorganismen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mikroorganismen-Stämme wurden bezogen von:

der niederländischen Sammlung für Pilzkulturen (CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures) in Baarn, Niederlande

der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig.

Tabelle 4-1: Verwendete Mikroorganismen

Art	Stamm
<i>Bjerkandera adusta</i> (BAD)	CBS 414.48
<i>Lepista irina</i> (LIR)	CBS 458.79
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (PCH)	CBS 481.73
<i>Pleurotus sapidus</i> (PSA)	DSM 8266

4.2 Chemikalien

Tabelle 4-2: Nährmedienbestandteile

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
Agar-Agar	f. Mikrobiol.	Merck
Ammoniumtartrat	≥ 99%	Fluka
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	p.a.	Fluka
Citronensäure	p.a.	Fluka
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	<i>purum</i>	Fluka
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	99%	Baker
D(+)-Glucose-Monohydrat	f. Mikrobiol.	Merck
EDTA	> 99%	Merck
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	reinst	Riedel-de-Haen
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	p.a.	Fluka
H ₃ BO ₃	reinst	Riedel-de-Haen
Hefeextrakt	f. Mikrobiol.	Merck
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	p.a.	Fluka
KH ₂ PO ₄	f. Mikrobiol.	Merck
L-Asparagin-Monohydrat	99%	Merck
MgSO ₄	chem. rein DAB 7	Riedel-de-Haen
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	p.a.	Fluka
MnSO ₄ x H ₂ O	> 98%	Fluka
NaCl	p.a.	Fluka
Nitrilotriacetat	<i>purum</i>	Fluka
Thiaminhydrochlorid	> 99%	Fluka
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	<i>puriss. p.a.</i>	Fluka

Tabelle 4-3: Sonstige Chemikalien

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
α -Amylase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	26 U·mg ⁻¹ Feststoff	Fluka
1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl	> 90%	Sigma
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diamoniumsalz	> 99%	Fluka
3,3'-Dimethoxybenzidindichlorid	-	Fluka
3,4-Dihydroxyzimssäure	-	Sigma
Acetylbromid	> 98%	Fluka
Amyloglucosidase aus <i>Aspergillus niger</i>	69.65000 U·mg ⁻¹	Fluka
Essigsäure	p.a.	Fluka
Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	-	Merck
HCl	reinst	Riedel-de-Haen
Kieselgel 60	für Chromatographie	Merck
KOH	p.a.	Riedel-de-Haen
N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid	GC-Qualität	Macherey & Nagel
N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid mit 1% Trichlorsilan	GC-Qualität	Fluka
Na ₂ SO ₄	98%	Riedel-de-Haen
NaOH	reinst	Riedel-de-Haen
Peroxidase aus Meerrettich	693 U·mg ⁻¹	Fluka
Proteinase aus <i>Aspergillus niger</i>	5,6 U·mg ⁻¹	Fluka
stripped corn oil		Acros
Trolox	> 98%	Fluka
Xylanase aus <i>Trichoderma viride</i>	2,3 U·mg ⁻¹	Fluka

Tabelle 4-4: Standards für die HPLC und GC

Bezeichnung	Qualität	Bezugsquelle
(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure	> 98%	Fluka
(S) (+) 1-Phenyl-1,2-Ethandiol	-	Sigma
2-Methoxyphenol	<i>purum</i>	Fluka
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	zur Synthese	Merck
3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon	-	Sigma
3,4,5-Trihydroxybenzoesäure	<i>purum</i>	Fluka
3,4-Dihydroxybenzoesäure	<i>purum</i>	Fluka
3,4-Dimethoxybenzaldehyd	99%	Aldrich
3,4-Dimethoxybenzoesäure	zur Synthese, > 98%	Merck
3,4-Dimethoxybenzylalkohol	<i>purum</i>	Fluka
3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon	<i>purum</i>	Fluka
3',4',5,7-Tetrahydroxyflavanon	HPLC	Roth
3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon	99%	Fluka
3-Ethoxy-4-hydroxy-benzaldehyd	zur Synthese	Merck
3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure	<i>purum</i>	Sigma
4,4'-(2,3-Dimethyltetramethylen)-dibrenzcatechin	95%	Roth
4'-Hydroxy-3'-methoxyacetophenon	<i>purum</i>	Fluka
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyd	<i>purum</i>	Fluka
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure	<i>purum</i>	Fluka
4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure	p.a.	Fluka
4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd	<i>purum</i>	Fluka
4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure	<i>purum</i>	Fluka
4-Hydroxy-3-methoxyzimtalkohol	<i>purum</i>	Fluka
4-Hydroxyacetophenon	<i>purum</i>	Fluka
4-Hydroxybenzaldehyd	<i>purum</i>	Fluka
4-Hydroxybenzoesäure	<i>puriss</i>	Fluka
4-Hydroxycumarin	<i>purum</i>	Fluka
4-Methoxybenzaldehyd	Reg. Ph. Eur.	Merck
4-Methoxybenzoesäure	<i>purum</i>	Fluka
5-Hydroxymethylfurfural	<i>purum</i>	Fluka
7-Hydroxycumarin	<i>purum</i>	Fluka
E-3,4-Dihydroxyzimtsäure	99%	EGA - Chemie
E-3,4-Dimethoxyzimtsäure	99%	EGA - Chemie
E-Ferulasäure	99%	Aldrich
E-Zimtsäure	<i>purum</i>	Fluka
m-Methoxyzimtsäure	<i>puriss</i>	Fluka
p-Methoxyzimtsäure	<i>puriss</i>	Fluka
trans-4-Hydroxyzimtsäure	<i>purum</i>	Fluka
Zimtalkohol	<i>purum</i>	Fluka

4.3 Lösungsmittel

Hochschullieferungen (Fassware) wurden vor Gebrauch über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt.

Tabelle 4-5: Lösungsmittel

Lösungsmittel	Verwendung	Qualität	Herkunft
Ethanol	RAR / HPLC	HPLC	Roth
Ethanol, unvergällt	Kultivierung	redest.	Kraul und Wilkening
Ethylacetat	Extraktion / SC	redest.	Hochschullieferung
Hexan	HPLC / SC	HPLC	Roth
Methanol	Zellaufschluss	redest.	Hochschullieferung
Methanol	HPLC	HPLC	Baker
Petrolether	Extraktion	HPLC	Roth

SC: Säulenchromatographie

Für die HPLC und die enzymatischen Tests wurde bidestilliertes Wasser eingesetzt.

4.4 Gase

Tabelle 4-6: Gase

Gas	Verwendung	Qualität	Lieferant
Helium	Trägergas (GC/MS)	5.0	Linde
Luft	Detektorgas (GC) / ELSD	getrocknet	Kompressor ^a
Sauerstoff	Glucoseoxidase	5.0	Linde
Stickstoff	Spülgas (GC)	5.0	Linde
Wasserstoff	Träger- und Detektorgas (GC/FID)	5.0	Linde

^a Außenluft wurde über einen Staubfilter angesaugt und nach der Kompression durch einen ölfrei arbeitenden Membrankompressor zur Trocknung durch eine Silicasäule geleitet.

4.5 Geräte

Die meisten Geräte werden bei ihrer Anwendung in den Folgekapiteln spezifiziert.

Tabelle 4-7: Hilfsmittel

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	VST 50/70	Zirbus, Osterode/Harz
Autoklav	Varioklav 75S	H + P, Oberschleißheim
Brutschrank	BE 500	Memmert, Schwabach
Evaporator Zentrifuge	RC 10.22.	Jouan, Unterhaching
Gewürzmühle	A 10	Janke & Kunkel, Staufen/Breisgau
Lichtmikroskop	Will H-500	Hund, Wetzlar
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Membranpumpe	N.026.3 AT 18	KNF Neuberger, Freiburg
Mixer	-	Krupps
pH-Meter	731 Calimatic	Knick, Berlin
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-134	Büchi, CH-Flawil
Rührwerkskugelmühle	DYNO-Mill Typ KDL	W. A. Bachofen, CH-Basel
Schüttler	Infors HAT	Infors, CH-Bottmingen
Sterile Werkbank	CA RE 4	Clean Air
Ultraschallbad	Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
Ultra-Turrax	TP-18/10	Janke & Kunkel, Staufen/Breisgau
Umlaufkühler	Frigomix U	B. Braun, Melsungen
Vakuumpumpe	Two Stage Nr. 3	Edwards, UK-Crawley Sussex
Vakuumentrifuge	Sorvall RC 28 S, Festwinkelrotor HFA 14.290	Kendro, Hanau
Wasserbad	Julabo 20 B	Julabo, Seelbach/Schwarzwald
Zentrifuge	Sorvall RT7 Mit, Schwingkopfroter RTH-750	Kendro, Hanau
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus, Osterode/Harz

4.6 Substrate

4.6.1 Rosmarinpulver (extrahiert)

Es handelte sich bei diesem Substrat um fein vermahlene, extrahierte Pflanzenteile von Rosmarin (*Romarinus officinalis*) der Fa. Raps, Kulmbach. Angaben über das

Extraktionsverfahren lagen nicht vor. Für die Kultivierungen wurde das Substrat portionsweise in die Kulturkolben abgewogen.

4.6.2 Sesamschalenpulver (extrahiert)

Es handelte sich bei diesem Substrat um die extrahierten Samen von Sesam (*Sesamum indicum*) der Fa. Raps, Kulmbach. Angaben über das Extraktionsverfahren lagen ebenfalls nicht vor. Die Sesamschalen wurden mit einer Gewürzmühle fein zerkleinert und 30 min mit kochendem Wasser extrahiert, filtriert und bei 100 °C 4 h im Trockenofen getrocknet. Für die Kultivierungen wurde das Substrat portionsweise in die Kulturkolben abgewogen.

4.6.3 Zimtpulver (extrahiert)

Es handelt sich bei diesem Substrat um die getrocknete Rinde (bzw. Innenrinde) von *Cinnamomum aromaticum* NEES der Fa. Ostmann. Das Substrat lag als fein vermahlene Pulver vor. Als Bezugsquelle diente ein lokaler Supermarkt. 20 g des Zimtpulvers wurden mit 180 mL Petrolether 8 h in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert kurz getrocknet und 30 min mit kochendem Wasser extrahiert, filtriert und bei 100 °C 18 h im Trockenofen getrocknet. Für die Kultivierungen wurde das Substrat portionsweise in die Kulturkolben abgewogen.

4.6.4 Erdnussschalenpulver

Bei diesem Substrat handelt es sich um die Fruchtwand von gerösteten Erdnüssen (*Arachis hypogaea*). Die ganzen gerösteten Erdnüsse wurden geschält und in Fruchtwand (Schale), Samenschale und Samen getrennt. Lediglich die Erdnusfruchtwand diente als Substrat. Die Fruchtwand wurde mit einem Küchenmixer grob zerkleinert und anschließend mit einer Gewürzmühle zu einem feinen Pulver vermahlen. Für die Kultivierungen wurde das Substrat portionsweise in die Kulturkolben abgewogen.

4.6.4.1 Unbehandeltes Erdnussschalenpulver

Für die Versuche mit unbehandeltem Erdnussschalenpulver wurde dieses Pulver direkt eingesetzt. Für die Kultivierungen wurde portionsweise abgewogen:

- 2 g (300 mL Kulturkolben / 100 mL Medium): zellhaltig dynamisch und statisch-dynamisch

- 7 g (1 L Kulturkolben / 350 mL Medium): fed-Batch.

4.6.4.2 Behandeltes Erdnussschalpulver

Für die Versuche mit vorbehandeltem Erdnussschalpulver schloss sich ein Extraktionsverfahren an:

20 g vermahlene Erdnussschalpulver wurden in einem 300 mL Jodzahlkolben mit 75 mL Ethanol dreimal 2 h im Ultraschallbad extrahiert. Nach jedem Extraktionsschritt wurde das Erdnussschalpulver von dem Ethanol abfiltriert. Anschließend wurde das Substrat mit 100 mL Ethanol 18 h bei 24 °C und 100 rpm im Schüttler extrahiert. Nach dem Abfiltrieren der Erdnussschalen und Trocknen (4 h bei 70 °C) erfolgte ein portionsweises Abwiegen für die Kultivierungen:

- 2 g (300 mL Kulturkolben / 100 mL Medium): zellhaltig und zellfrei
- 4 g (500 mL Kulturkolben / 200 mL Medium): zellfrei, Induktion.

Die ethanolischen Extrakte wurden vereinigt und für weitere Untersuchungen (Kultivierung mit ethanolischem Extrakt) bei –20 °C aufbewahrt.

4.6.4.3 Ethanolische Erdnussschalenextrakte

Die bei der Extraktion von Erdnussschalen (20 g) gewonnenen ethanolischen Extrakte (siehe 4.6.4.2) wurden am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C auf ein Volumen von ca. 20 mL unter Vakuum eingengt und anschließend auf 20,0 mL mit Ethanol aufgefüllt. Der Extrakt wurde mittels HPLC-DAD / ELSD analysiert.

4.7 Mikrobiologie

4.7.1 Autoklavieren

Feste Substrate und Instrumente wurden 30 min, Nährmedien und -Agar 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

4.7.2 Kulturmedien

4.7.2.1 Standard-Nähr-Agar mit Hefeextrakt (Sprecher, 1959)

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g·L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g·L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g·L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g·L ⁻¹
Agar-Agar	15,0 g·L ⁻¹
Spurenelementlösung 1	1,0 mL·L ⁻¹
Einstellung auf pH auf 6,0 mit 1 N NaOH	

Spurenelementlösung 1:

FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,08 g·L ⁻¹
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,09 g·L ⁻¹
MnSO ₄ x H ₂ O	0,03 g·L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g·L ⁻¹
TitriplexIII (EDTA)	0,4 g·L ⁻¹

4.7.2.2 Standard-Nähr-Agar mit Lignin

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g·L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g·L ⁻¹
Thiaminhydrochlorid	1,0 mL·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g·L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g·L ⁻¹
Agar-Agar	15,0 g·L ⁻¹
Spurenelementlösung 1	1,0 mL·L ⁻¹
Einstellung auf pH 6,0 mit 1 N NaOH	
Thiaminhydrochloridlösung (Vitamin B ₁): 2 mg·mL ⁻¹	

4.7.2.3 Standard-Nähr-Medium mit Hefeextrakt (SNL-Y) nach Sprecher (1959)

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g·L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g·L ⁻¹

Hefeextrakt	3,0 g·L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g·L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g·L ⁻¹
Spurenelementlösung 1	1,0 mL·L ⁻¹
Einstellung auf pH 5,2 mit 1 N HCl	

4.7.2.4 Stickstoffarme Nährlösung für experimentelle Kulturen nach Abraham (1994), modifiziert

D(+)-Glucose-Monohydrat	10 g·L ⁻¹
Ammoniumtartrat	0,2 g·L ⁻¹
Natriumphosphatpuffer 1 M	10 mL·L ⁻¹
Salzlösung	100 mL·L ⁻¹
Salzlösung 2	10,0 mL·L ⁻¹
Thiaminhydrochloridlösung	1,0 mL·L ⁻¹
Einstellung auf pH 5,2 mit 1 N HCl	

Salzlösung

KH ₂ PO ₄	20,0 g·L ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	5,0 g·L ⁻¹
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,0 g·L ⁻¹

Salzlösung 2 (Abraham, 1994)

Nitrilotriacetat (NTA)	10,5 g·L ⁻¹
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	21,0 g·L ⁻¹
MnSO ₄ x H ₂ O	3,5 g·L ⁻¹
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,7 g·L ⁻¹
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,07 g·L ⁻¹
KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0,07 g·L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,07 g·L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ X 2 H ₂ O	0,07 g·L ⁻¹
NaCl	7,0 g·L ⁻¹
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,7 g·L ⁻¹
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	0,7 g·L ⁻¹
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,7 g·L ⁻¹

Für die experimentellen Kulturen wurden 950 mL Lösung bestehend aus Salz-, Puffer- und Salzlösung 20 min bei 121 °C autoklaviert. Glucose, Vitamin B₁ und Ammoniumtartrat wurden steril filtriert (MILLEX-GP, Millipore, 0,22 µm) und zu der autoklavierten Lösung unter sterilen Bedingungen hinzugefügt.

4.7.2.5 Enzymzusatz

Eine Enzymlösung bestehend aus 500 mg Xylanase, 100 mg Amyloglucosidase und 400 mg α-Amylase (ad 50,0 mL) wurde für Versuche mit Enzymzusatz hergestellt und anschließend steril filtriert (MILLEX-GP, Millipore, 0,22 µm).

4.7.3 Kulturführung

4.7.3.1 Stammhaltung

Von jedem verwendeten Stamm wurden jeweils zwei Stammkulturen in Petrischalen auf Standard-Nähr-Agar bei 5 °C gehalten. Die Platten wurden mit gut bewachsenen Stücken (etwa 1 cm²) von Agarplatten-Vorkulturen beimpft. Nach unterschiedlich langem Wachstum bei 24 °C im Brutschrank wurden die Petrischalen mit gut bewachsenen Kulturen bis zu sechs Monaten im Kühlschrank bei 5 °C gelagert.

4.7.3.2 Stammhaltung für experimentelle Kulturen

Etwa 1 cm² große, gut bewachsene Stückchen der Stammkulturen (s.o.) wurden in Standard-Nähr-Agar mit Lignin gefüllte Petrischalen überführt. Nach dem Verschließen der Platten mit Parafilm wurden die Mikroorganismen je nach Wachstumsgeschwindigkeit 10 bis 20 Tage im Brutschrank bei 24 °C inkubiert. Die bewachsenen Platten wurden bis zu drei Monate bei 5 °C gelagert.

4.7.3.3 Vorkultur

Ein etwa 1 cm² großes mit dem entsprechenden Organismus bewachsenes Lignin-Agar Stückchen wurde in einen 200 mL Standard-Nähr-Medium SNL-Y enthaltenden 500 mL Kulturkolben überführt und mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes ein bis zwei Wochen.

4.7.3.4 Experimentelle Kultur

Für sämtliche Kultivierungsverfahren wurde die gesamte Vorkultur mit Medium in sterile 50-mL-Zentrifugengefäße überführt und bei 2000 g 10 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und das Mycel mit sterilem 0,1 M Phosphatpuffer pH 5,2 gewaschen. Es wurde erneut 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Das von SNL-Y befreite Mycel wurde in einen sterilen 500 mL-Kulturkolben überführt und mit so viel stickstoffarmer Nährlösung versetzt, dass sich eine BFM von $35 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ ergab. Anschließend wurde das Mycel mittels Ultra-Turax homogenisiert.

4.7.3.5 Dynamisches Kulturverfahren

Kultivierung mit ligninhaltigem Substrat (vorbehandeltes und unbehandeltes Substrat, siehe 4.6): 2 g Substratpulver wurden in einen 300-mL-Kulturkolben eingewogen, 30 min autoklaviert und später mit 100 mL stickstoffarmer Nährlösung und 10 mL frisch homogenisierter Vorkultur (siehe 4.7.3.4) versetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 100 rpm unter Ausschluss von Licht bis zu vier Wochen. Die Probennahme erfolgte nach definierten Zeitpunkten.

4.7.3.6 Statisch-dynamisches Kulturverfahren

2 g Substrat wurden in einen 300-mL-Kulturkolben eingewogen und 30 min autoklaviert (bzw. 4 g in einen 500 mL Kulturkolben; alternativ 7 g in einen 1 L Kulturkolben). Das Substrat wurde mit 10 mL frisch homogenisiertem Inokulum versetzt (bei 4 g Substrat mit 20 mL und bei 7 g mit 30 mL Inokulum). Die Kultur wurde 7 d bei 25 °C im Brutschrank statisch inkubiert. Am siebten Tag erfolgte die Zugabe von stickstoffarmer Nährlösung. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 100 rpm unter Ausschluss von Licht bis zu drei Wochen.

4.7.3.7 Statisch-dynamisch Kultivierung mit Zusatz von Enzymen

Die Kultivierung erfolgte wie 4.7.3.6. Es wurde jedoch zu Beginn der dynamischen Phase 5,0 mL Enzymlösung (siehe 4.7.2.5) und 100 mL stickstoffarme Nährlösung zugesetzt.

4.7.3.8 Gewinnung eines Exoenzymkonzentrates aus *Lepista irina* bzw. *Pleurotus sapidus* für zellfreie Versuche

Eine dynamisch geführte Kultur von *Pleurotus sapidus* bzw. *Lepista irina* (siehe 4.7.3.5) mit Zusatz von 4 g vorbehandelten Erdnussschalen wurde für die Gewinnung des Enzymrohextraktes eingesetzt. Am 7. bzw. 8. Kulturtag wurde das Kulturmedium mit den enthaltenen Exoenzymen durch Zentrifugation (3300 g, 5 °C, 15 min) von der Biomasse getrennt und abdekantiert. Mittels Ultrafiltration (Centricon Plus-80, Millipore, Ausschlussgrenze 10 kDa) bei 3300 g (5 °C) wurden die Filtrate auf ein Volumen von ca. 10 mL konzentriert. Vor der weiteren Verwendung wurde das Enzymrohextraktkonzentrat auf Laccase-Aktivität und Proteingehalt untersucht. Die Konzentrate aus 6 parallel geführten Ansätzen (gleicher Kulturtag) wurden vereinigt, um eine ausreichende homogene Enzymmenge für weitere Versuche zu gewährleisten.

4.7.3.9 Gewinnung eines Enzymrohfiltrates durch Zellaufschluss

Eine dynamisch geführte Kultur von *Pleurotus sapidus* bzw. *Lepista irina* (siehe 4.7.3.5) mit Zusatz von 4 g vorbehandelten Erdnussschalen wurde für die Gewinnung des Enzymrohextraktes eingesetzt. Am 7. bzw. 8. Kulturtag wurde das Kulturmedium mit den enthaltenen Exoenzymen durch Zentrifugation (3300 g, 5 °C, 15 min) von der Biomasse getrennt und abdekantiert. Die Feuchtmasse, bestehend aus Mycel und nicht verwerteten Erdnussschalen wurde mit der Rührwerkskugelmühle mittels Nassvermahlung aufgeschlossen. Die Mühle war mit einem doppelwandigen Mahlgefäß (V=150 mL) ausgestattet. Es wurde pro Aufschluss eine Feuchtmasse von 10 g bis maximal 15 g eingesetzt. Das Mycel wurde mit 70 mL stickstoffarmer Nährlösung versetzt und zusammen mit 70 mL Glasperlen (0,5 mm Ø, bleifrei, Braun Biotech) in das Mahlgefäß gefüllt. Die Aufschlusszeit betrug 15 min bei 4°C und 3200 Umdrehungen min⁻¹. Die Suspension wurde anschließend durch Dekantieren und Filtration über einen Faltenfilter von den Glasperlen getrennt. Mittels Ultrafiltration (Centricon Plus-80, Millipore, Ausschlussgrenze 10 kDa) bei 3300 g (5 °C) wurden die Filtrate auf ein Volumen von ca. 10 mL aufkonzentriert. Vor der weiteren Verwendung wurde das Enzymrohextraktkonzentrat auf Laccase-Aktivität und Proteingehalt untersucht. Die Konzentrate aus 6 parallel geführten Ansätzen

(gleicher Kulturtag) wurden vereinigt, um eine ausreichende homogene Enzymmenge für weitere Versuche zu gewährleisten.

4.7.3.10 Inkubation von extrahierten Erdnussschalen mit einem Exoenzymfiltrat
2 g vorbehandelte Erdnussschalen wurden in einen Schikanekolben eingewogen und 30 min autoklaviert. Nach Zugabe von 90 mL stickstoffarmer Nährlösung und von 5,0 mL des Enzymrohextraktes (siehe 4.7.3.8) wurde die zellfreie Kultur 5 h, 24 h und 48 h bei 150 rpm und 24 °C inkubiert. Die wässrige Lösung wurde durch Filtration (Faltenfilter 595 ½, 150 mm, Schleicher & Schüll) von den nicht umgesetzten Erdnussschalen getrennt.

4.7.3.11 Inkubation von extrahierten Erdnussschalen mit einem Filtrat aus einem Zellaufschluss

2 g vorbehandelte Erdnussschalen wurden in einen Schikanekolben eingewogen und 30 min autoklaviert. Nach Zugabe von 90 mL stickstoffarmer Nährlösung und von 5,0 mL des Enzymrohextraktes (siehe 4.7.3.9) wurde die zellfreie Kultur 5 h, 24 h und 48 h bei 150 rpm und 24 °C inkubiert. Die wässrige Lösung wurde durch Filtration (Faltenfilter 595 ½, 150 mm, Schleicher & Schüll) von den nicht umgesetzten Erdnussschalen getrennt.

4.7.3.12 Kultivierung mit ethanolischem Erdnussschalenextrakt

Für die experimentellen Kulturen wurden 100 mL SNL-stickstoffarm (300 mL Kulturkolben) mit 10 mL frisch homogenisierter Vorkultur versetzt. Nach dreitägigem Anwachsen (100 rpm, 24 °C, unter Ausschluss von Licht) wurde die Kultur mit 1,0 mL (Kultivierung von *Lepista irina*) bzw. 2,0 mL (Kultivierung von *Pleurotus sapidus*) ethanolischem Erdnussschalenextrakt versetzt und weiter kultiviert. Die Probennahme erfolgte am 1. bis zum 12. Tag nach der Substratzugabe. Parallel wurden drei Kontrollen mitgeführt:

- chemische Umsetzung im Erdnussschalenextrakt: stickstoffarme Nährlösung mit 1,0 bzw. 2,0 mL ethanolischen Erdnussschalenextrakt, ohne Kultur
- *De-novo*-Synthese von PSA / LIR mit Ethanol: Zugabe von 1,0 bzw. 2,0 mL Ethanol anstelle von Erdnussschalenextrakt
- *De-novo*-Synthese von PSA / LIR: Kultivierung ohne Zusätze

4.7.3.13 Fed-batch-Kultivierung

Für die Fed-batch-Kultivierung wurden ausschließlich Erdnussschalpulver eingesetzt (7 g Erdnussschalen pro 350 mL SNL-stickstoffarm oder 4 g Erdnussschalen pro 200 mL SNL-stickstoffarm).

Der Beginn der Fed-batch-Kultivierung war identisch mit der statisch-dynamischen Kultivierung (siehe 4.7.3.6). An einem definierten Zeitpunkt in der dynamischen Kultivierungsphase wurde mycelfreier Kulturüberstand durch Dekantieren entfernt und durch erneute Zugabe von stickstoffarmer Nährlösung ersetzt. Das Nährmedium aus der Kultur wurde mehrere Male hintereinander unter sterilen Bedingungen gewechselt.

Der entnommene Kulturüberstand wurde ultrafiltriert (siehe 4.10), nach 4.8 aufbereitet und entsprechende Kulturparameter bestimmt.

4.8 Probennahme und Produktisolierung

Der gesamte Inhalt eines Kulturkolbens wurde wie folgt behandelt (Ausnahmen Fed-batch-Kultivierungen):

- Zentrifugation bei 15000 g, 5 °C, 15 min
- Filtration über Faltenfilter (595 ½, 150 mm, Schleicher & Schüll)
- Bestimmung der BTM aus dem Filtrerrückstand oder Extraktion des Filtrerrückstandes (nicht verwertetes Substrat, nicht wasserlösliche Substanzen und Mycel) mit Ethylacetat im Ultraschallbad (für dreimal 2 h mit je 50 mL), Einengen am Vakuumrotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C
- Charakterisierung des Ethylacetatextraktes aus dem Filtrerrückstand: Radikaleinfangrate (= AOC) (4.10), Gesamtpolyphenolgehalt (4.10.2) und Dientest (4.10.3) sowie HPLC- und GC-Untersuchungen (4.12.3 und 4.12.4)
- Bestimmung des Ligningehaltes (4.9) im extrahierten Filtrerrückstand nach der Ethylacetatextraktion
- Entnahme von ca. 1 mL Filtrat für folgende Untersuchungen: Glucosegehaltsbestimmung (4.11.5), Proteingehaltsbestimmung nach Bradford (4.11.1), Enzymaktivitätsbestimmungen von Lac und GOD (4.11.3, 4.11.2) und AOC (4.10)
- Einstellen des restlichen Filtrats auf pH 2 mittels pH-Meter mit 1 M HCl

- Zusatz von ISTD 1 (Ethylvanillin) zur Ermittlung der Wiederfindung bei der Flüssig/Flüssig-Extraktion
- Flüssig/Flüssig-Extraktion des Filtrats (pH 2) mit Ethylacetat (dreimal je 25 mL), Trocknen über Na_2SO_4 über Nacht bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$, Einengen an der Vakuum Vigreux-Kollone bei $50\text{ }^\circ\text{C}$ und 200 mbar
- Charakterisierung des Ethylacetatextraktes vom Filtrat: AOC (4.10), Gesamtpolyphenolgehalt (4.10.2) und Dientest (4.10.3) sowie HPLC- und GC-Untersuchungen (4.12.3 und 4.12.4)
- Zusatz von ISTD 2 (Trolox) für HPLC und GC direkt vor dem Auffüllen auf ein definiertes Volumen

Im Anhang ist eine Übersicht über die Probenahme und die Bestimmungen der untersuchten Parameter aufgelistet (siehe Abbildung 6-1).

4.9 Bestimmung des Ligningehaltes in den Substraten vor und nach der Kultivierung

4.9.1 Qualitativer Nachweis und Abschätzung des Ligningehaltes

Mithilfe eines Mikroskops und der Phloroglucin/Salzsäure-Färbung wurden die Substrate das Vorhandensein von Lignin untersucht, es erfolgte außerdem eine Abschätzung des Ligningehaltes vor und nach der Kultivierung (siehe Abbildung 4-1).

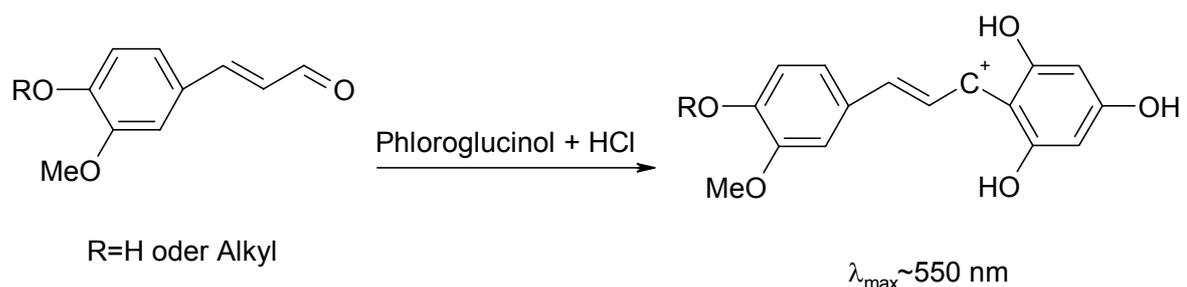


Abbildung 4-1: Phloroglucin/HCl-Färbung von Ligninbestandteilen

Eine Spatelspitze der Proben wurde auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Tropfen Chloralhydratlösung (zur Aufhellung der Zellwandbestandteile) und Phloroglucin/HCl vermischt. Die Probe wurde bei einer Vergrößerung von 400 fach unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Verholzte Zellwände waren durch eine

Rotfärbung sichtbar. Von einer Probe wurden mehrere Präparate hergestellt und der Anteil der rotgefärbten Fragmente abgeschätzt.

4.9.2 Quantitative Bestimmung des Ligningehaltes

Die Bestimmung des Ligningehaltes in den Substraten erfolgte nach einer modifizierten Acetylbromidmethode (Johnson, 1961; Dence und Lin, 1992) nach Hatfield (Hatfield, 1999), die in einigen Punkten der Aufgabenstellung angepasst wurde. Es handelt sich hierbei um eine spektrophotometrische Methode zur Bestimmung des Ligningehaltes (Wellenlänge: 280 nm).

Die Probe (Substrat, Substrat und Mycel bzw. Mycel) wurde nach Bestimmung der BTM einem Enzymbehandlungsschritt unterzogen, um störende Nicht-Lignin-Zellwandbestandteile (Proteine aus dem Mycel und dem Substrat, Xylane und Polysaccharide) abzubauen. Dazu wurde die Probe vollständig in einen 300 mL Jodzahlkolben überführt. Folgende Enzymbehandlungsschritte schlossen sich an:

- Zugabe von 350 mg Proteinase ($5,6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) in 100 mL
- Inkubation bei $35 \text{ }^\circ\text{C}$ für 4 h bei 100 rpm im Wasserbadschüttler
- Erhitzen auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 h und Abkühlen auf $55 \text{ }^\circ\text{C}$
- Zugabe von 250 mg Xylanase ($2,3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$), 150 mg α -Amylase ($26 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) und 100 mg Amyloglucosidase ($69,65 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
- Inkubation bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ für 18 h lang bei 100 rpm
- Zentrifugation bei 15000 g für 20 min bei $5 \text{ }^\circ\text{C}$
- Filtration über Faltenfilter (595 $\frac{1}{2}$, 150 mm, Schleicher & Schüll) und Trocknen bei $105 \text{ }^\circ\text{C}$ für 8 h

Die getrocknete Probe ($105 \text{ }^\circ\text{C}$, 8 h) wurde in eine Soxhlet-Apparatur überführt und 10 h lang mit Toluol/Ethanol (2 + 1) extrahiert. Die extrahierte Probe wurde bis zur weiteren Bestimmung im Exsikkator aufbewahrt.

10 mg der vorbehandelten Probe wurden in ein getrocknetes Schraubdeckelglas mit Teflonabdichtung (10 mL) eingewogen. Nach Zugabe von 5,0 mL Acetylbromidlösung (25%ig in Essigsäure, v/v) wurde das Schraubdeckelglas in einen Heizblock gestellt. In Abständen von 10 min wurde kräftig geschüttelt. Nach 30 min Aufschlusszeit wurde der Vorgang abgebrochen. Es wurde über ein Faltenfilter (595 $\frac{1}{2}$, 150 mm, Schleicher & Schüll) filtriert. 500 μL des Filtrates wurden mit 1,0 mL 2 M

NaOH-Lösung versetzt und auf 10,0 mL mit Eisessig verdünnt. Die Extinktion dieser Lösung wurde am Photometer bei 280 nm gegen einen Probenblindwert ermittelt. Mithilfe der folgenden Formel lässt sich der Ligningehalt in der Probe ermitteln. Zu berücksichtigen ist dabei, dass mit der Bezeichnung Probe sowohl Substrat (als Referenz), als auch Substrat mit Mycel oder nur Mycel (um mögliche Einflüsse des Mycels auf die Ligningehaltsbestimmung auszuschließen) gemeint sein kann.

$$c_{L/P} = \frac{E \cdot 1000 \cdot F \cdot V}{\varepsilon \cdot E_W \cdot d}$$

mit:	$c_{L/P}$	Gehalt an Lignin in der Probe in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
	E	Extinktion bei 280 nm, dimensionslos
	1000	Umrechnungsfaktor
	F	Verdünnungsfaktor (20)
	V	Volumen der Acetylbromidlösung (5 mL)
	ε	Extinktionskoeffizient ($20,09 \text{ g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, nach Dence und Lin, 1992)
	E_W	Einwaage der Probe in mg
	d	Schichtdicke der Küvette in cm

Der Gesamtligningehalt pro eingesetzte Menge Substrat für die Kultivierung berechnet sich wie folgt:

$$c_{L/S} = \frac{A_W \cdot c_{L/P}}{1000 \cdot E_S}$$

mit:	$c_{L/S}$	Ligningehalt im Substrat in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
	A_W	BTM (nach den Enzymbehandlungsschritten) in g
	1000	Umrechnungsfaktor
	E_S	Eingesetzte Menge Substrat für die Kultivierung in g

Der Ligninabbau wurde wie folgt berechnet:

$$\text{LA}[\%] = \frac{c_{L/S}(\text{Substrat}) - c_{L/S}(\text{Substrat} + \text{Mycel})}{c_{L/S}(\text{Substrat})} \cdot 100$$

mit:	LA	Ligninabbau in%
------	----	-----------------

4.10 Bestimmung der antioxidativen Kapazität (AOC)

4.10.1 Radikaleinfangtest (ABTS- und DPPH-Test)

Bei den eingesetzten Tests (ABTS- und DPPH-Test) handelt es sich um spektrophotometrische Bestimmungsmethoden der Radikaleinfangrate. Ein zugesetztes stabiles Radikal wird durch Antioxidantien abgefangen. Die Abnahme

der Radikalkonzentration lässt sich die über die Abnahme der Extinktion photometrisch verfolgen. Mittels einer Kalibriergeraden mit Trolox kann die radikaleinfangende Wirkung als TEAC-Werte (Trolox equivalent antioxidant activity) angegeben werden.

Die Bestimmung der AOC wurde für folgende Proben eingesetzt:

- Kulturüberstand bzw. wässriger Extrakt aus dem Substrat (siehe 4.8)
- Ultrafiltrat (UF) Permeat aus Kulturüberstand bzw. wässriger Extrakt aus dem Substrat (siehe 4.8)
- Ethylacetatextrakt aus dem Kulturüberstand bzw. aus dem wässrigem Extrakt aus dem Substrat (siehe 4.8)

Der Ethylacetatextrakt wurde am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur 40 °C und unter Vakuum bei 220 mbar bis auf ca. 1 mL eingengt. Der Rest an Ethylacetat wurde mit Stickstoff bis zur Trockne entfernt. Der Rückstand wurde in 1,0 mL bzw. 2,0 mL (AOC im Filterrückstand) Ethanol aufgenommen und vor der Verwendung membranfiltriert (Chromafil PET 45/25, 0,45 µm, Macherey und Nagel).

Die Radikaleinfangrate wird wie folgt berechnet:

$$\text{RAR}[\%] = \frac{\Delta E \cdot 100}{E_{\text{BW}}}$$

$$\Delta E = E_{\text{BW}} - E_{\text{Probe}}$$

mit: E_{BW} : Extinktion vom Reagenzienblindwert (Wasser bzw. Ethanol und DPPH-Lösung)
 E_{Probe} : Extinktion der Probe

Es wurde vorab für den ABTS- und den DPPH-Test die optimale Reaktionszeit mit Extrakten aus den Kultivierungen und BW Substrat am photometrisch ermittelt.

4.10.1.1 ABTS-Test (Re, 1999)

Das stabile $\text{ABTS}^{\bullet+}$ wird chemisch durch die Umsetzung von ABTS-Diammoniumsalz mit Ammoniumperoxodisulfat gebildet. Für die Herstellung der $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Stammlösung wurden 10 mL einer 7 mM ABTS-Diammoniumsalzlösung mit 2,45 mM $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Endkonzentration) versetzt und in einem braunen Glasgefäß unter Ausschluss von Licht 18 h stehen gelassen. 2,5 mL dieser Stammlösung wurden wie folgt eingesetzt:

- Für die ethanolische Testlösung auffüllen auf 50,0 mL Ethanol in einem Messkolben
- Für die wässrige Testlösung auffüllen auf 50,0 mL bidest. Wasser in einem Messkolben

Die Testlösungen und die Stammlösung wurden bei 4 °C aufbewahrt und waren mindestens eine Woche haltbar.

Dieser photometrische Test beruht auf der Reaktion von Antioxidantien mit dem stabilen Radikal $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Die Abnahme der $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Konzentration kann über die Abnahme der Extinktion bei 734 nm verfolgt werden (siehe Abbildung 4-2).

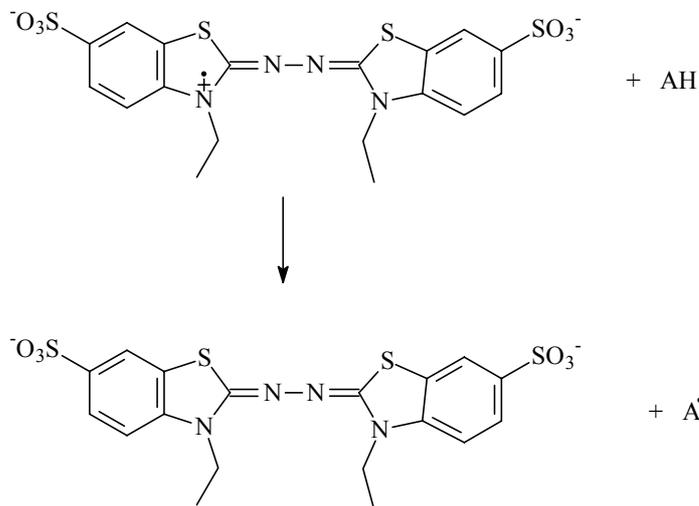


Abbildung 4-2: Reaktionsschema $\text{ABTS}^{\bullet+}$ mit einem Antioxidans AH

Die Messung der RAR wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

- 100 μL Probenlösung
- 900 μL bidest. Wasser bzw. 900 μL Ethanol
- 1,0 mL wässrige bzw. ethanolische $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Testlösung
- nach dem Vermischen unter Ausschluss von Licht stehen lassen
- nach 60 min Extinktion bei 734 nm gegen Reagenzienblindwert (nur Lösungsmittel und $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -Testlösung)

4.10.1.2 DPPH-Test (Yen und Wu, 1999)

Dieser photometrische Test beruht auf der Reaktion von Antioxidantien mit dem stabilen Radikal 2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH^{\bullet}). Die Abnahme der DPPH^{\bullet} -

Konzentration kann über die Abnahme der Extinktion bei 517 nm verfolgt werden. 200 µL der ethanolischen Probenlösung (siehe 4.8) wurden mit 800 µL Ethanol nach der Zugabe von 1 mL DPPH-Lösung (0,4 mM) vermischt und 30 min bei RT und unter Ausschluss von Licht stehen gelassen. Die Extinktion wurde bei 517 nm gegen einen Reagenzienblindwert gemessen.

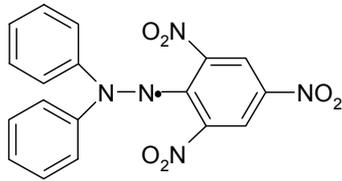
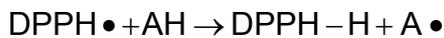


Abbildung 4-3: DPPH•-Radikal



mit:	DPPH•	2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-Radikal
	DPPH-H	2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazin
	AH	Antioxidans
	A•	Antioxidans-Radikal

4.10.2 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes (Gutfinger, 1981)

Diese Methode ist ein Verfahren zur photometrischen Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes mittels Folin-Reagenz. Die in der Probe enthaltenen Phenole werden im alkalischen Milieu mit Folin-Ciocalteus-Reagenz zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, der bei 725 nm vermessen wird. Mithilfe einer Kalibriergeraden mit Gallussäure als Standard werden die Ergebnisse als µg Gallussäureäquivalente (GAE) pro g Substrat angegeben.

100 µL bis 500 µL des ethanolischen Probenextraktes (siehe 4.10) wurden in einen 10 mL Messkolben überführt und mit ca. 5 mL mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Nach 3 min wurde der Lösung 1 mL einer gesättigten Na₂CO₃-Lösung hinzugefügt und mit bidest. Wasser bis zu Marke versetzt. Nach einer Stunde wurde die Extinktion bei 725 nm gegen einen Probenblindwert bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibration mit Gallussäure (0-1000 µg/10 mL Testlösung).

4.10.3 Antioxidative Kapazität: Lagerstabilitätstest von 'stripped corn oil' (Krings et al., 2000)

Die im Verlauf der Autoxidation gebildete Hydroperoxide von ungesättigten Fettsäuren können photometrisch bei 234 nm erfasst werden. 50 g „stripped corn oil“ wurden mit 2 mL eines ethanolischen Probenextraktes (siehe 4.8) vermischt und bei

60 °C in einem Trockenschrank gelagert. Die Probennahme erfolgte direkt nach der Zugabe des ethanolischen Probenextraktes und nach dem ersten und zweiten Tag, sowie nach der ersten, zweiten, dritten und vierten Woche. Bei der Probennahme wurden 10-20 mg des Öls in einen Spitzkolben eingewogen. Nach Zugabe von 5 mL Isooctan und gründlicher Vermischung mit dem Vortex-Blender wurde die Extinktion bei 234 nm gegen Isooctan gemessen (gegebenenfalls wurde die Probe mit Isooctan verdünnt). Als Referenzwert diente ein „stripped corn oil“ mit 2 mL Ethanol-Zusatz, das ebenfalls zu den gleichen Bedingungen behandelt, gelagert und vermessen wurde.

Der Gehalt von Hydroperoxiden wurde wie folgt berechnet:

$$c_{\text{Dien}} = \frac{E \cdot 1000}{\varepsilon \cdot d \cdot c_{\text{Öl}}}$$

mit:	c_{Dien}	Konzentration an Hydroperoxide in mmol pro 100 g Öl
	E	Extinktion bei 234 nm
	d	Schichtdicke der Küvette in cm
	$c_{\text{Öl}}$	Konzentration des Öls in Isooctan in $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Endkonzentration)
	1000	Umrechnungsfaktor zu mmol
	ε	$25000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

4.11 Weitere Bestimmungen

4.11.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) unter Verwendung von Roti-Quant (Roth) Farbstofflösung durchgeführt. Die Bestimmung beruht auf der Bindung der Proteine an Coomassie Brilliant Blue, wobei in saurer Lösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 595 nm auftritt.

Es wurden 250 μL proteinhaltige Probelösung (ggf. Verdünnung) mit 200 μL Farbstofflösung versetzt, gemischt und nach 10 min Reaktionszeit bei 595 nm spektrophotometrisch gegen einen Reagenzienblindwert gemessen. Die Kalibriergerade wurde in einem Bereich von 50 bis 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit Rinderserumalbumin erstellt.

4.11.2 Glucoseoxidase-Aktivität (Roche-Diagnostic, 1999; Kunst, 1984)

Der Enzymaktivitätstest beruht auf der Bildung von H_2O_2 durch Glucoseoxidase (GOD). Das gebildete H_2O_2 oxidiert Dianisidin (farblos) zu einem rotem Farbstoff, der

spektrophotometrisch bei 436 nm gegen einen Reagenzienblindwert erfasst werden kann (siehe Abbildung 4-4). Eine Einheit (U) Glucoseoxidase wandelt 1 μmol Glucose in 1 min bei 25 °C und pH 7 in ihr Reaktionsprodukt um. Der obige Assay liefert 1 μmol o-Dianisidin ($\varepsilon_{436\text{ nm}} = 8,3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) pro μmol oxidierter Glucose.

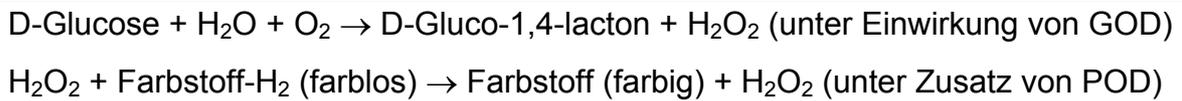


Abbildung 4-4: Reaktionsgleichung GOD-Aktivitätstest

Der Test wurde nach folgendem Pipettierschema in einer Küvette (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt:

- 2,0 mL 3,3'-Dimethoxybenzidindihydrochlorid (2 mg·mL⁻¹ Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,0), gesättigt mit O₂
- 0,5 mL Glucose-Lösung (10 g / 100 mL Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,0)
- 10 μL POD Lsg. (ca. 1 U·mL⁻¹)
- Zugabe von 0,5 mL Kulturüberstand

Mit Zugabe der Probe wird die Zunahme der Extinktion bei 436 nm für 5 min verfolgt.

Die Aktivität A_{GOD} lässt sich berechnen nach:

$$A_{\text{GOD}} [\text{U}\cdot\text{L}^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot 1000 \cdot V_{\text{gesamt}}}{8,3 \cdot V_{\text{Probe}}}$$

mit ΔE : Änderung der Extinktion pro Minute
 V_{gesamt} Gesamtvolumen in der Küvette in mL
 V_{Probe} Volumen der Probenlösung in mL

4.11.3 Laccase-Aktivität (Majcherczyk, 1999)

Die Bestimmung der Laccase-Aktivität beruht auf einer Ein-Elektron-Übertragungsreaktion von ABTS auf ABTS^{•+} durch Laccase. Die Bildung des farbigen ABTS^{•+} lässt sich spektrophotometrisch bei 420 nm gegen einen Reagenzienblindwert verfolgen.

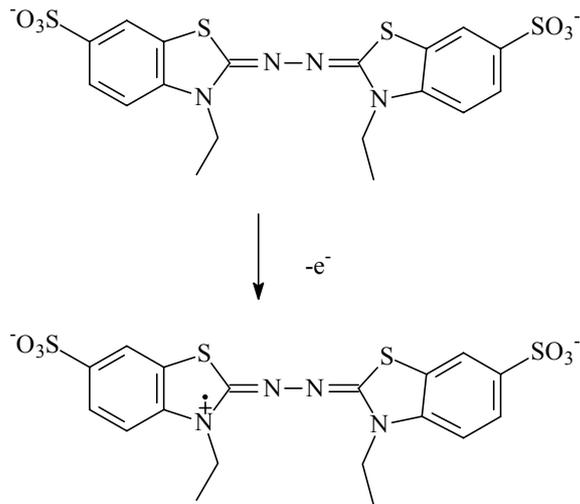


Abbildung 4-5: Reaktion ABTS (farblos) zu ABTS^{•+} (grünblau)

Der Aktivitätstest wurde nach folgendem Pipettierschema in einer Küvette (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt:

- 800 μL Natriumtartratpuffer (0,1 M) pH 4,5
- 50 μL 5 mM ABTS^{•+} – Lsg. in Natriumtartratpuffer (0,1 M) pH 4,5
- 100 μL Kulturüberstand

Mit Zugabe der Probe wird die Zunahme der Extinktion bei 420 nm 2 min lang verfolgt. Die Aktivität A_{Lac} lässt sich berechnen nach:

$$A_{\text{Lac}} [\text{U} \cdot \text{L}^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{gesamt}}}{0,036 \cdot V_{\text{Probe}}}$$

mit ΔE Änderung der Extinktion pro Minute
 V_{gesamt} Gesamtvolumen in der Küvette in mL
 V_{Probe} Volumen der Probenlösung in mL

Eine Einheit (U) ist definiert als die Oxidation von 1 mol ABTS zu ABTS^{•+} pro Minute ($\epsilon_{420 \text{ nm}} = 36000 \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Childs and Bardsley, 1975).

4.11.4 pH-Wert

Die Bestimmung des pH-Wertes im Kulturmedium erfolgte direkt nach der Probenahme mit einem zuvor kalibrierten pH-Meter.

4.11.5 Glucose-Gehalt

Der Glucose-Gehalt im Kulturmedium wurde sofort nach der Probenahme mit Glucose-Teststreifen, Diabur Test 5000 (Boehringer, Mannheim), abgeschätzt.

4.11.6 Biotrockenmasse

Ein definiertes Medium-Volumen wurde über ein tariertes Rundfilter gesaugt und mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Rundfilter und Mycel wurden bei 103 °C 12 h getrocknet und die Biotrockenmasse durch Differenzwägung des abgekühlten Rundfilters bestimmt.

4.11.7 Prüfung auf Kontaminationsfreiheit

Durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen wurde sichergestellt, dass die Kulturen nicht kontaminiert waren.

4.12 Chromatographie

4.12.1 Probenvorbereitung

4.12.1.1 Ethylacetat-Extrakte

Alle Proben, die in Ethylacetat aufgenommen wurden, wurden direkt oder nach Derivatisierung mit BSTFA oder nach Acetylierung für die GC / GC-MS-Untersuchungen eingesetzt. Für die Analyse mittels HPLC wurde das Ethylacetat dieser Proben mit Stickstoffstrom abgeblasen und der Rückstand in Methanol aufgenommen.

4.12.1.2 Methanol-Extrakte

Die Fraktionen der präparativen HPLC enthalten durch den benutzten Gradienten unterschiedliche Anteile an Methanol und Wasser. Diese Proben wurden am Rotationsverdampfer bei 70 bis 200 mbar und einer Wasserbadtemperatur von 40 °C bis auf ein Volumen von ca. 1 mL eingengt. Das restliche Lösungsmittel wurde mittels Vakuumzentrifuge getrocknet, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und nach Derivatisierung direkt für GC und GC-MS eingesetzt.

4.12.1.3 Derivatisierung für die GC

Alle Derivatisierungen wurden in einem Schraubdeckelgefäß durchgeführt.

A: Silylierung mit BSA

50 µL des Ethylacetatextraktes wurden mit 10 µL BSA-Lösung versetzt und im Trockenschrank bei 70 °C 2 h stehen gelassen und direkt für die GC eingesetzt. Gegebenenfalls wurde ein Verdünnungsschritt eingeführt.

B: Silylierung mit BSTFA

50 µL des Ethylacetatextraktes wurden mit 10 µL BSTFA-Lösung versetzt und im Trockenschrank bei 70 °C 2 h stehen gelassen und direkt für die GC eingesetzt. Gegebenenfalls wurde ein Verdünnungsschritt eingeführt.

C: Acetylierung mit Acetanhydrid/Pyridin

100 µL des Ethylacetatextraktes wurden mit 25 µL Acetanhydrid und 25 µL Pyridin versetzt und 3 h bei 70 °C im Trockenschrank erhitzt (Blau et al., 1978). Der Ansatz wurde direkt für die GC eingesetzt.

4.12.1.4 Probenvorbereitung für die HPLC

Die methanolischen Extrakte wurden vor dem Einsatz für die HPLC membranfiltriert (0,45 µm, PET, Macherey & Nagel).

4.12.2 Säulenchromatographie

Um Proben aus den Kultivierungen und dem Substrat vorzufractionieren, wurde eine Säulenchromatographie mit Kieselgel durchgeführt. Es wurde eine Glassäule 2 x 50 cm mit 25 g Kieselgel 60 gefüllt und mit n-Hexan equilibriert. Die aufkonzentrierte Probe (500 µL Ethylacetatextrakt, siehe 4.8) wurde auf die Säule aufgegeben und mit folgenden Lösungsmittelgemischen eluiert:

- A 100 mL n-Hexan
- B 100 mL n-Hexan/Ethylacetat (75/25)
- C 100 mL n-Hexan/Ethylacetat (50/50)
- D 100 mL n-Hexan/Ethylacetat (25/75)
- E 100 mL Ethylacetat
- F 50 mL Methanol
- G 50 mL 2%ige Essigsäure in Methanol

Die Fraktionen F und G wurden vereint. Alle Fraktionen wurden am Vakuumrotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C auf ein Volumen von ca. 1 mL eingengt und nach 4.12.1.1 und 4.12.1.2 für die HPLC bzw. GC aufbereitet.

4.12.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

4.12.3.1 Analytische HPLC

Durch die Analyse mittels HPLC wurden sowohl Ligninabbauprodukte als auch Polyphenole und niedermolekulare Bestandteile in den Substraten erfasst.

Alle in der Tabelle 4-4 aufgeführten Substanzen dienten als Vergleichssubstanzen für die HPLC-Untersuchungen. Als Lösungsmittel für die Standards diente Methanol. Die Retentionszeiten und die UV-Spektren wurden in die Spektrendatenbank der Software übernommen. Für die quantitative Bestimmung der gefundenen Substanzen wurden Kalibriergeraden mittels externer Standards erstellt.

Tabelle 4-8: Bedingungen für die analytische HPLC

Pumpe	Programmierbare HPLC-Pumpe PU-980 mit ternärer Gradienteneinheit (Niederdruck) LG-980-02 (Jasco)
Degasser	3-Kanal Degasser DG-980-50 (Jasco)
Detektor 1	UV/VIS-Photodiodenarray-Detektor MD 910 (Jasco) Messwellenlänge: 280 nm
Detektor 2 ¹⁹	ELSD Sedex Modell 55 (ERC GmbH); Gasdruck für die Zerstäubung 2 bar, Zerstäubungseinheit bei 40 °C (in Reihenschaltung)
Datenauswertung	Borwin Chromatographie Software (Version 1.50)
Injektionsventil	Rheodyne-Ventil mit 20 µL Probenschleife
Säule	Nucleosil 120-5 C-18, 250 x 4 mm, 5 µm (Macherey & Nagel)
Flussrate	1 mL·min ⁻¹
Fließmittel	A: Methanol B: 0,1% Essigsäure in bidest. Wasser
Gradient	0. – 5. Minute 10% A und 90% B, konstant 5. – 30. Minute auf 25% A und 75% B 30. – 40. Minute auf 100% A

4.12.3.2 Präparative HPLC

Bevor die Proben mittels präparativer HPLC fraktioniert wurden, wurden sie auf der analytischen HPLC-Anlage (siehe 4.12.3.1) auf ihre Zusammensetzung und auf das Auftreten neuer Verbindungen untersucht. Die einzelnen Fraktionen wurden später für weitere GC-MS und HPLC-MS Untersuchungen eingesetzt.

Die Fraktionierung der Extrakte von *Lepista irina* mit ethanolischem Erdnusschalenextrakt erfolgte nach folgender Vorgehensweise:

Es wurden die Gesamtextrakte (Ethylacetatextrakte des Kulturmediums und des Mycels) des 1., 3. und 6. Kulturtages vereinigt, konzentriert und mittels präparativer HPLC an einer RP-18-Phase fraktioniert (siehe Abbildung 2-36). Das Fraktionierungsprotokoll ist im Anhang aufgeführt. Die Fraktionen wurden konzentriert und eine Hälfte für weiterführende HPLC-MS-Untersuchungen, die andere Hälfte wurde für GC und GC-MS-Untersuchungen eingesetzt.

¹⁹ Der ELSD ist in Reihe zum UV / VIS-Detektor geschaltet

Tabelle 4-9: Bedingungen für die präparative HPLC

Pumpe	Programmierbare HPLC-Pumpe PU-980 mit binärer Hochdruckgradienteneinheit (Jasco)
Degasser	3-Kanal Degasser (Shodex)
Detektor	UV/VIS-Detektor UV-1570 (Jasco) mit präparativer Messzelle (1 mm / 17 μ L), Messwellenlänge 280 nm bzw. 254 nm
Datenauswertung	Borwin Chromatographie Software (Version 1.50)
Injektionsventil	Rheodyne-Ventil mit 500 μ L Probenschleife
Säule	Nucleosil EP 120-5 C18, 250 x 16 mm, 5 μ m (Macherey & Nagel)
Flussrate	10,0 mL \cdot min ⁻¹
Fließmittel	A: Methanol B: 0,1% Essigsäure in bidest. Wasser
Gradient	0. – 5. Minute 10% A und 90% B, konstant 5. – 30. Minute auf 25% A und 75% B 30. – 40. Minute auf 100% A
Fraktionssammler	SF-3120 (Advantec), Fraktionierung nach Peakerkennungsmodus und Zeit

4.12.3.3 Microbore HPLC

Die Fraktionen aus der präparativen HPLC wurden am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C unter Vakuum auf ca. 500 μ L eingengt, gegebenenfalls wurde die Probe verdünnt. Die konzentrierten Fraktionen wurden auf der analytischen HPLC auf das Auftreten neuer Verbindungen überprüft. Um ein Trennsystem für die HPLC-MS zu optimieren, wurde die Microbore-HPLC genutzt.

Tabelle 4-10: Bedingungen für die Micro-HPLC

Pumpe	Programmierbare HPLC-Pumpe PU-980 mit ternärer Gradienteneinheit (Niederdruck) LG-980-02 (Jasco)
Degasser	3-Kanal Degasser DG-980-50 (Jasco)
Detektor 1	UV/VIS-Detektor UV-970 (Jasco) Messwellenlänge variabel Mikromesszelle (5 mm optische Weglänge, 1 µL Zellvolumen)
Datenauswertung	Integrator CR 5A (Shimadzu)
Injektionsventil	Rheodyne-Ventil mit 10 µL Probenschleife
Säule	Luna C18(2), 150 x 2 mm, 3 µm (Phenomenex)
Flussrate	0,2 mL·min ⁻¹
Fließmittel	A: Methanol B: 0,5% Ameisensäure in bidest. Wasser
Gradient	An die Fraktion angepasst

4.12.3.4 Hochauflösende HPLC-MS

Die HPLC-MS-Analytik wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Hannover durchgeführt. Die hochauflösende HPLC-MS diente der Identifizierung neu auftretender Verbindungen, sowie von Verbindungen, die im Substrat vorkommen. Es handelt sich bei dem Detektionssystem um einen TOF-Detektor (Time of Flight). Die Ionisierung erfolgte im negativen und positiven Modus (ESI). Als Trennsäule wurde eine Luna C18(2) 3µm 150·2 mm (Phenomenex) benutzt.

Für die Ermittlung der Summenformel aus der hochaufgelösten Masse wurden folgende Kriterien festgelegt:

- Vorkommende Elemente: C, H, O, N, Na, Cl
- Abweichung der kalkulierten Masse von der ermittelten maximal 15 ppm (200 mDa)
- Zulässige Doppelbindungsäquivalente –0,5 bis 50

4.12.4 Gaschromatographie (GC)

4.12.4.1 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor

Zur Analyse der Ligninabbauprodukte und der Substanzen, die im Substrat enthalten sind, wurden Proben (Ethylacetatextrakte) mit BSTFA bzw. per Acetylierung derivatisiert und direkt für die GC eingesetzt.

Tabelle 4-11: Bedingungen für den GC-FID

Gaschromatograph	Trace GC 2000 (Thermoquest)
Injektor	Cold on Column (50 °C)
Trennsäule	DB 5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (J & W)
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID), 250°C
Trärgas	Wasserstoff, 2,1 mL·min ⁻¹
Detektorgase	Wasserstoff 35 mL·min ⁻¹ , Luft 350 mL·min ⁻¹
Datenaufnahme	Chrom Card Version 1.19 (CE Instruments)
Temperaturprogramm	50 °C (0,5 min), mit 4 °C·min ⁻¹ auf 300 °C (10 min)

4.12.4.2 Gaschromatographie mit massenselektivem Detektor

Tabelle 4-12: Bedingungen für die GC-MS

Gaschromatograph	HP 5890 (Hewlett-Packard)
Injektor	Cold on Column (50°C)
Trennsäule	CP- 5 CB; 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm (Varian)
Detektor	Mass Spectrometer 5989 A (Hewlett-Packard), MS Engine
Trärgas	Helium Vordruck 50 kPa, 2,3 mL·min ⁻¹
Temperaturen	Ionenquelle 250°C, Interface 250°C, Quadrupol Massenfilter 100°C
Ionisation	Elektronenstoßionisation 70 eV
Massenbereich	m/z 50 –800
Datenaufnahme	MS HP-UX ChemStation, B06.01 Software
Auswertung	Spektren-Datenbank: Wiley, NBS54K (Nist), selbst angelegte Datenbank
Temperaturprogramm	50 °C mit 4°C pro min auf 300 °C (10 min)

4.13 Entsorgungshinweise

4.13.1 Biologisches Material

Die Kulturen und Kulturreste wurden vor dem Entsorgen 40 min bei 121 °C (bei 1 bar Überdruck) autoklaviert. Medien wurden in den Ausguss gegeben, die autoklavierte Biomasse in den Laborabfall.

4.13.2 Lösemittel und Chemikalien

Der Verbrauch an Lösungsmitteln wurde durch weit gehende Wiederverwertung nach destillativer Aufreinigung auf ein Minimum reduziert. Nicht wieder verwertbare Lösungsmittel wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nicht halogenierte, wassermischbare Lösungsmittel
- nicht halogenierte, nicht wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte, wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte, nicht wassermischbare Lösungsmittel

Diese Lösungsmittel wurden ebenso wie die Chemikalienreste der zentralen Entsorgungseinrichtung der Universität Hannover zugeführt.

5 Literatur

- Abraham, B.: Flüchtige Metabolite in Submerskulturen ligninolytischer Pilze (Klasse Basidiomycetes), 1994, Dissertation Universität Hannover
- Adler, E.: Lignin chemistry - past, present and future, *Wood Sci. Technol.*, 1977, 11: 169-218
- Ander, P., Marzullo, L.: Sugar oxidoreductase and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation, *J. Biotechnol.*, 1997, 53: 115-131
- Barclay, L.R.C., Xi, F., Norris, J.Q.: Antioxidant properties of phenolic lignin model compounds, *J. Wood Chem. Technol.*, 1997, 17: 73-90
- Beck, H.: Biosynthetic pathway for halogenated methoxybenzaldehydes in the white rot fungus *Bjerkandera adusta*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, 149: 233-238
- Belitz, H.D., Grosch, W., Schieberle, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 2001, Springer Verlag
- Berg, R., Haenen, G., Berg, H., Bast, A.: Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures, *Food Chem.*, 1999, 66: 511-517
- Blau, K., King, G.: *Handbook of derivatives for chromatography*, 1978, Heyden & Son Ltd London U.K.
- Bocco, A., Cuvelier M.E., Richard H., Berset C.: Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seeds extracts, *J. Agri. Food Chem.*, 1998, 46: 2123-2129
- Bock, W.; Ohm, G.; Lange, E.; Mieth, G.: Antioxidative action of native lignin from carrots, *Nahrung*, 1984, 28(3): 273-278
- Bonnely S., Peyrat-Maillard M.-N., Rondini L., Masy D., Berset C.: Antioxidant activity of malt rootlet extracts, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48: 2785-2792
- Bonnin, E., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Thibault, J.: Enhanced bioconversion of vanillic acid into vanillin by the use of natural cellobiose, *J. Sci. Food Agric.*, 1999, 79: 484-486
- Bourbonnais, R., Paice, M.: Oxidation and reduction of lignin-related aromatic compounds by *Aurebasidium pullulans*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1987, 26:164-169
- Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgramm quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248-254
- Bungert, K.: *Untersuchungen der antioxidativen Wirkungen phenolischer Verbindungen*, 1996, Dissertation Universität Münster

- Bunzel M., Allerdings E., Sinwell V., Ralph J., Steinhart H.: Cell wall hydroxycinnamates in wild rice (*Zizania aquatica* L.) insoluble dietary fibre, *Eur. Food Res. Technol.*, 2002, 214: 482-488
- Bunzel M., Ralph J., Marita J.M., Hatfield R.D., Steinhart H.: Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre, *J. Sci. Food Agric.*, 2001, 81: 653-660
- Bunzel, M., Ralph, J., Kim, H., Hatfield, D., Steinhart, H.: Strukturuntersuchungen an Ligninen aus Getreideballaststoffen, *Lebensmittelchemie*, 2003, 57: 59
- Camarero, S., Guido, C.G., Martinez, A.T.: Demonstration of *in situ* oxidative degradation of lignin side chains by two white-rot fungi using analytical pyrolysis of methylated wheat straw, *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, 1997, 11: 331-334
- Childs, E., Abajjian, A.: Physico-chemical characterization of peanut hull as Potenzial fiber additive, *J. Food Sci.*, 1976, 41: 1235-1236
- Childs, R.E., Bardsley, W.G.: The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid as chromogen, *Biochem. J.*, 1975, 145: 4563-4567
- Cho S.S., Dreher M.L.: *Handbook of Dietary Fiber*, Food Science and Technology, A Series of Monographs, Textbooks and Reference Books, 2001, Marcel Dekker Verlag
- Cohen R., Persky L., Hadar Y.: Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 58: 582-594
- Crestini, C., Bernini, R., Porri, A., Giovannozzi-Sermanni, G.: Biodegradation of monomeric, dimeric and polymeric lignin models by *Lentinus edodes*, *Holzforschung*, 1996, 50: 193-200
- Cruz, J.M, Dominguez, J.M., Dominguez, H., Parajo, J: Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity, *Food Chem.*, 1999, 147-153
- Da Porto, C., Calligaris, S., Celotti, E., Nicoli, M.C.: Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH[•] Test, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48: 4241-4245
- Daigle D.J., Conkerton E.J., Sanders T.H., Mixon A.C.: Peanut hull flavonoids: their relationship with peanut maturity, *J. Agric. Food Chem.*, 1988, 36: 1179-1181
- Dastan, H.: Untersuchungen zur Aufklärung der Abbauprozesse von Lignin unter besonderer Berücksichtigung des Energiestoffwechsels der höheren Pilze am Beispiel von *Polyporus versicolor*, 1985, Dissertation Universität Oldenburg
- de Jong, E., Field, J., de Bont, J.: Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi, *FEMS Microbiol. Rev* 1994: 153-188

de la Rubia, T., Ruiz, E., Perez, J., Marinez, J.: Properties of a laccase produced by *Phanerochaete flavio-alba* induced by vanillin, *Archiv. Microbiol.*, online-Version 12.11.2002

DeLucca, A.J., Palmgren, M.S.; Daigle, D.J.: Depression of aflatoxin production by flavonoid-type compounds from peanut shells, *Phytopathology*, 1987, 77: 1560-1563

Dence, W.D., Dence, S.: *Methods in Lignin Chemistry*, 1992, Springer Verlag

Dyke, K.V.: Green tea extract and its polyphenols markedly inhibit luminol-dependent chemiluminescence activated by peroxyxynitrite or SIN-1, *Luminescence*, 2000; 15:37-43

Eriksson, K., Blanchette, R.A., Ander, P.: *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*, 1990, Springer Verlag

Faix, O.; Mozuch, M.D.; Kirk, T.K.: Degradation of gymnosperm (guaiacyl) vs. angiosperm (syringyl/guaiacyl) lignins by *Phanerochaete chrysosporium*, *Holzforschung*, 1985, 39(4): 203-208

Fukushima R.S., Hatfield R.D.: Extraction and isolation of lignin for the utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophometric method, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49: 3133-3139

Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G.: *Qualitätssicherung in der analytischen Chemie*, 1992, VCH Verlag

Gassner, G., Hohmann, W., Deutschmann, F., Bothe, F.: *Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel*, 1989, Gustav Fischer Verlag

Geng X., Li K.: Degradation of non-phenolic lignin by the white-rot fungus *Pycnoporus cinabarinus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 60: 342-346

Gerhardt U.: *Gewürze in der Lebensmittelindustrie*, 1990, Behr's Verlag

Goncalves, A.R.: Pyrolysis-gas chromatography of the macromolecular fractions of oxidized organocell lignins, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 1997, 40&41: 543-551

Guillen, M.D.: New components with Potenzial antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavouring preparations, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46: 1276-1285

Gutfinger, T.: Polyphenols in olive oils, *J. Am. Oil Soc.*, 1981: 966-968

Gutierrez, A., Carmelo, L., Prieto, A., Martinez, J., Martinez, M.: Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60: 1783-1788

Ha, H.-C., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M.: Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-depredating basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001; 55: 704-711

Haddadin, M.S.; Al-Natour, R.; Al-Qsous, S.; Robinson, R.K: Bio-degradation of lignin in olive pomace by freshly-isolated species of basidiomycete, *Bioresour. Technol.*, 2002, 82: 131-137

Hatfield, R.D., Grabber, J., Ralph, J., Brei, K.: Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: some cautionary notes, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47: 628-632

Hatfield, R.D., Raph, J., Grabber, J.H.: Cell wall structural foundations: molecular basis for improving forage digestibilities, *Crop Sci.*, 1999 b, 39: 27-37

Hattori, T., Shimada, M., Higuchi, T. Aromatic ring cleavage of vanillyl alcohol by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Mokuzai Gakkaishi*, 1989, 35: 933-937

Heine, E.: Biokatalyse, Verbundvorhaben der DBU, 2001, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 49-53

Hermann K.: Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse, 2001, Verlag Eugen Ulmer

Higuchi, T., Kawai, S., Umezawa, T. Degradation mechanism of phenolic beta-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1988, 262: 99-110

Higuchi, T.: Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes, *J. Biotechnol.*, 1993, 30: 1-8

Hirai, H., Kondo, R., Sakai, K.: Screenings of lignin-degrading fungi and their lignolytic enzyme activities during biological bleaching of kraft pulp, *Mokuzai Gakkaishi* 1994, 40: 980

Hiratsuka, N.; Wariishi, H.; Tanaka, H: Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 57: 563-571

Hiromi T.: Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Holzforschung*, 1999, 53: 21-28

Hofrichter, M., Steinbüchel, A.: Biopolymers, 2001, Wiley-VCH Verlag Weinheim

Hofrichter, M.: Depolymerisation of straw lignin by mangan peroxidase from *Nematoloma frowardii* is accompanied by release of carbon dioxide, *Holzforschung* 1999, 53: 161-166

Ionita, G., Sahini, V., Semensecu, G., Ionita, P.: Kinetics of oxidation of amino acids by some free stable hydrazyl radicals, *Acta Chi. Slov.*, 2000, 47: 111-119

Javor T., Buchberger W., Tanzcos I.: Determination of low-molecular-mass phenolic and non-phenolic lignin degradation compounds in wood digestion solution by capillary electrophoresis, *Microchim. Acta*, 2000, 135: 45-53

- Johanson, D.B., Moore, W.E., Zank, L.C.: The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples, *Tappi J.*, 1961, 44: 793-798
- Kang, M., Katsuzaki, H., Osowa, T.: Inhibition of 2,2'-azinobis(2,4-dimethylvaleronitrile)- induced lipid peroxidation by sesaminols, *Lipids*, 1998, 33: 1031-1036
- Karakaya, S., El, S.: Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods, *Food Chem.*, 1999, 66: 289-292
- Kashino, Y., Yamada, S. (Kobe Steel Ltd, Japan). *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 08003887 A2* 9 Jan 1996 Heisei, 8 pp. (Japan). Patent CLASS: ICM: D21C003-22. ICS: C12S003-08; D21C009-10. APPLICATION: JP 94-132284 14 Jun 1994
- Kasprzycka-Guttman, T.; Odzeniak, D.: Antioxidant properties of lignin and its fractions, *Thermochim. Acta*, 1994, 231: 161-168
- Kawai, S., Nakagawa, M., Ohashi, H.: Aromatic ring cleavage of a non-phenolic beta-O-4 lignin model dimer by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole, *FEBS Letters*, 1999, 446: 355-358
- Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T.: Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde, *Wood Res.*, 1989, 76: 10-16
- Kerr, T., Benner, R., Woodward, J., Rigsby, W., Windham, W.: Chemical composition and in-vitro digestibility of biologically depredated peanut hulls, *J. Sci. Food Agric.*, 1986, 3: 637-651
- Kim, D.; Lee, K., Hyon, J., Lee, C.: Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50: 3713-3717
- Kirk, T.K., Cullen, D.: Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi, *Environmentally Friendly Technology for the Pulp and Paper Industry*, 1998, John Wiley & Sons
- Kofujita, H.; Nabeta, K.; Okuyama, H.; Miyake, M.: Biodegradation of milled wood lignin on cellulose particle by *Lentinus edodes*, *Mokuzai Gakkaishi*, 1989, 35: 268-74
- Krings U., El Saharty Y., El-Zeany B. A., Pabel B., Berger R.G.: Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ, *Food Chem.*, 2000, 71: 91-95
- Krings U., Pilawa S., Theobald C., Berger R.G.: Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus* - elucidation of metabolic pathways using [5-2H]-ferulic acid, *J. Biotech.*, 2001, 85: 305-314
- Krings, U., Berger, R.G.: Biotechnological production of flavors and fragrances, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 49: 1-8
- Kunst A.: *Methods of enzymatic analysis*, 1984, 6: 178-185
- Kuroda, K., Nakagawa, A., Dimmel, D.: Pyrolysis of lignin in the presence of tetramethylammonium hydroxide (TMAH): products stemming from β -5

substructures, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50: 3396-3400

Lapadatescu, C., Bonnarne P.: Production of aryl metabolites in solid-state fermentations of the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*, *Biotechnol. Lett.* 1999, 21: 763-769

Lapadatescu, C., Ginies, C., Le Quere, J., Bonnarne, P.: Novel scheme for biosynthesis of aryl metabolites from l-phenylalanine in the fungus *Bjerkandera adusta*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000: 1517–1522

Lee K.-G., Shibamoto T.: Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50: 4947-4952

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M.; Cho, N., Hofricher, M.: Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi, *Fungal Genet. Biol.* 1999, 27: 175-185

Leonowicz, A.: Cooperation of fungal laccase and glucose 1-oxidase in transformation of Björkman lignin and some phenolic compounds, *Holzforschung*, 1999 b, 53: 376-380

Lesage-Meessen, L., Delattre, M., Haon, M., Thibault, J., Ceccaldi, B., Brunerie, P., Asther, M.: A two-step bioconversion process for vanillin, production, from ferulic acid, combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*, *J. Biotechnol.*, 1996: 50: 107-113

Lin Y.L., Shiao M.S., Kuo Y.H., Tsai W.J., Chen C.C.: Antioxidative principles from peanut hulls, *Chin. Pharm. J.*, 1999, 51: 397-401

Lomascolo A., Stentelaire C., Asther M., Lesega-Meesen L.: Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavors for the food industry, *Trends Biotechnol.*, 1999, 17: 282-289

Lu, H., Jun, Z., Xin, L., Tan, R.: Bioactive constituents from *Pteris multifida*, *Planta Med.*, 1999, 65: 586-587

Mai, C., Schormann, W., Milstein, O., Hüttermann, A.: Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, 54: 510-514

Majcherczyk, A., Johannes, C., Hüttnann: Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, 51: 267-276

Maman, O., Marseille, F., Guillet, B., Disnar, J., Morin, P.: Separation of phenolic aldehydes, ketones and acids from lignin degradation by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr., A*, 1996, 755: 89-97

Manimekalai, R.; Swaminathan, T: Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Bioprocess Eng.*, 2000, 22: 29-33

- Medvedeva S. A., Kanitskaya L. V., Volchatova I. V., Turchaninov V. K.: Biotransformation of Aspen lignin by the fungus *Trametes vellosus*, Chem. Nat. Compd., 2000, 36: 411-415
- Messner, K., Ertler, G., Srebotnik, E., Foiser, R., Petterson, B., Stavhelberger, H.: Cell wall systems, extracellular membraneous structure and lignase of wood rotting fungi, Degrad. Colloq. INRA 40 (Lignin Enzymic Microb.), 1987: 243-248
- Mester, T., Swarts, H., Sole, S., de Bont, J., Field, J.: Stimulation of aryl metabolite production in the basidiomycete *Bjerkandera* sp. strain BOS55 with biosynthetic precursors and lignin degradation products, Appl. Environ. Microbiol., 1997: 1987-1994
- Meyer A.S., Landbo A.-K.: Enzyme-assisted release of phenolic antioxidants from wine and juice press residues and their effect on human LDL oxidation in vitro, J. Agric. Food Chem., 2001, 269: 300-302
- Michal, G.: Biochemical Pathways, 1999, Spektrum Akademischer Verlag
- Miller, N.J., Diplock A.T., Rice-Evans, C.A.: Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage, J. Agric. Food Chem., 1995, 43:1794-1801
- Mori T., Kondo R.: Oxidation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, biphenyl, and diphenyl ether by the white-rot fungus *Phebia lindtneri*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 60: 200-205
- Mosca, L., de Marco, C., Visioli, F., Cannella, C.: Enzymatic assay for the determination of olive oil polyphenol content: assay conditions and validation of the method, J. Agric. Food Chem., 2000, 48: 297-301
- Moure A., Cruz J.M., Franco D., Dominguez J.M., Sineiro, Dominguez H., Nunez M.J., Parajo J.C.: Natural antioxidants from residual sources, Food Chem., 2001, 72: 145-171
- Muheim, A., Leisola, M., Schoemaker, H.: Aryl-alcohol oxidase and lignin peroxidase from the white-rot fungus *Bjerkandera adusta*, J. Biotechnol., 1990, 13: 159-167
- Müller, B., Münch, T., Muheim, A., Welti, M.: Process for the production of vanillin, Pat. Appl. EP0885968
- Niemelä K.: Low-molecular-weight organic compounds in birch kraft black liquor, Annales Academiae Scientiarum Fennicae, Series A II Chemica 229, Helsinki 1990
- Niwa T., Doi U., Kato Y., Osawa T.: Antioxidative properties of phenolic antioxidants isolated from corn steep liquor, J. Agric. Food Chem., 2001, 49: 177-182
- Ogunbiyi, Adetokunbo, Olawale: Animal feed produced from peanut shells, Brit. UK Pat. Appl. GB 2367995 A1 24 Apr 2002
- Pecina R., Burtscher P., Bonn G., Bobleter O.: GC-MS and HPLC analyses of lignin degradation products in biomass hydrolyzates, Fresenius J. Anal. Chem., 1986, 325:

461-465

Perez, J., de la Rubia, T., Hamman, O.B., Martinez, J.: Phanerochaete flavido-alba laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive mill waste waters, *App. Environ. Microbiol.*, 1998, 64: 2726-2729

Peters, Dissertation Universität Hannover, 2003, in Vorbereitung

Prior, R.L., Cao, G.: In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 27: 1173-1181

Rajarathnam, S., Shashirekha, M.N., Bano, Z.: Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 1998, 18:91-236

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Rice-Evans, C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26: 1231-1237

Renger, A., Steinhart, H.: Ferulic acid dehydrodimers as structural elements in cereal dietary fibre, *Eur. Food Res. Technol.*, 2000, 211: 422-428

Roche-Diagnostic-GOD-Testkit; Version 1 (August 1999)

Römpp, *Chemie Lexikon*, 1989, Thieme Verlag

Römpp, *Lexikon Biotechnologie*, 1992, Thieme Verlag

Römpp, *Lexikon Lebensmittelchemie*, 1995, Springer Verlag

Römpp, *Lexikon Naturstoffe*, 1997, Springer Verlag

Ruiz, J.C., de la Rubia, T., Perez, J., Martinez, J.: Effect of olive oil mill waste water on extracellular ligniolytic enzymes produced by *Phanaerochaete flavio-alba*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2002, 212: 41-45

Ryu, S., Ho, C., Osawa, T.: High performance liquid chromatographic determination of antioxidant lignan glycosides in some varieties of sesam, *Journal of Food Lipids*, 1998: 17-28

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J., Saura-Calixto, F.: Free radical scavenging capacity of selected red, rose and white wines, *J. Sci. Food Agric.*, 1999, 79: 1301-1304

Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H.: *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*, John Wiley & Sons, 1971, New York, 916

Sato, A., Nishio, K., Kitamura, T.: Ratio of syringaldehyde to vanillin of lignin in peanut, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 1972, 46: 603-605

Schieber A., Stintzing F.C., Carle, R.: Sekundäre Pflanzenstoffe - Aktuelle Aspekte zu Stabilität, Analytik und Gewinnung aus Nebenprodukten der Obst- und Gemüseverarbeitung, *Flüssiges Obst*, 2001, 68: 7-13

- Schlegel, H.: Allgemeine Mikrobiologie, 1992, Thieme Verlag,
- Schormüller J.: Handbuch der Lebensmittelchemie, Band VI, Alkaloidhaltige Genussmittel, Gewürze, Kochsalz, 1970, Springer Verlag
- Shimoni, K.: Physiological effects of flavonoids, Food Style, 1998, 2 (2): 37-42
- Shin, K.: Depolymerisation of lignosulfonate by peroxidase of the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*, Biotechnol. Lett., 1999, 21: 585-588
- Simon, A., Chulia, A.J., Kaouadji, M., Delage, C.: Quercetin 3-[triacylarabinosyl(1->6)galactoside] and chromones from *Calluna vulgaris*, Phytochemistry, 1994, 36: 1043-1045
- Simonetti, P., Pietta, P., Testolin, G.: Polyphenol content and total antioxidant potential of selected Italian wines, J. Agric. Food Chem. 1997, 45: 1152-1155
- Sobolev, V.S.: Vanillin content in boiled peanuts, J. Agric. Food Chem., 2001, 49: 3725-3727
- Stanley, R., Miller, S.: Enzymatic processing for the release of phenolic antioxidants from fruit waste, Royal Society of Chemistry 2001, 269: 552-556
- Steffen, K.T., Hofrichter, M.: Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 60: 212-217
- Syracuse Research Cooperation, <http://esc.srres.com>
- Tai, D., Terazawa, M., Cheng, C., Chang, H.: Lignin biodegradation products from birch wood by *Phanerochaete chrysosporium*, part 1, Holzforschung, 1990, 44: 185-190
- Tuor, U., Wariis, Gold, H.: Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model compound, Biochemistry, 1992, 31: 4986-4995
- Vasdev, K., Kuhad, R.C.: Induction of laccase production in *Cythus bulleri* under shaking and static culture conditions, Folia Microbiol., 1994, 39: 326-330
- Vaughn, S.F.: Phytotoxic and antimicrobial activity of 5,7-dihydroxychromone from peanut shells, J. Chem. Ecol. 1995, 21: 105-115
- Weinreich, B.: Untersuchungen zur Struktur und zum Extraktionsverhalten antioxidativ wirksamer Inhaltsstoffe aus Rosmarinus- und *Salvia officinalis* L., 1989, Dissertation TU München
- Yen, G., Duh, P.: Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars, J. Am. Oil Soc., 1995, 72: 1065-7
- Yen, G., Wu, J.: Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from

Ganoderma tsugae, Food Chemistry 1999, 65: 375-379

Yen, G.C., Chen, H.Y., Peng, H.H.: Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts, J. Agric. Food Chem. 1997, 45: 30-34

Yoshida, H., Sasaki, H., Fujimoto, S., Sugahar: The chemical components in the vegetative mycelia of *Basidiomycotina*, Nippon Kingakkai Kaiho, 1996, 37: 51-56

Yu, L.; Perret, J., Davy, B.; Wilson, J., Melby, C.: Antioxidant properties of cereal products, J. Food Sci., 2002, 67: 2600-2603

6 Anhang

6.1 Übersicht: Bestimmung der AOC und HPLC/GC-Probenaufbereitung

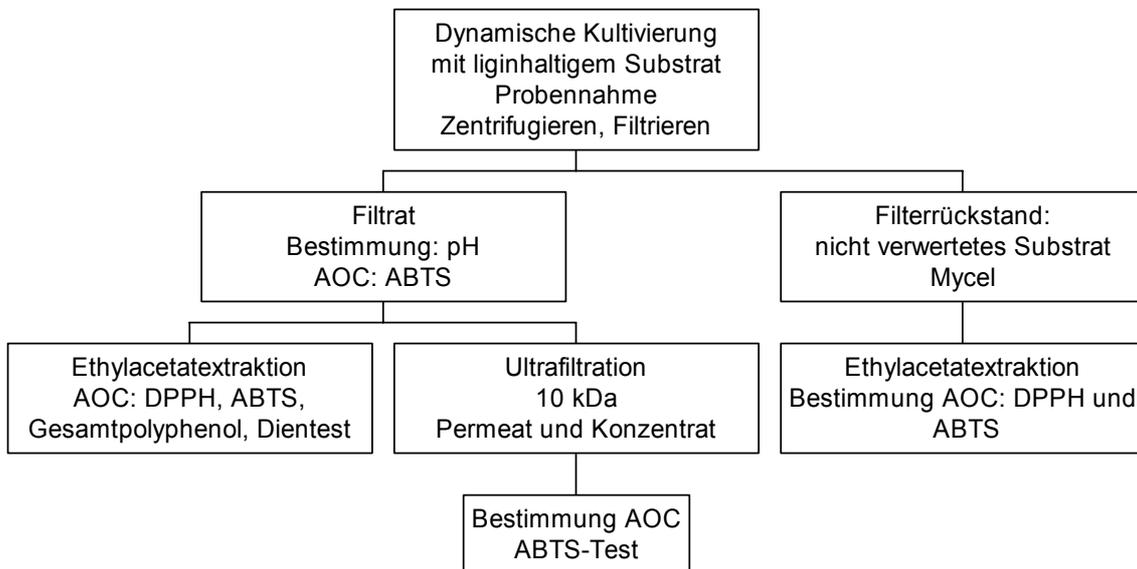


Abbildung 6-1: Darstellung der Vorgehensweise bei der Bestimmung der AOC, Teil 1 und 2 des Screenings

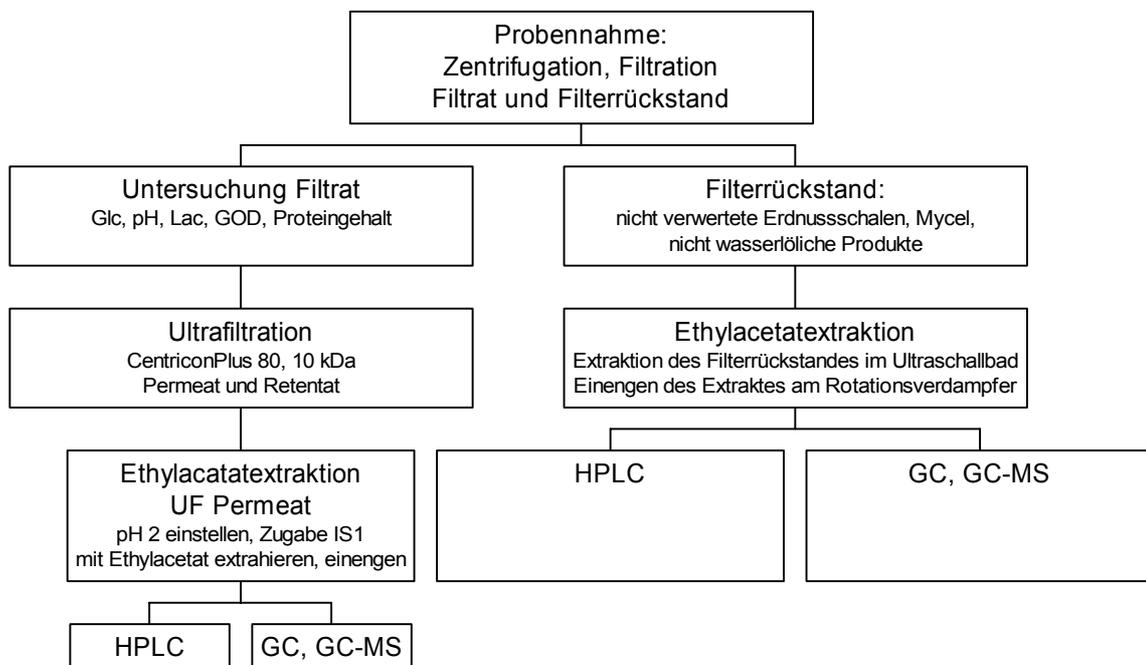


Abbildung 6-2: Probennahmeplan der Kultivierungen von LIR und PSA mit Erdnussschalen

6.2 Analytische HPLC - Peakauflistung

In Tabelle 6-1 sind die Retentionszeiten und die UV-Maxima aller durch die Substratzufuhr detektierbaren Abbauprodukte und Erdnussschaleninhaltsstoffe, die mittels HPLC mit UV-Detektion analysiert worden sind, aufgelistet. Die Peaks wurden nach zunehmender Elutionszeit nummeriert, Retentionszeiten und Intensität der UV-Signale anhand zweier Interner Standards (ISTD 1: Ethylvanillin und ISTD 2: Trolox) normiert.

Tabelle 6-1: Peak-Zuordnung monomerer Erdnussschalen-Inhaltsstoffe und Abbauprodukte mit Retentionszeit und UV-Maxima (HPLC-DAD)

Peak Nummer	R _t [min]	UV-Maximum [nm]	Verbindung
1	6,15	283	unbekannte Verbindung
2	11,42	263	Abbauprodukt
3	13,35	271	Abbauprodukt
4	15,81	259	Abbauprodukt
5	16,5	257	Abbauprodukt
6	16,5	260	Abbauprodukt
7	16,51	261 und 289	Vanillinsäure
8	17,02	287	Abbauprodukt
9	17,72	291	Z-Trihydroxymzimtsäure
10	18,12	279 und 310	Vanillin
11	18,36	291	E-Trihydroxymzimtsäure
12	19,26	295	Abbauprodukt
13	21,77	251 und 291	5,7-Dihydroxychromen-4-on
14	22,32	275	Abbauprodukt
15	22,45	291	Abbauprodukt
16	22,95	279	Abbauprodukt
17	23,78	283	p-Methoxybenzaldehyd
19	25,22	291	Abbauprodukt
20	25,51	287	Eriodictyol
21	28,07	291	Abbauprodukt
22	28,97	255 und 355	Luteolin
23	30,36	283	Abbauprodukt

6.3 Präparative HPLC

Bei den Fraktionierungen wurde ein Fraktionssammler mit Peakerkennungsmodus eingesetzt. Die Fraktionierung erfolgte aus einer Kombination aus Peakschwellenwert und Retentionszeit.

6.3.1 Fraktionierungsprotokoll BW Erdnussschalen

wait time: 2 min

monitor time: 2 min

request time: 30 s

abs. peak level: 5%

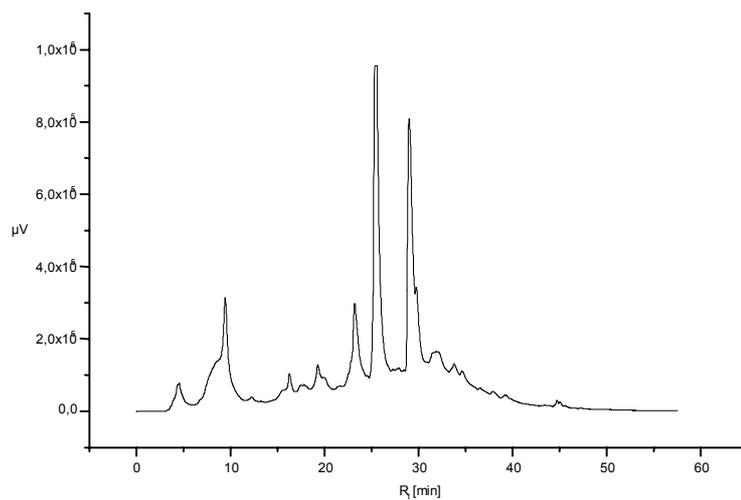


Abbildung 6-3: HPLC-Chromatogramm (präparativ): Gesamtethylacetatextrakt von BW Erdnussschalenpulver

Die gewonnenen Fraktion wurden zu den Fraktionen A-E vereint.

Tabelle 6-2: Fraktionen BW Erdnussschalen

Fraktion	Retentionszeit
A	0. min bis 10. min
B	11. min bis 12. min
C	13. min bis 19. min
D	20. min bis 25. min
E	25. min bis 40. min

Tabelle 6-3: Fraktionierung (SC) von Erdnussschalenextrakten an Kieselgel 60 und präparativer HPLC

Kieselgelfraktion	R _t [min] präp. HPLC	Bezeichnung der Fraktion nach präparativer HPLC
D	24,3 bis 24,85	D-P1
E	26,8 bis 27,5	E-P1
E	30,2 bis 30,71	E-P2

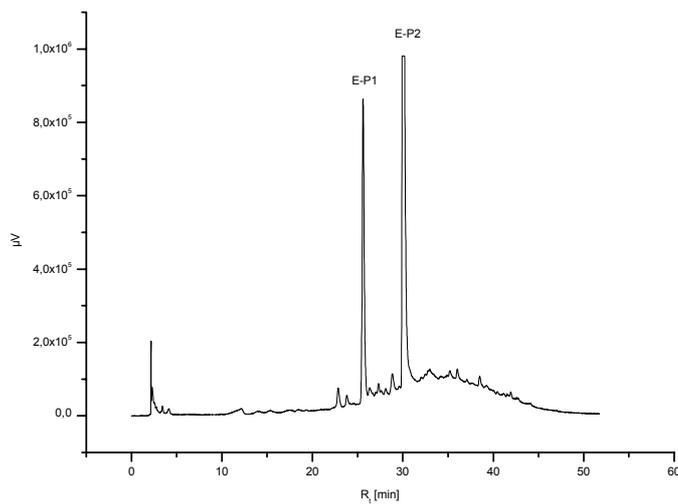


Abbildung 6-4: HPLC-Chromatogramm BW Erdnussschalen Fraktion E, mit E-P1: Eriodictyol und E-P2: Luteolin

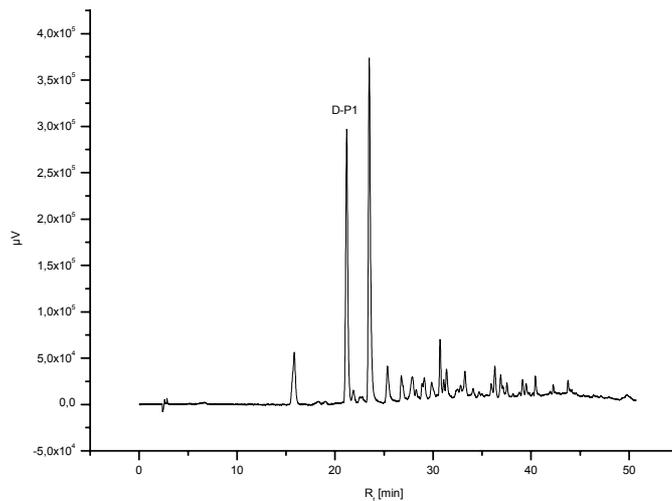


Abbildung 6-5: HPLC-Chromatogramm BW Erdnussschalen Fraktion D, mit D-P1: 5,7-Dihydroxychromen-4-on

6.3.2 Fraktionierungsprotokoll *Pleurotus sapidus* mit Erdnussschalen

wait time: 2 min

monitor time: 2 min

request time: 30 s

abs. peak level: 2%

Tabelle 6-4: Fraktionen PSA mit Erdnussschalen

Fraktion	Retentionszeit
A	0. min bis 10. min
B	11. min bis 20. min
C	21. min bis 30. min
D	31. bis 36. min
E	37. bis 42. min
F	43. bis 60. min

6.3.3 Fraktionierungsprotokoll *Lepista irina* mit Erdnussschalen

wait time: 2 min

monitor time: 2 min

request time: 30 s

abs. peak level: 2%

Tabelle 6-5: Fraktionen LIR mit Erdnussschalen

Fraktion	Retentionszeit
A	0. min bis 10. min
B	11. min bis 20. min
C	21 min bis 30. min
D	31. bis 36. min
E	37. bis 42. min
F	43. bis 60. min

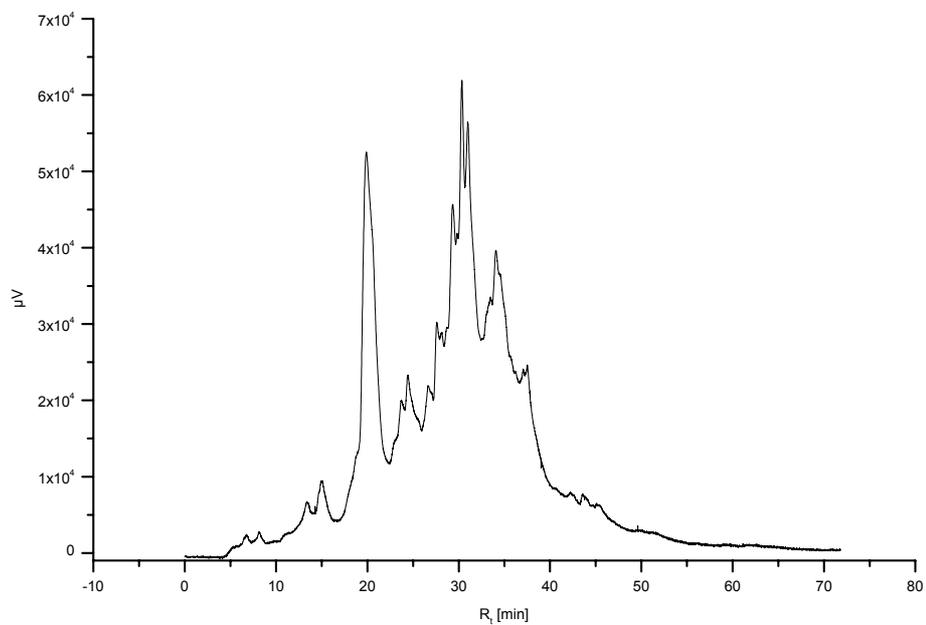


Abbildung 6-6: HPLC-Chromatogramm (präparativ) Gesamtethylacetatextrakt LIR mit Erdnussschalen (17. Kulturtag)

6.3.4 Fraktionierungsprotokoll *Lepista irina* + Erdnussschalenextrakt

wait time: 2 min

monitor time: 2 min

request time: 1 min

abs. peak level: 3%

Die gewonnenen Fraktion wurden zu den Fraktionen A-F vereint.

Tabelle 6-6: Fraktionen LIR mit Erdnussschalenextrakt

Fraktion	Retentionszeit
A	2 min bis 19 min 27 s
B	19 min 28 s bis 23 min
C	23 min 1 s bis 26 min
D	26 min 1 s bis 30 min
E	30 min 1 s bis 36 min
F	36 min 1 s bis 50 min

6.4 Abbauraten der Hauptinhaltsstoffe in Erdnussschalen

6.4.1 Dynamische Kultivierung von PSA mit Erdnussschalenpulver

Tabelle 6-7: Gehalte im Kulturmedium in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen

Kulturtag	Vanillin	Abnahme%	Vanillinsäure	Abnahme%	Eriodictyol	Abnahme%
7	6,6	81,9	9,6	78,6	19,8	64,1
14	4,7	87,1	8,7	80,6	n.w.	100
21	n.w.	100	2,4	94,6	n.w.	10
29	n.w.	100	n.w.	100	n.w.	100
BW Erdnuss	36,4	--	--	--	--	--

Tabelle 6-8: Gehalte im Filtrerrückstand in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen

Kulturtag	Vanillin	Abnahme%	Eriodictyol	Abnahme%	Luteolin	Abnahme%
7	4,1	64	164,2	67,5	204	58,6
14	n.w.	100	124,6	75,3	120	75,6
21	n.w.	100	95,5	81,1	109	77,9
29	n.w.	100	73,4	85,5	129	73,8
BW Erdnuss	11,4	--	504,5	--	492,5	--

6.4.2 Statisch-dynamische Kultivierung von *Pleurotus sapidos* mit Erdnussschalenpulver

Tabelle 6-9: Gehalte im Kulturmedium in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen, HPLC-Untersuchung

Kulturtag	Vanillin	Vanillin Abnahme%	Vanillinsäure	Vanillinsäure Abnahme%	Eriodictyol	Eriodictyol Abnahme%
1	n.w.	100	n.w.	100	19,2	76,8
4	n.w.	100	n.w.	100	n.w.	100
8	n.w.	100	n.w.	100	n.w.	100
14	n.w.	100	n.w.	100	n.w.	100
BW Erdnuss	44,6	--	19,4	--	82,6	--

Tabelle 6-10: Gehalte im Filtrerrückstand in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Erdnussschalen, HPLC-Untersuchung

Kulturtag	Vanillin	Vanillin Abnahme%	Eriodictyol	Eriodictyol Abnahme%	Luteolin	Luteolin Abnahme%
1	6	9,1	233,6	55,5	351	57,8
4	n.w.	100	203,9	61,2	302,6	63,6
8	n.w.	100	175,9	66,5	297,1	64,3
14	n.w.	100	156,3	70,2	249	70,1
BW Erdnuss	6,6	--	524,9	--	831,5	--

6.5 Abbauprodukte: GC-Massenspektren (TMS-Derivate)

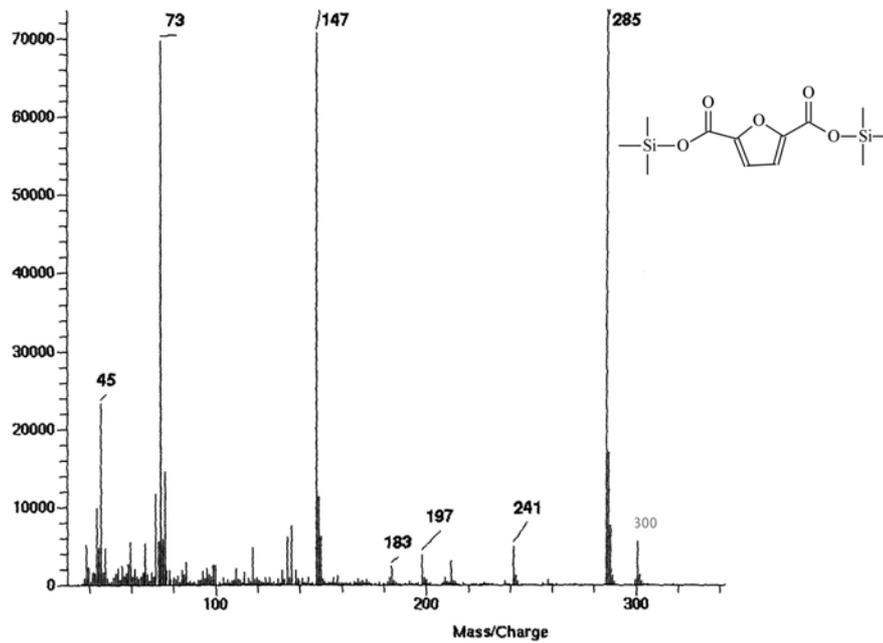


Abbildung 6-7: GC-Massenspektrum von 2,5-Furandicarbonsäure, Kováts-Index 1651

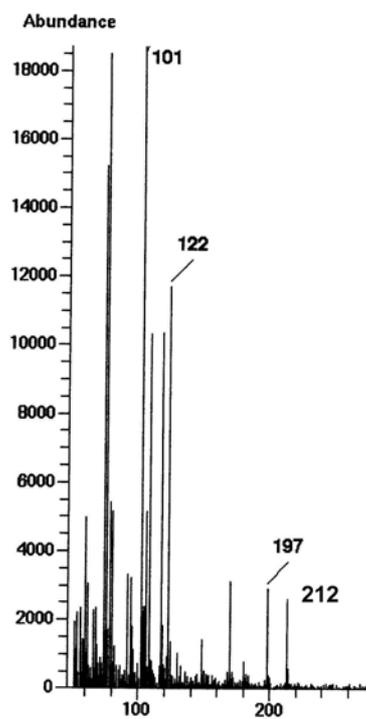


Abbildung 6-8: LIR mit Erdnussschalen Fraktion C, Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 1439

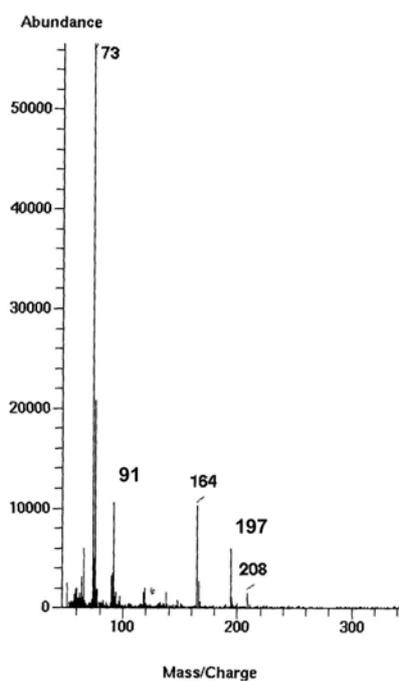


Abbildung 6-9: LIR mit Erdnussschalen Fraktion D, Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 1295

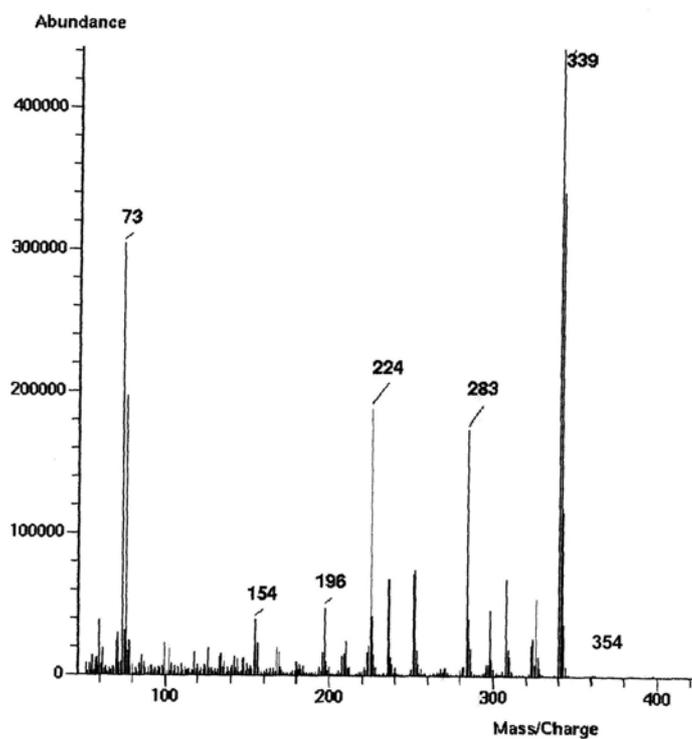


Abbildung 6-10: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion B, Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 2014

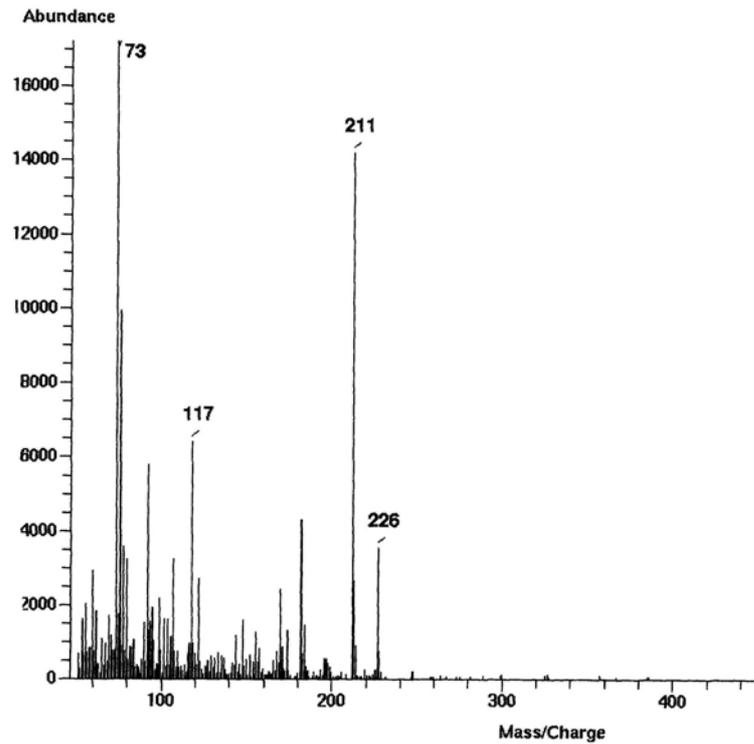


Abbildung 6-11: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion B: Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 1440

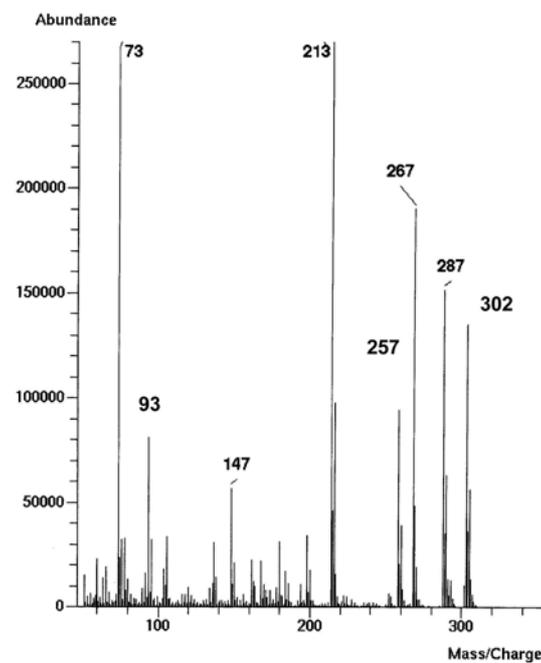


Abbildung 6-12: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion B: Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 1635

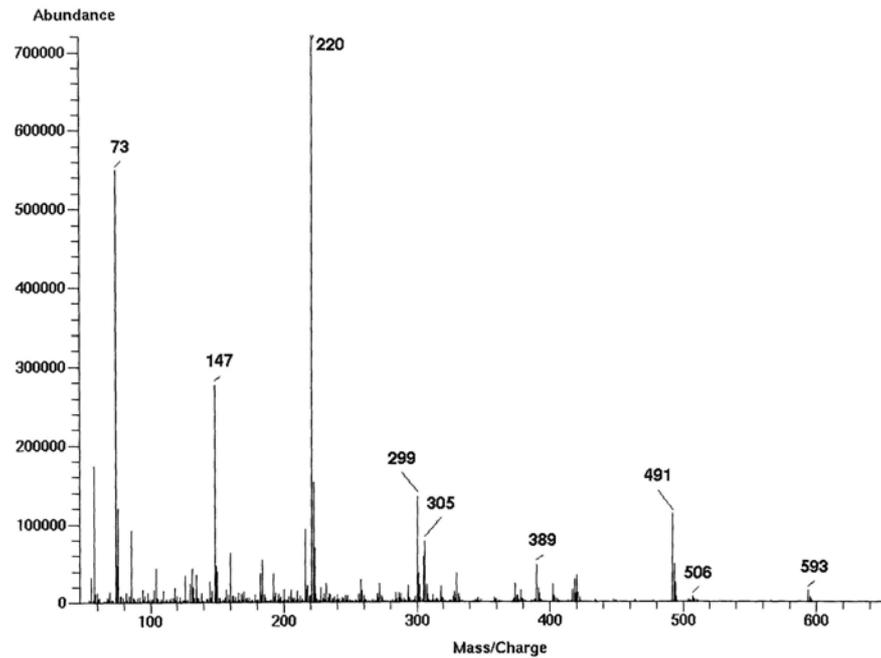


Abbildung 6-13: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion B, Ligninabbauprodukt, der Molpeak ist nicht erkennbar

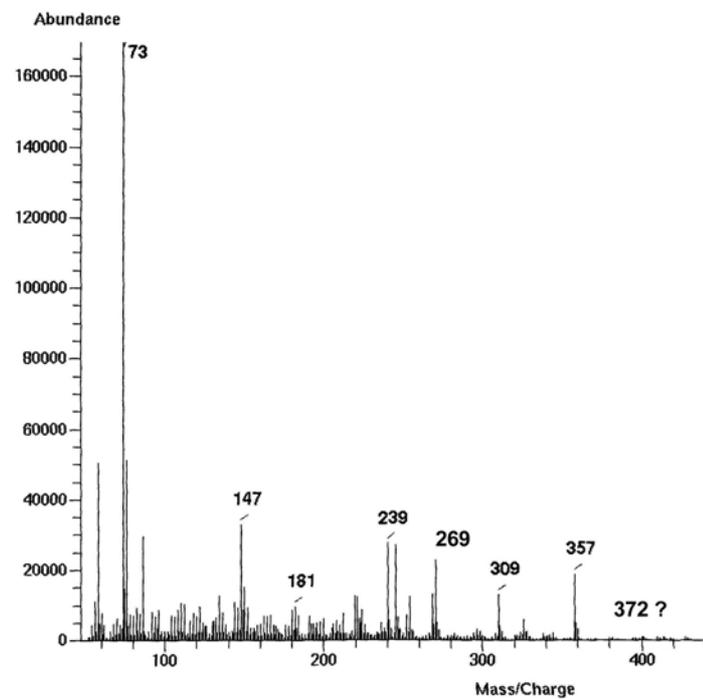


Abbildung 6-14: LIR mit Erdnussschalenextrakt Fraktion E, Ligninabbauprodukt, Kováts-Index 2140

6.6 Fed-batch-Verfahren *Pleurotus sapidus* plus Erdnussschalen

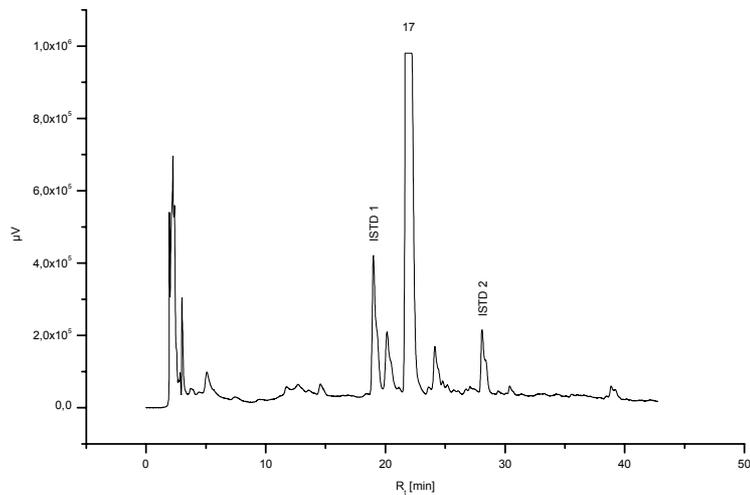


Abbildung 6-15: HPLC-Chromatogramm (280 nm) einer Fed-batch-Kultivierung von PSA (1. Zyklus), 9: Trihydroxycimtsäure, 13: 5,7-Dihydroxychromen-4-on und 17: p-Methoxybenzaldehyd

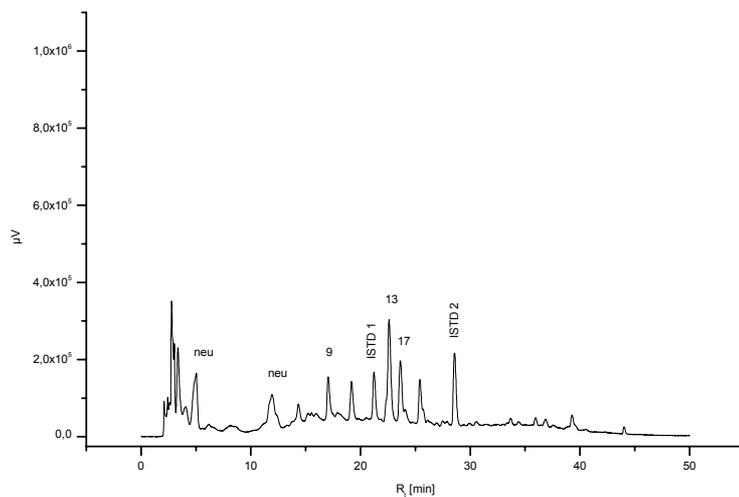


Abbildung 6-16: HPLC-Chromatogramm (280 nm) einer Fed-batch-Kultivierung von PSA (2. Zyklus), mit: 1: p-Methoxybenzaldehyd

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 24.08.1970

Geburtsort: Lampertheim

Berufserfahrung und Praktika

Seit 04/2003	Stellvertretender Laborleiter bei der LUFA-ITL GmbH in Kiel
10/1999 bis 03/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktorand am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover bei Prof. Berger
04/1999 bis 08/1999	Praktikum bei Merck KGaA in Darmstadt
12/1997 bis 08/1998	Praktisches als Lebensmittelchemiker in Münster

Studium

08/1998	2. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker
07/1997 bis 08/1998	Praktisches Jahr für Lebensmittelchemiker
03/1997	1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker
10/1994 bis 03/1997	Lebensmittelchemiestudium an der Universität Bonn
07/1994	Vordiplom Chemie, Heidelberg
10/1991 bis 09/1994	Chemiestudium an der Universität Heidelberg

Wehrdienst

07/1990 bis 06/1991	Grundwehrdienst in Wildflecken
---------------------	--------------------------------

Schulbildung

06/1990	Allgemeine Hochschulreife: Abitur
08/1981 bis 06/1990	Albertus-Magnus-Schule (Gymnasium), Viernheim
07/1977 bis 06/1981	Grundschule Lampertheim-Hüttenfeld