

Biotechnologische Verwertung lignolytischer Industrieabfälle zur Isolierung phenolischer Substanzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Anna-Lena Maria Hiller

geb. 07.01.1995 in Rüdesheim am Rhein

Mainz, Januar 2026

©2026. Dieses Werk ist unter der InC-1.0-Lizenz lizenziert.

Biotechnologische Verwertung lignolytischer Industrieabfälle zur Isolierung phenolischer Substanzen

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Betreuer:

2. Betreuer:

1. Gutachter: Prof. Dr. Eckhard Thines

2. Gutachterin: Prof. Dr. Helen May-Simera

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2026

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Anna-Lena Maria Hiller, an Eides statt, die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Biotechnologische Verwertung lignolytischer Industrieabfälle zur Isolierung phenolischer Substanzen“

selbstständig angefertigt und keine weiteren, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die vorliegende Dissertation hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keinem anderen universitären Prüfungsamt vorgelegen.

Mainz, Januar 2026

[Anna-Lena Maria Hiller]

Inhaltsverzeichnis

Abstract	i
Zusammenfassung	iii
Abkürzungsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	xv
1. Einleitung	1
1.1 Lignin als alternativer Rohstoff für eine nachhaltige Zukunft	1
1.2 Lignin – ein natürlich vorkommendes Biopolymer	3
1.3 Industrielle Lignine und ihre Anwendung	5
1.4 Lignin-degradierende Mikroorganismen im Überblick	7
1.4.1 Charakterisierung des Basidiomyceten <i>Agrocybe pediades</i>	8
1.4.2 Charakterisierung des Ascomyceten <i>Alternaria alstroemeriae</i>	9
1.4.3 Charakterisierung des Ascomyceten <i>Coniolaria hispanica</i>	9
1.4.4 Charakterisierung des Ascomyceten <i>Chaetomium leptoderma</i>	10
1.4.5 Charakterisierung der Basidiomyceten <i>Pleurotus pulmonarius</i> und <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
1.5 Biologischer Abbau von Lignin durch enzymatische Reaktionen.....	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Medienbestandteile	15
2.1.1 Wasser	15
2.1.2 Antibiotika	15
2.1.3 Lösungsmittel	15
2.1.4 Säuren und Laugen	15
2.1.5 Industrielle Ligninabfälle	16
2.1.6 Lösungen, Puffer und weitere Chemikalien.....	16
2.1.7 Kulturmedien	18
2.1.8 Programme und Software.....	20
2.2 Organismen.....	21
2.2.1 Kultivierte Pilzstämmen	21
2.2.2 Testorganismen zur biologischen Charakterisierung	28
2.2.3 Isolierung von Pilzen aus der Natur	30
2.3 Fermentationsmethoden und Naturstoffanalyse	31
2.3.1 Vorkultivierung verschiedener Pilzstämmen.....	31
2.3.2 Gewinnung von Rohextrakten aus Submerskulturen	32

2.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS)	33
2.3.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	35
2.4 Enzym-Assays	36
2.4.1 Qualitativer Nachweis lignolytischer Enzymaktivität	36
2.4.2 Quantitativer Nachweis von Laccasen und Peroxidasen - ABTS-Test	36
2.4.3 Qualitativer Katalase-Assay	37
2.4.4 Quantitativer Peroxygenase-Assay	37
2.4.5 Qualitativer P450-Monooxygenase-Assay	37
2.5 Biologische Aktivitätstests	38
2.5.1 Agardiffusionstest	38
2.5.2 Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest	38
2.5.3 Zytotoxizitäts-Assay	39
2.5.4 Wachstums- und Biofilm-Assay	40
2.6 Molekularbiologische Arbeiten	42
2.6.1 Nukleinsäuren-Präparation	42
2.6.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation der ITS-Region	43
2.6.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	44
3. Ergebnisse	45
3.1. Fermentation von <i>Agrocybe pediades</i> mit industriellem Ligninabfall	47
3.1.1. Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat und Isolierung neuer phenolischer Substanzen	47
3.1.2 Fermentation mit Kraftlignin	53
3.1.3 Fermentations-Monitoring sowie quanti- und qualitative Enzym-Assays	54
3.1.4 Biologische Charakterisierung der Substanzen P1 und P2	61
3.2 Fermentation von <i>Alternaria astroemeriae</i> mit industriellem Ligninabfall	64
3.2.1. Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat und Isolierung einer neuen phenolischen Substanz	64
3.2.2. Fermentation mit Kraftlignin	69
3.2.3 Fermentations-Monitoring sowie quanti- und qualitative Enzymtests	70
3.2.4 Biologische Charakterisierung der Substanz X1	72
3.3. Fermentation von <i>Coniolaria hispanica</i> mit industriellem Ligninabfall	74
3.3.1 Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat und Isolierung neuer phenolischer Substanzen	74
3.3.2 Fermentation mit Kraftlignin	81
3.3.3. Fermentations-Monitoring mit quanti- und qualitativem Enzymtest	82
3.3.4 Biologische Charakterisierung der Substanzen L2, L3, L7-1 und L8	84

3.4. Fermentation von <i>Chaetomium leptoderma</i> mit industriellem Ligninabfall.....	86
3.4.1 Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat und Isolierung neuer phenolischer Substanzen	86
3.4.2. Fermentation mit Kraftlignin	89
3.4.3 Fermentations-Monitoring mit quanti- und qualitativem Enzymtest	91
3.4.4 Biologische Charakterisierung der Substanzen L4 und L5	93
3.5 Fermentation von <i>Pleurotus pulmonarius</i> mit industriellem Ligninabfall	95
3.5.1 Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat	95
3.5.2 Fermentation mit Kraftlignin und Isolierung einer neuen phenolischen Substanz..	97
3.5.3 Fermentations-Monitoring mit quanti- und qualitativem Enzymtest	99
3.5.4 Biologische Charakterisierung der Substanz A1	101
3.6 Fermentation von <i>Pleurotus ostreatus</i> mit industriellem Ligninabfall	102
3.6.1 Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat	102
3.6.2 Fermentation mit Kraftlignin	104
3.6.3 Fermentations-Monitoring mit quanti- und qualitativem Enzymtest	106
3.6.4 Biologische Charakterisierung der Substanzen	107
3.7 Übersicht der Ergebnisse	108
4. Diskussion und Ausblick	111
4.1 Identifizierung und Charakterisierung phenolischer Substanzen nach Fermentation filamentöser Pilze mit industriellem Ligninabfall.....	112
4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Harzsäure-Derivate.....	112
4.1.2 Identifizierung und Charakterisierung des isolierten Lignan-Derivates	117
4.1.3 Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Indol- und Isocumarin-Derivate	120
4.1.4 Identifizierung und Charakterisierung von Anisaldehyd.....	124
4.2 Analyse extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme und die potenzielle Biosynthese der isolierten phenolischen Substanzen	126
4.2.1 Analyse extrazellulärer Enzymaktivitäten sowie die potenzielle Biosynthese der Harzsäure-Derivate	126
4.2.2 Analyse extrazellulärer Enzymaktivitäten sowie die potenzielle Biosynthese des Lignin-Derivates	132
4.2.3 Analyse extrazellulärer Enzymaktivitäten sowie die potenzielle Biosynthese der Indol- und Isocumarin-Derivate.....	134
4.2.4 Analyse extrazellulärer Enzymaktivitäten sowie der potenziellen Biosynthese von Anisaldehyd.....	139
5. Literaturverzeichnis	142
6. Anhang	157
6.1 ITS-Sequenzen der eigenständig isolierten Pilzstämmen	157
6.2 HPLC-Chromatogramme verschiedener Pilzisolat und Reinsubstanzen	159
6.2.1 HPLC-Chromatogramme von <i>Agrocybe pediades</i>	159

6.2.2 HPLC-Chromatogramme der Abietinsäure und Dehydroabietinsäure	162
6.2.3 HPLC-Chromatogramme von <i>Alternaria alstroemeriae</i>	164
6.2.4 HPLC-Chromatogramm von Conidendrin	165
6.2.5 HPLC-Chromatogramme von <i>Coniolarrella hispanica</i>	165
6.2.6 HPLC-Chromatogramme von <i>Chaetomium leptoderma</i>	167
6.2.7 HPLC-Chromatogramme von <i>Pleurotus pulmonarius</i>	168
6.2.8 HPLC-Chromatogramme von <i>Pleurotus ostreatus</i>	169
6.3 Fermentations-Monitoring von <i>Coniolarrella hispanica</i>	170
6.4 NMR-Spektren der isolierten Reinsubstanzen	171
6.4.1 NMR-Spektren der Reinsubstanzen P1 und P2 von <i>Agrocybe pediades</i>	171
6.4.2 NMR-Spektren der Reinsubstanz X1 von <i>Alternaria alstroemeriae</i>	173
6.4.3 NMR-Spektren der Reinsubstanzen L2, L7-1 und L8 von <i>Coniolarrella hispanica</i>	174
6.4.4 NMR-Spektren der Reinsubstanz L4 von <i>Chaetomium leptoderma</i>	177
6.4.5 NMR-Spektren der Reinsubstanz A1 von <i>Pleurotus pulmonarius</i>	178
6.5 Auswertung Wachstums- und Biofilm-Assay	179
6.5.1 Wachstumskurven der Stämme <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 und PA14 nach Inkubation mit verschiedenen Reinsubstanzen.....	179
6.5.2 Biofilm-Assay der Stämme <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 und PA14 nach Inkubation mit verschiedenen Reinsubstanzen.....	182

Abstract

Industrial waste can have devastating effects on the environment. These pollute soil, water, and air and have a significant impact on biodiversity, human health, and climate change. Due to the wide variety of different types of industrial waste, such as gases (CO₂, N₂), heavy metals, mineral waste (e.g., dust or ash), and organic residues (e.g., lignin), there are currently insufficient recycling and recovery options for all types of industrial waste. With the European Green Deal 2019, the EU has committed to becoming climate neutral by 2050. To achieve this, the development of a sustainable circular economy and associated recycling strategies require further advancement. A particular focus is on lignolytic industrial waste. Lignin is produced in large quantities of around 70 – 100 million tons annually as a by-product of the paper and pulp industry, of which only 2 % is currently recycled. The majority is burned for energy. Since Lignin is a constantly renewable raw material with an aromatic basic structure that can be used in a wide range of industrial applications due to its complexity and stability, there is particular interest in finding further modification and degradation options for industrial lignin waste. Filamentous fungi, especially basidiomycetes, are of particular interest because they produce a variety of lignin-degrading enzymes such as laccases and peroxidases and may therefore also be important for the recycling of lignolytic industrial waste.

As part of this work, 180 different filamentous fungi were submerged-cultivated with two different types of industrial lignin waste, and the resulting culture filtrate was extracted and subsequently analyzed using HPLC. A comprehensive screening process identified 50 different fungal strains that survived in the lignolytic industrial waste and degraded Magnesium lignosulfonate and Kraftlignin consistently. Since the focus was not only on degradation but also on the activity of lignin-degrading enzymes, qualitative and quantitative enzyme tests were performed. However, no lignin-degrading enzyme could be isolated, so priority was given to the isolation and structural elucidation of potential new phenolic substances formed during lignin degradation. A total of six different fungal strains were identified, including three basidiomycetes and three ascomycetes, which were able to consistently degrade lignolytic industrial waste. Eleven potential novel phenolic substances were detected in the culture filtrate, eight of which were successfully identified using NMR analysis.

Agrocybe pediades produced the two resin acid derivatives 15-hydroxy-7-oxo-dehydroabietic acid and 16-hydroxy-7-oxo-dehydroabietic acid, which were detected for the first time during the fermentation of a filamentous fungus in industrial lignin waste. 16-hydroxy-7-oxo-dehydroabietic acid has not been described in the literature before. Furthermore, toxicity tests revealed that both substances are less toxic than the precursors, abietic acid and dehydroabietic acid, which means that they could be used more widely in the future, e.g., in pharmaceuticals and cosmetics.

Alternaria alstroemeriae produced the lignan derivative Detetrahydroconidendrine, which is bioactive against *Bacillus brevis*. During the fermentation of *Coniolaria hispanica*, the indole derivative Methyl indole-5-carboxylate and the isocoumarin derivatives 8,9-Dehydroxylarone and 5-Carboxymellein were isolated. Another resin acid derivative, 7-oxo-dehydroabietic acid, was produced by *Chaetomium leptoderma* and exhibited an inhibitory effect on *Bacillus brevis*. The two basidiomycetes *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus ostreatus* produced anisaldehyde.

These studies have confirmed that filamentous fungi can be successfully used in the biotechnological valorization of industrial lignin waste. In addition, the biotransformation of potentially bioactive lignin and resin acid derivatives as well as the secretion of various secondary metabolites were detected, which could potentially find industrial applications in the future.

Zusammenfassung

Industrielle Abfälle können gravierende Auswirkungen auf die Umwelt haben. Diese belasten Boden, Wasser sowie Luft und beeinflussen maßgeblich die Biodiversität, die Gesundheit der Menschen sowie den Klimawandel. Aufgrund der Anzahl unterschiedlicher Industrieabfälle, wie z.B. Gase (CO₂, N₂), Schwermetalle, mineralische Abfälle, beispielsweise Staub oder Asche, aber auch organische Reststoffe, wie z.B. Lignin, gibt es bislang nicht für alle Industrieabfälle ausreichende Recycling- bzw. Verwertungsmöglichkeiten. Mit dem *European Green Deal* 2019 hat sich die EU verpflichtet bis 2050 klimaneutral zu werden. Um dies zu erreichen, muss die Entwicklung einer nachhaltigen Kreislaufwirtschaft und damit einhergehende Recyclingstrategien weiter gefördert werden. Im besonderen Fokus steht dabei lignolytischer Industrieabfall. Lignin entsteht jährlich in der Papier- und Zellstoffindustrie in großen Mengen von ca. 70 – 100 Mio. Tonnen als Nebenprodukt, wovon derzeit nur ca. 2 % recycelt werden. Der überwiegende Teil wird zur Energiegewinnung verbrannt. Da es sich um einen stetig nachwachsenden Rohstoff mit aromatischer Grundstruktur handelt und dieser aufgrund seiner Komplexität und Stabilität industriell vielfältig einsetzbar ist, besteht besonderes Interesse daran weitere Modifikations- bzw. Degradationsmöglichkeiten für industrielle Ligninabfälle zu finden. In besonderem Fokus stehen dabei filamentöse Pilze, darunter vor allem Basidiomyceten, da diese eine Vielzahl an Lignin-degradierenden Enzymen, wie z.B. Laccasen und Peroxidasen produzieren, weshalb diese bei der Verwertung lignolytischer Industrieabfälle ebenfalls von Bedeutung sein können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 180 verschiedene filamentöse Pilze in zwei verschiedenen industriellen Ligninabfällen kultiviert und das daraus resultierende Kulturfiltrat extrahiert und im Anschluss mittels HPLC analysiert. Anhand des umfassenden Screening-Verfahrens konnten 50 verschiedene Pilzstämme identifiziert werden, welche in den lignolytischen Industrieabfällen, Magnesium-Lignosulfonat und Kraftlignin, überlebten und eine Degradation dieser aufwiesen. Da neben der Degradation auch die Aktivität der Lignin-degradierenden Enzyme im Fokus stand, wurden sowohl qualitative wie auch quantitative Enzymtests durchgeführt. Im Zuge dieser Arbeit konnte jedoch kein Lignin-degradierendes Enzym erfolgreich isoliert werden, sodass die Priorität auf der Isolierung und Strukturaufklärung potenziell neuer phenolischer Substanzen, welche, während der Lignindegradation entstehen, lag. Insgesamt konnten sechs verschiedene Pilzstämme, darunter drei Basidiomyceten und drei Ascomyceten identifiziert werden, welche konstant die lignolytischen Industrieabfälle degradieren konnten und wobei potenziell 11 neue phenolische Substanzen im Kulturfiltrat detektiert wurden.

Insgesamt konnten 8 der isolierten Substanzen erfolgreich mittels NMR-Analyse identifiziert werden. *Agrocybe pediades* produzierte die zwei Harzsäure-Derivate 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure, welche erstmals durch Kultivierung eines filamentösen Pilzes in industriellem Ligninabfall detektiert werden konnten. Die Substanz 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure wurde zudem zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben. Anhand durchgeführter Toxizitäts-Assays konnte außerdem gezeigt werden, dass beide Substanzen weniger toxisch sind als die Ausgangssubstanzen Abietin- bzw. Dehydroabietinsäure, wodurch diese zukünftig z.B. in der Pharmazie sowie in der Kosmetikbranche verstärkt einsetzbar wären. *Alternaria alstroemeriae* produzierte das Lignan-Derivat Detetrahydroconidendrin, welches bioaktiv gegenüber *Bacillus brevis* ist. Bei der Kultivierung von *Coniolaria hispanica* konnte das Indol-Derivat Methylindol-3-Carboxylat sowie die Isocumarin-Derivate 8,9-Dehydroxylaron und 5-Carboxymellein isoliert werden. Ein weiteres Harzsäure-Derivat, 7-oxo-Dehydroabietinsäure, wurde von *Chaetomium leptoderma* produziert und wies zudem ebenfalls eine inhibitorische Aktivität gegenüber *Bacillus brevis* auf. Die zwei Basidiomyceten *Pleurotus pulmonarius* und *Pleurotus ostreatus* produzierten Anisaldehyd.

Die vorliegende Arbeit beweist, dass filamentöse Pilze bei der biotechnologischen Verwertung von industriellem Ligninabfall erfolgreich eingesetzt werden können. Zudem konnte sowohl die Biotransformation von potenziell bioaktiven Lignin- und Harzsäure-Derivaten sowie die Sekretion verschiedener Sekundärmetabolite nachgewiesen werden, welche potenziell zukünftig in der Industrie Anwendung finden könnten.

Abkürzungsverzeichnis

99	<i>Bacillus brevis</i>
AcN	Acetonitril
CH	Cyclohexan
d	Tage
DHAA	Dehydroabietinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EA	Ethylacetat
ED	<i>Enterobacter dissolvens</i>
E	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure (<i>Formic acid</i>)
h	Stunden
H ₂ O _{PCR}	Nuklease-freies Wasser
H ₂ O _{UF}	ultrafiltriertes Wasser
H ₂ O _{VE}	vollentionisiertes Wasser
HBT	1-Hydroxy-Benzotriazol
HCl	Salzsäure
HeLa S3	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HepG2	Leberkrebszellen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie
HPSF	<i>High Purity Salt Free</i>
Hyg	Hygromycin
IBWF	Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung
ITS	<i>Internal transcript spacer</i>
KCl	Kaliumchlorid
KL	Kraftlignin
KOH	Kaliumhydroxid
LBM	<i>Lignin modifying enzyme basal medium</i>
LigS	Magnesium-Lignosulfonat
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MeOH	Methanol
min	Minuten
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NaOCl	Natriumhypochlorit
NaOH	Natronlauge
NBD	5-nitro-1,3-benzodioxol
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i>
Pen	Penicillin
Pn	<i>Penicillium notatum</i>

ppm	<i>Parts per million</i>
Pvar.....	<i>Paecilomyces variotii</i>
RE	Rohextrakt
RPE-1	retinale Pigment Epithelzellen
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
SL.....	<i>Micrococcus luteus</i>
Strep	Streptomycinsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
TÜ	<i>Mucor miehi</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
VH10tert.....	Fibroblasten

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagramm der Kreislaufwirtschaft nach dem Schweizer Bundesamt für Umwelt (2019).....	2
Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Lignozellulose mit Fokus auf die Einzelkomponenten Zellulose, Hemizellulose und Lignin (Bertella und Luterbacher, 2020).	3
Abbildung 3: Chemische Struktur der Phenylpropanoid-Einheiten des nativen Lignins (Erfani Jazi et al., 2019).....	4
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Laccase- (A) und Laccase-Mediator (B) katalysierten Oxidation von Substraten (Kaur et al., 2022).	12
Abbildung 5: Darstellung eines katalytischen Zyklus einer Häm-Peroxidase (Sugano und Yoshida, 2021).	13
Abbildung 6: Darstellung eines katalytischen Zyklus einer Manganabhängigen Peroxidase (Hofrichter, 2002).....	13
Abbildung 7: Darstellung des Ablaufs der im Verlauf dieser Arbeit angewandten Vorgehensweise.....	46
Abbildung 8: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Agrocybe pediades</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).	48
Abbildung 9: UV- (A) und Massenspektren (B) der Substanz P aus dem Rohextrakt von <i>Agrocybe pediades</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.	48
Abbildung 10: Chemische Struktur von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) aus der Fermentation von <i>Agrocybe pediades</i> in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.	49
Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Abietinsäure (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).	50
Abbildung 12: UV- (A) und Massenspektren (B) von Abietinsäure aus der Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Reinsubstanz (grau).	50
Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Dehydroabietinsäure (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).....	51
Abbildung 14: UV- (A) und Massenspektrum (B) von Dehydroabietinsäure aus der Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Reinsubstanz (grau).	51
Abbildung 15: Konzentration von P1 und P2 während der Kultivierung von <i>Agrocybe pediades</i> in Minimalmedium mit Abietinsäure im Vergleich zur Kultivierung in Minimalmedium mit Dehydroabietinsäure über einen Zeitraum von 14 Tagen.....	52
Abbildung 16: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Agrocybe pediades</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz).....	53
Abbildung 17: UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz P1 und P2 aus dem Rohextrakt von <i>Agrocybe pediades</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin.	54

Abbildung 18: Fermentationsverlauf von <i>Agrocybe pediades</i> in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab.	55
Abbildung 19: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von <i>Agrocybe pediades</i>	56
Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Agrocybe pediades</i> nach 24-stündiger Kultivierung des Kulturfiltrates der einwöchigen Soja-Vorkultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Sojamedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).....	57
Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Agrocybe pediades</i> nach 24-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zur Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat unter Zugabe von Katalase (orange).....	58
Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Agrocybe pediades</i> nach 24-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zur Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat unter Zugabe von Kohlenmonoxid (orange).	60
Abbildung 23: Auswertung des MTT-Assays der Zelllinien RPE-1 (A), HepG2 (B) und VH10tert (C).	62
Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Alternaria alstroemeriae</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).	65
Abbildung 25: UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz X1 aus dem Rohextrakt von <i>Alternaria alstroemeriae</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.	65
Abbildung 26: Chemische Struktur von Detetrahydroconidendrin (X1) aus der Fermentation von <i>Alternaria alstroemeriae</i> in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.	66
Abbildung 27: UV- (A) und Massenspektren (B) von Conidendrin aus dem Rohextrakt von Magnesium-Lignosulfonat.	67
Abbildung 28: Chemische Struktur von Conidendrin isoliert aus dem Rohextrakt von Magnesium-Lignosulfonat.	67
Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Conidendrin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).	68
Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Alternaria alstroemeriae</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz).....	69
Abbildung 31: Fermentationsverlauf von <i>Alternaria alstroemeriae</i> in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab.	70
Abbildung 32: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von <i>Alternaria alstroemeriae</i>	71
Abbildung 33: Fotografische Dokumentation des Agardiffusionstest der Substanz Detetrahydroconidendrin (X1) (links) gegenüber <i>Bacillus brevis</i> im Vergleich zu den Kontrollen (rechts).	72

- Abbildung 34:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).75
- Abbildung 35:** UV-Spektren der Substanz L1 aus dem Rohextrakt von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (A) im Vergleich zur Substanz X1 von *Alternaria alstroemeriae* (B).75
- Abbildung 36:** UV- (A) und Massenspektrum (B) von Substanz L2 aus dem Rohextrakt von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.76
- Abbildung 37:** UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz L3 aus dem Rohextrakt von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.76
- Abbildung 38:** UV-(A) und Massenspektrum (B) von Substanz L8 aus dem Rohextrakt von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.77
- Abbildung 39:** Chemische Struktur von Methylindol-3-Carboxylat (L2) und 8,9-Dehydroxylaron (L8) aus der Fermentation von *Coniolarrella hispanica* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.78
- Abbildung 40:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).78
- Abbildung 41:** UV-Spektrum von Substanz L7 aus dem Rohextrakt von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu dem Signal bei Retentionszeit 13,8 Minuten aus der Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (grau).79
- Abbildung 42:** UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz L7-1 aus dem Rohextrakt von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.80
- Abbildung 43:** Chemische Struktur von 5-Carboxymellein (L7-1) aus der Fermentation von *Coniolarrella hispanica* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.80
- Abbildung 44:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz).81
- Abbildung 45:** Fermentationsverlauf von *Coniolarrella hispanica* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab.82
- Abbildung 46:** Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Coniolarrella hispanica*.83
- Abbildung 47:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).87
- Abbildung 48:** UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz L4 aus dem Rohextrakt von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.87

Abbildung 49: UV- (A) und Massenspektrum (B) von Substanz L5 aus dem Rohextrakt von <i>Chaetomium leptoderma</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.	88
Abbildung 50: Chemische Struktur von 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) aus der Fermentation von <i>Chaetomium leptoderma</i> in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.	89
Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Chaetomium leptoderma</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz).....	89
Abbildung 52: UV-Spektren der Substanz L4 aus dem Rohextrakt von <i>Chaetomium leptoderma</i> nach zweiwöchiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) und Minimalmedium mit Lignosulfonat (grau) im Vergleich.	90
Abbildung 53: Fermentationsverlauf von <i>Chaetomium leptoderma</i> in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab.	91
Abbildung 54: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von <i>Chaetomium leptoderma</i>	92
Abbildung 55: Fotografische Dokumentation des Agardiffusionstest der Substanz 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) (links) gegenüber <i>Bacillus brevis</i> im Vergleich zu den Kontrollen (rechts).	93
Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Pleurotus pulmonarius</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz).	96
Abbildung 57: UV-Spektren des Signals bei Retentionszeit 14,5 Minuten aus dem Rohextrakt von <i>Pleurotus pulmonarius</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (A) im Vergleich zu der Substanz P1 und P2 von <i>Agrocybe pediades</i> (B).	96
Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Pleurotus pulmonarius</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz).....	98
Abbildung 59: UV-Spektren von Substanz P1 und P2 aus dem Rohextrakt von <i>Pleurotus pulmonarius</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (A) im Vergleich zu der Substanz P1 und P2 von <i>Agrocybe pediades</i> (B).	98
Abbildung 60: UV- (A) und Massenspektrum (B) von Substanz A1 aus dem Rohextrakt von <i>Pleurotus pulmonarius</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin.	99
Abbildung 61: Chemische Struktur von Anisaldehyd (Substanz A1) aus der Fermentation von <i>Pleurotus pulmonarius</i> in Minimalmedium mit Kraftlignin.	99
Abbildung 62: Fermentationsverlauf von <i>Pleurotus pulmonarius</i> in Minimalmedium mit Kraftlignin über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab.	100
Abbildung 63: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von <i>Pleurotus pulmonarius</i>	101
Abbildung 64: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Pleurotus ostreatus</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Lignosulfonat (schwarz).	103

Abbildung 65: UV-(A) und Massenspektrum (B) der Substanz A1 aus dem Rohextrakt von <i>Pleurotus ostreatus</i> (blau) nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Lignosulfonat.	103
Abbildung 66: UV-Spektren der Substanz P1 und P2 aus dem Rohextrakt von <i>Pleurotus ostreatus</i> (blau) und <i>Pleurotus pulmonarius</i> (grau) nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat im Vergleich.	104
Abbildung 67: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Pleurotus ostreatus</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz).	105
Abbildung 68: UV-Spektren der Substanz A1 (A) und der Substanz P1 und P2 (B) aus dem Rohextrakt von <i>Pleurotus ostreatus</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) sowie Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (grau).	105
Abbildung 69: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von <i>Pleurotus ostreatus</i>	107
Abbildung 70: Chemische Struktur von 15-hydroxy-Dehydroabietinsäure im Vergleich zu 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) sowie 16-hydroxy-Dehydroabietinsäure im Vergleich zu 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2).	114
Abbildung 71: Chemische Struktur von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1), 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) und 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4).	115
Abbildung 72: Chemische Struktur von Detetrahydroconidendrin (X1) und Conidendrin im Vergleich.	118
Abbildung 73: Chemische Struktur von Justicidin B und Detetrahydroconidendrin im Vergleich.	119
Abbildung 74: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von <i>Pleurotus pulmonarius</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> und <i>Agrocybe pediades</i> im Vergleich.	130
Abbildung 75: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von <i>Chaetomium leptoderma</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> und <i>Agrocybe pediades</i> im Vergleich.	131
Abbildung 76: Potenzieller Schritt der Metabolisierung von Conidendrin zu Detetrahydroconidendrin.	133
Abbildung 77: Potenziell letzter Schritt der Biosynthese von Methylindol-3-Carboxylat.	135
Abbildung 78: Chemische Struktur von 6-Pentyl- α -Pyron und 8,9-Dehydroxylaron im Vergleich.	137
Abbildung 79: Chemische Struktur von Mellein und 5-Carboxymellein im Vergleich.	138
Abbildung 80: Potenzieller Biosyntheseweg von Anisaldehyd.	140
Abbildung 81: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Agrocybe pediades</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen.	159
Abbildung 82: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Agrocybe pediades</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Abietinsäure (blau) im Vergleich zu den Kontrollen.	159

- Abbildung 83:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Dehydroabietinsäure (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **160**
- Abbildung 84:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **160**
- Abbildung 85:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 24-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zu den Kontrollen. **161**
- Abbildung 86:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 72-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zur Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat unter Zugabe von Kohlenmonoxid (orange). **161**
- Abbildung 87:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 72-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zu den Kontrollen. **162**
- Abbildung 88:** HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Abietinsäure (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **162**
- Abbildung 89:** HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Dehydroabietinsäure (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **163**
- Abbildung 90:** HPLC-MS-Chromatogramm der Reinsubstanzen Abietinsäure (grün) und Dehydroabietinsäure (gelb) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz). **163**
- Abbildung 91:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Alternaria alstroemeriae* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **164**
- Abbildung 92:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Alternaria alstroemeriae* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **164**
- Abbildung 93:** HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Conidendrin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **165**
- Abbildung 94:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **165**
- Abbildung 95:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **166**
- Abbildung 96:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **166**
- Abbildung 97:** HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. **167**

Abbildung 98: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Chaetomium leptoderma</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen.	167
Abbildung 99: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Pleurotus pulmonarius</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen.	168
Abbildung 100: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Pleurotus pulmonarius</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen.	168
Abbildung 101: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Pleurotus ostreatus</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen.	169
Abbildung 102: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von <i>Pleurotus ostreatus</i> nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen.	169
Abbildung 103: Fermentationsverlauf von <i>Coniolaria hispanica</i> in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 8 Tagen im 20 L-Maßstab.	170
Abbildung 104: ¹ H-NMR-Spektrum von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1).	171
Abbildung 105: ¹³ C-NMR-Spektrum von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1).	171
Abbildung 106: ¹ H-NMR-Spektrum von 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2).	172
Abbildung 107: ¹³ C-NMR-Spektrum von 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2).	172
Abbildung 108: ¹ H-NMR-Spektrum von Detetrahydroconidendrin (X1).	173
Abbildung 109: ¹³ C-NMR-Spektrum von Detetrahydroconidendrin (X1).	173
Abbildung 110: ¹ H-NMR-Spektrum von Methylindol-3-Carboxylat (L2).	174
Abbildung 111: ¹³ C-NMR-Spektrum von Methylindol-3-Carboxylat (L2).	174
Abbildung 112: ¹ H-NMR-Spektrum von 5-Carboxymellein (L7-1).	175
Abbildung 113: ¹³ C-NMR-Spektrum von 5-Carboxymellein (L7-1).	175
Abbildung 114: ¹ H-NMR-Spektrum von 8,9-Dehydroxylaron (L8).	176
Abbildung 115: ¹³ C-NMR-Spektrum von 8,9-Dehydroxylaron (L8).	176
Abbildung 116: ¹ H-NMR-Spektrum von 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4).	177
Abbildung 117: ¹³ C-NMR-Spektrum von 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4).	177
Abbildung 118: ¹ H-NMR-Spektrum von Anisaldehyd (A1).	178
Abbildung 119: ¹³ C-NMR-Spektrum von Anisaldehyd (A1).	178
Abbildung 120: Wachstumskurven von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 DSM 19880 (A) und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit den Reinsubstanzen P1 und P2 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.	179
Abbildung 121: Wachstumskurven von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 DSM 19880 (A) und <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz X1 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.	179

- Abbildung 122:** Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz L2 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.....**180**
- Abbildung 123:** Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz L5 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.....**180**
- Abbildung 124:** Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz L7-1 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.....**181**
- Abbildung 125:** Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz L8 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle.....**181**
- Abbildung 126:** Auswertung des Biofilm-Assays von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 nach 72-stündiger Inkubation mit den Reinsubstanzen P1 & P2, X1, L2, L5, L7-1 und L8.....**182**
- Abbildung 127:** Auswertung des Biofilm-Assays von *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 nach 72-stündiger Inkubation mit den Reinsubstanzen P1 & P2, X1, L2, L5, L7-1 und L8.....**182**

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zur Selektion neu isolierter Pilzstämmen und zur Durchführung biologischer Aktivitätstest verwendete Antibiotika-Stammlösungen.	15
Tabelle 2: Für die Herstellung von Medien zur Submerskultivierung sowie zum Nachweis von Enzymaktivitäten verwendete Lösungen.....	16
Tabelle 3: Für die Herstellung von genomischen DNA-Extraktionen, anschließender Auftrennung mittels Gelelektrophorese sowie für Enzym-Assays verwendete Puffer.	17
Tabelle 4: Für die Herstellung von Medien zur Submerskultivierung sowie zum Nachweis von Enzymaktivitäten verwendete Chemikalien.....	17
Tabelle 5: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Programme und Software.	20
Tabelle 6: Organismen und ihre Herkunft.....	22
Tabelle 7: Bakterien, Pilze, Oomyceten, Pflanzen und Zellen, welche für die biologische Charakterisierung einzelner Substanzen verwendet worden sind.....	28
Tabelle 8: Protokoll der Oberflächensterilisation von Ästen.....	30
Tabelle 9: Elutionsschritte der Kieselgelchromatographie.	32
Tabelle 10: Standard-Gradient der analytischen HPLC.....	33
Tabelle 11: Standard-Gradient der analytischen HPLC-MS.....	34
Tabelle 12: Standard-Gradient der präparativen HPLC.....	35
Tabelle 13: Organismen, welche für den Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest verwendet worden sind.....	39
Tabelle 14: Absorptionswerte für die Auswertung des Biofilm-Assays.....	41
Tabelle 15: Ablauf der Three-Step PCR mit der DreamTaq™ DNA-Polymerase zur Amplifikation der ITS-Region.....	43
Tabelle 16: Oligonukleotide, welche zur Amplifikation der ITS-Region mittels PCR verwendet worden sind.....	44
Tabelle 17: Isolierte Substanzen verschiedener Pilzstämmen nach Kultivierung dieser in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat bzw. Kraftlignin.	108

1. Einleitung

1.1 Lignin als alternativer Rohstoff für eine nachhaltige Zukunft

Der Klimawandel, welcher überwiegend im Zusammenhang mit der Nutzung fossiler Rohstoffe als Brennstoffe steht, zählt zu den größten Herausforderungen unserer Zeit. Das *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) prognostizierte 2021, dass sich die Erdoberfläche im Vergleich zur vorindustriellen Zeit bis 2100 um 1,4 °C – 4,4 °C erwärmen wird (IPCC, 2021). Die Hauptursache dafür sind Treibhausgase, die zum einen natürlichen Ursprungs sind, aber auch durch unser menschliches Handeln entstehen. Allen voran Kohlenstoffdioxid (CO₂), aber auch Distickstoffmonoxid (N₂O) und Methan (CH₄) tragen maßgeblich zur Erderwärmung bei (Joos und Sarmiento, 1995). Der stetige Anstieg der CO₂-Emission geht vor allem auf die Nutzung fossiler Rohstoffe, wie z.B. Erdöl oder Erdgas, zurück, insbesondere wenn diese zur Energiegewinnung verbrannt werden. Im Jahr 2023 konnte bereits ein CO₂-Gehalt von mehr als 419 *Parts per million* (ppm) gemessen werden. Im Vergleich dazu lag dieser Wert vor der Industrialisierung mit 280 ppm bei etwas mehr als die Hälfte (World Meteorological Organization, 2024).

Die Problematik bezieht sich jedoch nicht nur auf die steigenden Emissionen, sondern auch auf die begrenzte Verfügbarkeit der fossilen Ressourcen. Die weltweiten Vorkommen von Erdöl, das seit Jahrzehnten zur Herstellung von z.B. Kunststoffen, Lösungsmitteln oder chemischen Zwischenprodukten genutzt wird, ist limitiert. Nach aktuellen Berechnungen aus dem Jahr 2023 wird die vorhandene Menge an Erdöl bei gleichbleibendem Verbrauch voraussichtlich nur noch 40 – 50 Jahre ausreichen. Zudem wird es mit der Zeit immer schwerer und teurer werden, die verbleibenden Erdöl-Ressourcen zu erschließen (IEA, 2023; Murray und King, 2012). Die doppelte Belastung aus Klimawandel und Ressourcenknappheit, verdeutlicht die Notwendigkeit auf langfristig nachhaltige Alternativen umzusteigen.

Um den Übergang zu einer klimaneutralen, ressourcenschonenden Wirtschaft zu schaffen, ist die Entwicklung neuer Materialien auf Basis alternativer, biobasierter Rohstoffe von entscheidender Bedeutung. Dies lenkt den Fokus vor allem auf die Forschung und Anwendung alternativer Ressourcen. Im Hinblick auf eine nachhaltige Zukunft ist es vor allem wichtig, die anfallenden Industrieabfälle weitgehend nach dem Prinzip der Kreislaufwirtschaft wiederzuverwerten (Fetting, 2020; IPCC, 2021; Schoenmakere *et al.*, 2016).

Bei dem Modell der Kreislaufwirtschaft (*Circular Economy*), welches von Stahel und Reday-Mulvey in den 1970er Jahren erstmals bei der europäischen Kommission vorgetragen wurde, geht es im Vergleich zur „*Linear Economy*“ darum, dass Ressourcen geschont und nachhaltig genutzt werden. Der Fokus liegt klar auf der Wiederverwendung und Förderung der Lebensdauer.

1.2 Lignin – ein natürlich vorkommendes Biopolymer

Lignin ist neben Zellulose und Hemizellulose Bestandteil jeder pflanzlichen Zellwand und bildet zusammen mit diesen, die so genannte Lignozellulose (Abb. 2), welche Hauptbestandteil (ca. 70 %) der pflanzlichen Biomasse ist (van Maris *et al.*, 2006). Es ist das zweithäufigste natürlich vorkommende Biopolymer nach Zellulose und trägt vor allem zur Stabilität und Festigkeit der Pflanze bei, schützt sie gleichzeitig aber auch vor mikrobiellen Angriffen und Abbau sowie oxidativem Stress. Des Weiteren unterstützt Lignin den Wasser- und Nährstofftransport innerhalb der Pflanze über weite Strecken, da es durch seine hydrophoben Eigenschaften den Austritt dieser aus den Leitbahnen verhindert (Whetten und Sederoff, 1995; Sarkanen *et al.*, 1971; Funaoka *et al.*, 1995).

Lignin ist zudem biologisch abbaubar und fungiert auch als Antioxidationsmittel oder UV-Absorber (Lin *et al.*, 2021). Die exakte Zusammensetzung von Zellulose, Hemizellulose und Lignin ist abhängig von den jeweiligen Pflanzen und ihrer Herkunft. Im Allgemeinen enthalten Harthölzer 40 – 55 % Zellulose, 24 – 40 % Hemizellulose und 18 – 25 % Lignin, Weichhölzer hingegen ca. gleich viel Zellulose und Hemizellulose wie Harthölzer jedoch mit 25 – 35 % mehr Lignin. Insgesamt bestehen 15 – 30 % der gesamten Lignozellulose aus Lignin (Abb. 2) (Thakur und Thakur, 2015; Erfani Jazi *et al.*, 2019).

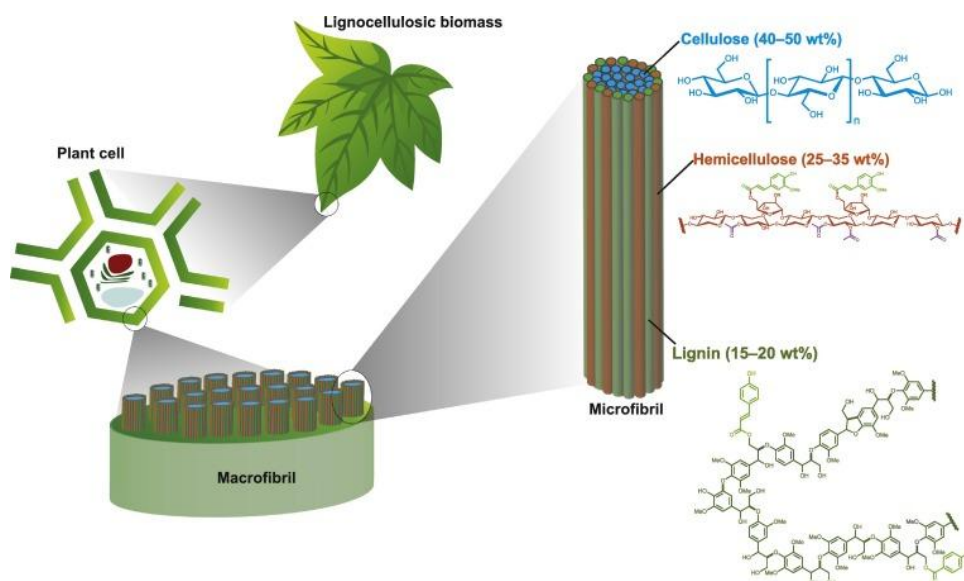


Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Lignozellulose mit Fokus auf die Einzelkomponenten Zellulose, Hemizellulose und Lignin (Bertella und Luterbacher, 2020).

Lignin selbst ist ein komplexes, wasserunlösliches, dreidimensionales, aromatisches Netzwerk (Funaoka *et al.*, 1995). Es besteht aus den drei Phenylpropanoid-Einheiten p-Coumaryl-, Coniferyl- und Synapylalkohol (Abb. 3), welche über Kohlenstoff-Kohlenstoff (C-C) oder Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindungen (Ether-Bindungen (C-O-C)) miteinander radikalisch verknüpft werden. Die häufigste Verknüpfung ist die β -O-4 Verknüpfung (> 50 %) (Boudet *et al.*, 1995; Whetten und Sederoff, 1995).

Durch Sekundärreaktionen während der Polymerisierung entsteht die Verknüpfung zwischen Lignin und Hemizellulose (Kirk & Farrell, 1987). P-Coumaryl ist die Vorstufe für die p-Hydroxyphenyl-Einheit (H), Coniferylalkohol für die Guaiacyl-Einheit (G) und der Synapylalkohol für die Syringyl-Einheit (S) (Abb. 3). Die Zusammensetzung der einzelnen Monolignol-Einheiten G, S und H variiert von Pflanze zu Pflanze. Weichhölzer haben den größten Lignin-Anteil, wobei dieses überwiegend aus G-Einheiten besteht, während Harthölzer über eine Mischung aus G- und S-Einheiten verfügen. Gräser wiederum bestehen überwiegend aus G-Einheiten, ergänzt durch H- und S-Einheiten (Faix, 1991; Calvo-Flores und Dobado, 2010; Martinez *et al.*, 2005).

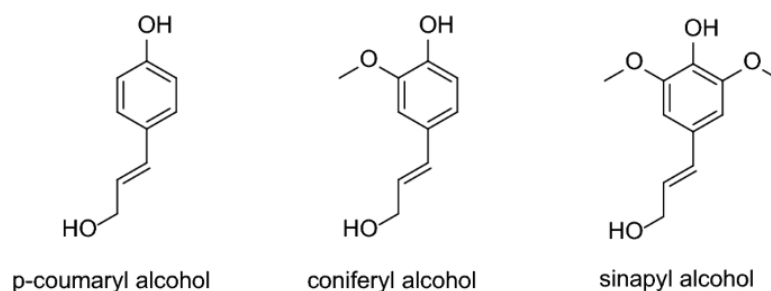


Abbildung 3: Chemische Struktur der Phenylpropanoid-Einheiten des nativen Lignins (Erfani Jazi *et al.*, 2019). Abgebildet sind von links nach rechts p-Coumaryl-Alkohol (H-Einheit), Coniferyl-Alkohol (G-Einheit) und Sinapyl-Alkohol (S-Einheit).

Das Biopolymer Lignin ist ein nachwachsender Rohstoff, welcher ca. 30 % des organischen Kohlenstoffs weltweit ausmacht und einen hohen Anteil an Aromatizität besitzt (Upton und Kasko, 2016). Durch elektro- oder thermochemische, photokatalytische oder biologische Verfahren kann Lignin abgebaut und bereits in eine Vielzahl von Chemikalien und Polymeren bzw. Werkstoffen umgewandelt werden. Dennoch ist es nach wie vor das am wenigsten genutzte erneuerbare aromatische Polymer, sodass es von besonderem Interesse ist, neue Aufschluss- und Anwendungsmöglichkeiten zu erforschen (Rinaldi *et al.*, 2016; Gan *et al.*, 2022).

1.3 Industrielle Lignine und ihre Anwendung

Aufgrund der steigenden Bevölkerungszahl und der damit stetig zunehmenden Nachfrage nach Chemikalien, Kraftstoffen und anderen mehrwertigen Produkten ist es von Interesse für die Herstellung dieser, Lignin, welches eine nicht essbare, kohlenstoffneutrale, stetig nachwachsende Bioressource ist, anstelle von fossilen Rohstoffen zu verwenden (Rinaldi *et al.*, 2016). Lignin kann durch verschiedene, überwiegend chemische Delignifizierungsprozesse, wie z.B. das Sulfite- oder Sulfatverfahren, aus Holz-, Pflanzen- oder Agrarabfällen gewonnen werden und ist aufgrund seiner Vielfältigkeit in den letzten Jahren innerhalb der Industrie in den Fokus als erneuerbare aromatische Alternative zu fossilen Rohstoffen für die Synthese nachhaltiger Biomaterialien gerückt (Vásquez-Garay *et al.*, 2021; Gillet *et al.*, 2017; Lupoi *et al.*, 2015).

Vor allem die Papier- und Zellstoffindustrie, welche das Lignin von der Zellulose abtrennen, um diese weiter zu verwenden, produzieren jährlich weltweit ca. 100 Millionen Tonnen Ligninabfall, der derzeit überwiegend verbrannt wird. Lediglich etwa 2 % werden verwendet, um höherwertige Produkte zu produzieren (Tanase-Opedal *et al.*, 2019; Gosselink *et al.*, 2004).

Lignin ist biologisch abbaubar, thermisch stabil und vielfältig einsetzbar, wie z.B. in Epoxidharzen, Verbundwerkstoffen, Kohlenstofffasern oder aber auch als Elektrodenmaterial. Darüber hinaus ist es günstig in großen Mengen verfügbar, sodass seine Verwendung zukünftig nicht nur wirtschaftliche Vorteile bieten, sondern auch zur Reduktion klimarelevanter CO₂-Emissionen beitragen kann. Aufgrund seiner vielen verschiedenen aliphatischen und auch aromatischen Hydroxylgruppen eignet sich Lignin hervorragend für chemische Anwendungen wie z.B. bei Materialanwendungen (Upton und Kasko, 2016).

Jedoch ist die Ligninstruktur nicht immer gleich, was eine standardmäßige Anwendung erschwert. Abhängig vom Ursprung des Holzes sowie des Aufschlussverfahrens, verändert sich die Ligninstruktur, (Kun und Pukánszky, 2017; Mimini *et al.*, 2019; Li und Ragauskas, 2012; Vásquez-Garay *et al.*, 2021). Aktuell existieren vier industrielle Methoden zur Aufreinigung von Lignin, welche sich dahingehend differenzieren, ob das Endprodukt Schwefel enthält oder nicht.

Beim Sulfite-Verfahren, welches das älteste Verfahren ist, wird das Lignin durch die Sulfonat-Bildung gespalten und herausgelöst. Dies kann unter sauren (pH 1 – 2), neutralen (pH 5 – 7) oder alkalischen (pH 9 – 13,5) Bedingungen stattfinden, wobei abhängig vom pH-Wert unterschiedliche Kationen (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ oder NH⁴⁺) eingesetzt werden. Das Lignin wird zu einem wasserlöslichen Salz der Ligninsulfonsäure und die Hemizellulose wird entweder zu Zucker umgewandelt oder verbleibt zusammen mit der Zellulose als Faser zurück. Der so entstehende helle Zellstoff wird ausschließlich für die Herstellung von Papier oder Chemiezellulose verwendet (Chakar und Ragauskas, 2004).

Die entstehenden Lignosulfonate enthalten 3,5 – 8 Gew.-% Sulfat, haben ein Molekulargewicht von weniger als 15.000 g/mol, sind wasserlöslich und werden z.B. zur Herstellung von Tensiden, Adsorbentien und Pestiziden verwendet (Rico-García *et al.*, 2020; Aro und Fatehi, 2017; Upton und Kasko, 2016; Eraghi Kazzaz und Fatehi, 2020).

Das Sulfat-Verfahren, auch Kraft-Prozess genannt, ist das weltweit dominierende Verfahren, wobei jährlich ca. 150 Millionen Tonnen Kraftzellstoff entstehen. Der Aufschluss des Lignins aus dem Kraftzellstoff erfolgt mittels Natriumsulfit (Na_2S) und Natronlauge (NaOH) (pH-Wert > 10) bei 165 – 175 °C in einem Kessel mit Hochdruckdampf über mehrere Stunden. Die daraus resultierende Schwarzlauge enthält Hemizellulose und Lignin, wobei letzteres durch eine anschließende Säurefällung oder Ultrafiltration abgetrennt werden kann (Li und Takkellapati, 2018; Rinaldi *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020). Das daraus resultierende Kraftlignin ist derzeit die größte Quelle nachwachsender Biotreibstoffe in Finnland und Schweden, da die Chemikalien (Na_2S & NaOH) zurückgewonnen und dabei Strom erzeugt wird. Daher ist Kraftlignin kommerziell nur wenig verfügbar. Die Anwendung bei der Herstellung von höherwertigen Chemikalien ist durch die komplexen Eigenschaften, vermehrte Anzahl an konjugierten C-C-Bindungen sowie die stabile Verknüpfung, ebenfalls erschwert (Evstigneyev und Shevchenko, 2020; Rinaldi *et al.*, 2016). Kraftlignin hat ein Molekulargewicht von maximal 25.000 g/mol und einen Schwefelanteil von 1 – 3 Gew.-% und ist zudem hydrophob (Eraghi Kazzaz und Fatehi, 2020). Kraftlignin wird z.B. in Düngemitteln, Harzen, Kohlenstofffasern und Bindemittel verwendet. Aber auch hochwertige Chemikalien, wie z.B. Vanillin, Chinin, Aldehyde oder Fettsäuren können daraus hergestellt werden (Bajwa *et al.*, 2019).

Des Weiteren gibt es noch den Soda- und Organosolv-Prozess. Beim Soda-Prozess werden überwiegend Ausgangsmaterialien verwendet, die keinen Holzbestandteil haben. Die Biomasse wird dabei mit NaOH und Anthrachinon behandelt, welches die Delignifizierung begünstigt. Somit ist Soda-Lignin insgesamt reiner und hat keine Schwefelanteile im Vergleich zum Kraftlignin oder Lignosulfonat (Doherty *et al.*, 2011; Vishtal und Kraslawski, 2011). Durch die hydrolytische Spaltung verfällt das Lignin außerdem in kleinere Fragmente, welche chemisch nahezu unverändert sind (Windeisen und Wegener, 2012).

Beim Organosolv-Prozess wird das Lignin mit einem organischen Lösungsmittel wie z.B. Ethanol, Methanol oder Aceton und einem Säure-Katalysator (z.B. Salzsäure) oder organischen Säuren (z.B. Ameisensäure) behandelt, wodurch die Struktur des aufgeschlossenen Lignins dem des nativen stark ähnelt. Organosolv-Lignin hat ebenfalls keine Schwefelanteile und ist reiner als Kraftlignin oder Lignosulfonat. Mit einem Molekulargewicht von weniger als 5000 g/mol ist es das kleinste aller in der Industrie aufgeschlossenen Lignin-Arten (Eraghi Kazzaz und Fatehi, 2020; Vishtal und Kraslawski, 2011). Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode besteht darin, dass alle drei Komponenten der Lignozellulose, Zellulose, Hemizellulose und Lignin, isoliert werden können (Kumar *et al.*, 2009).

Des Weiteren existieren noch mechanische- (z.B. Mahlen) und andere industrielle Prozesse, wie z.B. Pyrolyse oder Dampfexplosion, welche derzeit jedoch noch nicht in großem Maßstab in der Industrie zum Einsatz kommen (Upton und Kasko, 2016). Da bei allen klassischen Verfahren viele nicht verwertbare Nebenprodukte, verunreinigtes Abwasser sowie nur eine geringe Menge an verwertbarem, nicht vollständig reinem Lignin entstehen, steht die Suche nach Alternativen im Fokus der Wissenschaft. Enzymatische Verfahren sind dabei von besonderem Interesse, da sie unter milden Reaktionsbedingungen ablaufen, als umweltfreundlich gelten und potenziell kosteneffizient eingesetzt werden können (Brebü und Vasile, 2010; Bugg *et al.*, 2011; Bajwa *et al.*, 2019).

1.4 Lignin-degradierende Mikroorganismen im Überblick

Das aromatische Biopolymer Lignin ist ein wesentlicher Bestandteil der Lignozellulose in pflanzlichen Zellwänden. Dort trägt es zur Standfestigkeit bei, schützt die Pflanze vor mikrobiellen Attacken und ermöglicht durch seine hydrophoben Eigenschaften den Wassertransport (Hammel, 1997; van Maris *et al.*, 2006). Der Lignin-Anteil variiert je nach Pflanzenart und besteht aus verschiedenen Verknüpfungen der Phenylpropanoid-Monomere. Aufgrund der dadurch bedingten Komplexität ist Lignin nur schwer abbaubar (Boudet *et al.*, 1995; Whetten und Sederoff, 1995). Einige aerobe Mikroorganismen, wie z.B. filamentöse Pilze, darunter in erster Linie die Basidiomyceten, aber auch Bakterien können das Ligningerüst angreifen und degradieren (Kirk und Farrell, 1987). Der mikrobielle Abbau des Lignins ist in der Natur von entscheidender Bedeutung, denn ohne ihn würde der Boden durch die abgestorbenen Pflanzen dauerhaft verholzen, was einen negativen Effekt auf die Fruchtbarkeit des Bodens und somit auch auf die Bewirtschaftung hätte (Hammel, 1997).

Vor allem Weißfäulepilze, wie z.B. *Phanerochaete chrysosporium*, zugehörig zu den Basidiomyceten, sind dafür bekannt Lignin abzubauen. Sie können das Lignin sowohl selektiv als auch parallel zu den anderen Zellwandbestandteilen, Zellulose und Hemizellulose, abbauen (Martinez *et al.*, 2005). Sie greifen dabei enzymatisch überwiegend die nicht kondensierten aromatischen Einheiten des Ligninpolymers an. Ligninperoxidasen, Laccasen, Manganabhängige Peroxidasen und versatile Peroxidasen sind die am häufigsten nachgewiesenen extrazellulären Enzyme der Basidiomyceten, insbesondere der Weißfäulepilze (Kirk *et al.*, 2018; Bugg *et al.*, 2011). Eine etwas andere Abbaumechanismus findet durch die Braunfäulepilze, wie z.B. *Gloeophyllum trabeum* statt, welche nur etwa 7 % der holzersetzenen Basidiomyceten ausmachen. Sie greifen überwiegend die Zellulose- und Hemizellulose-Anteile der Pflanze über Hydrolyse an, können aber auch teilweise das Lignin direkt oxidieren und somit modifizieren. Sie sind dafür bekannt, Lignin mit Hydroxy-Radikalen anzugreifen, welche durch die Fenton-Reaktion entstanden sind (Jensen *et al.*, 2001; Hammel *et al.*, 2002; Arantes *et al.*, 2011; Bugg *et al.*, 2011).

Manche Bakterien können ebenfalls Lignin abbauen, die bekanntesten sind die Aktinomyceten, α -Proteobakterien und γ -Proteobakterien. Der Ligninabbau durch Bakterien ist weniger erforscht als der pilzliche Abbau, dennoch ist bekannt, dass die Bakterien ähnliche extrazelluläre Enzyme verwenden wie die filamentösen Pilze und dabei vor allem Laccasen zum Einsatz kommen (Bugg *et al.*, 2011; Mathews *et al.*, 2015).

Innerhalb der γ -Proteobakterien gibt es einige Lignin-abbauende Bakterien, wie z.B. *Pseudomonas fluorescens*, welches eine Ligninperoxidase produziert oder *Escherichia coli*, welches Laccasen produziert. Innerhalb der Aktinomyceten, die Lignin verändern können, aber nicht gänzlich degradieren (Kirk und Farrell, 1987; Whetten und Sederoff, 1995), gibt es mehrere Arten, die Laccasen, Lignin- und Manganabhängige Peroxidasen produzieren. Dabei hervorzuheben ist vor allem die Gattung *Streptomyces* mit z.B. *S. viridosporus* und *S. griseus* (Janusz *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2014).

1.4.1 Charakterisierung des Basidiomyceten *Agrocybe pediades*

Der Saprobiont *Agrocybe pediades*, auch als raustieliger Ackerling bekannt, erstmals beschrieben 1889 von Fayod, wurde im Rahmen dieser Arbeit eigenständig isoliert und molekularbiologisch identifiziert (6.1). *A. pediades* gehört zur Klasse der *Agaricomycetes*, innerhalb dieser zur Ordnung der *Agaricales* und zur Familie der *Strophariaceae*. Er ist hauptsächlich in Wäldern und auf Weiden zu finden, kann aber auch in anthropogenen Gebieten, wie z.B. begrünten Straßenrändern gefunden werden. Er tritt allein auf oder zu mehreren und ist überwiegend im Sommer zu finden, kann aber in warmen Klimazonen auch ganzjährig gefunden werden. Ursprünglich entdeckt wurde er in Europa, ist aber auch in Nordamerika sowie in Asien, der Karibik und Südamerika auffindbar. *A. pediades* verfügt über ein 10 – 20 mm breiten, halbkugelförmigen, glatten bis leicht runzeligen Hut, welcher in nassem Zustand eine gelbliche Färbung aufweist. Die Lamellen sind ebenfalls gelblich und ganzrandig. Auch der zylindrische Stiel weist eine gelbliche Färbung auf. Das monomitische Hyphensystem enthält 2 – 3 μm breite, septierte, miteinander verzweigte generative Hyphen. Die Basidien sind etwa 21 – 32 μm x 7 – 10 μm groß, clavat, tetra-sterigmatisch und sind zwei- oder viersporig. Die darin enthaltenen Basidiosporen sind ellipsoid, enthalten eine Keimpore und haben eine rostbraune Färbung (Acharya *et al.*, 2017; Calaça *et al.*, 2020).

Agaricales Arten sind vor allem bekannt dafür, dass sie lignozellulosehaltige Bestandteile besiedeln und eine Vielzahl an lignolytischen Enzymen, wie z.B. Laccasen, besitzen und somit eine entscheidende Rolle im biologischen Ligninabbau spielen (Aza *et al.*, 2021; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2021).

1.4.2 Charakterisierung des Ascomyceten *Alternaria alstroemeriae*

Die Gattung *Alternaria* umfasst pathogene, endophytische und saprophytische Pilzarten, die eine Vielzahl an verschiedenen Substraten, wie z.B. Pflanzen, Tiere oder verschiedene Böden besiedeln können. Verschiedene *Alternaria* Arten treten vor allem als Pflanzenpathogene auf und verursachen Ernteaufälle von erheblichem Ausmaß. Des Weiteren können sie auch schädlich für den Menschen sein und verschiedene negative Gesundheitszustände auslösen (Woudenberg *et al.*, 2013).

Alternaria alstroemeriae wurde erstmals 2008 von Simmons & Hill in Japan entdeckt und aus einer infizierten Pflanze isoliert (Simmons, 2007). *A. alstroemeriae* verursacht die Schwarzflecken-Krankheit bei *Alstroemeria* (Inkalilie), welche ursprünglich aus Südamerika kommt, jedoch mittlerweile in Japan kultiviert wird (Yamagishi *et al.*, 2009). *Alternaria* gehören zur Klasse der *Dothideomycetes*, innerhalb dieser zur Unterklasse der *Pleosporomycetidae* und zur Ordnung der *Pleosporales*. Die Konidien von *A. alstroemeriae* sind etwa $7 - 62,5 \mu\text{M} \times 5 - 18 \mu\text{M}$ groß, eiförmig bis subzylindrisch und haben eine braune bis dunkelbraune Färbung. Sie werden an einfachen Konidiophoren, welche eine Größe von ca. $3 - 32 \mu\text{M} \times 3 - 5 \mu\text{M}$ haben in Ketten von 2 – 5 Konidien produziert. Die sekundären Konidiophoren sind oftmals kurz und haben nur 1 – 2 Zellen. Diese Eigenschaften sowie die Fähigkeit der Sporulation unter Wasser in Agarsubstraten unterscheidet diese von allen anderen der Gattung *Alternaria* (Simmons, 2007; Yamagishi *et al.*, 2009).

1.4.3 Charakterisierung des Ascomyceten *Coniolarrella hispanica*

Coniolarrella hispanica wurde ursprünglich im Jahr 2003 als Endophyt aus den Blättern des Feld-Mannstreu (*Eryngium campestre*) in Spanien von Checa und Blanco isoliert (Checa *et al.*, 2008). Er gehört zur Klasse der *Sodariomycetes* und innerhalb dieser zur Ordnung der *Xylariales* der Familie der *Xylariomycetidae*. *C. hispanica* ist cleistokarp, was bedeutet, dass die dunklen Ascosporen passiv freigesetzt werden, wenn die sie einschließende Stromata-Wand zerfällt. Die Asci sind kurzstielig und enthalten 8 Ascosporen, die zweireihig angeordnet sind. Die Ascosporen sind ca. $16 - 17,5 \mu\text{M} \times 9 - 9,5 \mu\text{M}$ groß, glatt und ellipsoid bis ungleichseitig, sie enthalten außerdem einen Keimschlitz. Der Anamorph ist im jungen Entwicklungsstadium des Stromata beobachtbar und die Konidien sind meist $5,5 - 12 \mu\text{M} \times 3 - 4 \mu\text{M}$ groß, hyalin und variabel in Größe und Form (Checa *et al.*, 2008; Zare *et al.*, 2010). *Xylariales* sind dafür bekannt, dass sie Holz und andere pflanzliche Komponenten abbauen können und dabei vor allem Weißfäule bedingen (Nilsson und Daniel, 1989).

1.4.4 Charakterisierung des Ascomyceten *Chaetomium leptoderma*

Zur Klasse der *Sodariomycetes* und innerhalb dieser zur Ordnung *Sodariales* und zur Familie *Chaetomiaceae* gehört die Art *Chaetomium*, wozu auch die Spezies *Chaetomium leptoderma* zählt. Sie haben Kleistothecien mit ellipsoiden bis zitronen-förmigen, einzelligen Ascosporen, welche wiederum über eine einzelne Keimspore verfügen. Die Asci entwickeln sich nicht synchron und lösen sich zur Freisetzung der Sporen auf. Charakteristisch für alle *Chaetomiaceae* sind die Peridialhaare, welche auch *C. leptoderma* besitzt, der erstmals von Greif und Currah 2007 beschrieben wurde (Greif *et al.*, 2009).

1.4.5 Charakterisierung der Basidiomyceten *Pleurotus pulmonarius* und *Pleurotus ostreatus*

Die Basidiomyceten *Pleurotus pulmonarius* und *Pleurotus ostreatus* gehören, ebenso wie *A. pediades* zur Klasse der *Agaricomycetes* und der Ordnung *Agaricales*. Innerhalb dieser zählen die zwei erstgenannten Pilze zur Familie der *Pleurotaceae*. Sie gehören außerdem zu den essbaren lignolytischen Pilzen, welche auch von biotechnologischer und ökologischer Bedeutung sind. *Pleurotus* Arten sind dafür bekannt, dass mit Hilfe ihrer lignolytischen Enzyme Agrarabfälle in nutzbares Tierfutter umgewandelt und industrielle Abfälle biologisch abgebaut werden können. Die saprophytischen Pilze bewachsen außerdem lignozellulosehaltige Substrate und können aufgrund ihrer vielen verschiedenen Enzyme, wie z.B. Laccasen, Peroxidasen, Zellulasen usw. ebenfalls Lignin abbauen. *P. ostreatus* ist einer der am häufigsten kultivierten essbaren Speisepilze und kommt in der Natur überwiegend in den gemäßigten Zonen vor (Cohen *et al.*, 2002a; Venturella *et al.*, 2015).

P. pulmonarius, auch als grauer Austernpilz bekannt, findet man überwiegend zu mehreren auf Stämmen von Laubbäumen. Der Hut ist etwa 3 – 11 cm großen, konvex kugelig bis nierenförmig und hat eine braune Färbung. Der Stiel fehlt oftmals oder ist sehr kurz. Das Hymenophoraltrama ist unregelmäßig und besitzt sklerifizierte Hyphen mit einem Durchmesser von ca. 5,2 – 7,8 μM . Die Basidiosporen sind subzylindrisch bis zylindrisch, dünnwandig und haben eine Größe von 7,5 – 14,5 x 2,5 – 5,0 μm (Venturella *et al.*, 2015).

Pleurotus ostreatus, auch Austernseitling genannt, hat einen 4 – 20 cm großen, zungen- bis spatelförmigen, konvex konisch bis halbkreisförmigen Hut mit einer beige bis lila-schwärzlichen Färbung. Das Hymenophoraltrama ist nicht gänzlich unregelmäßig und besitzt herablaufende Lamellen. Der Stiel ist nicht gänzlich ausgebildet und seitlich angewachsen. Die Basidiosporen sind elliptisch, hyalin und etwa 6,2 – 8 x 4 – 6,5 μM groß. *P. ostreatus* ist ebenfalls überwiegend in Wäldern auf Stämmen und Stümpfen von Laubbäumen zu finden. Kann aber auch in Parks gefunden werden (Venturella *et al.*, 2015).

1.5 Biologischer Abbau von Lignin durch enzymatische Reaktionen

Aufgrund der Komplexität und der Vielzahl an unterschiedlichen Verknüpfungen ist Lignin nur schwer abbaubar. Die Fähigkeit Lignin effektiv abzubauen und zu zersetzen hat sich innerhalb der holzersetzenden Basidiomyceten etabliert. Man unterscheidet hierbei zwischen Weiß-, Braun- und Weichfäule Pilzen. Weißfäule Pilze sind die häufigsten holzersetzenden Pilze, da sie alle drei Bestandteile der pflanzlichen Zellwand (Zellulose, Hemizellulose und Lignin) degradieren können. Überwiegend zersetzen sie jedoch das Lignin, sodass eine weisse zellulosehaltige Faser zurückbleibt, welche zur Namensgebung diente. Braunfäule Pilze, welche nur 7 % der holzersetzenden Basidiomyceten ausmachen, bauen die Zellulose und Hemizellulose ab, sodass das oxidierte Lignin als braune Struktur zurückbleibt. Auch Ascomyceten können Holz besiedeln, dabei kommt es zu einer Veränderung der mechanischen Eigenschaften des Holzes, welche man auch als Weichfäule bezeichnet (Martinez *et al.*, 2005; Leonowicz *et al.*, 1999; Kirk und Farrell, 1987).

Pilze verfügen über einen Enzym-Pool, der es ihnen ermöglicht Lignin bzw. andere Holzbestandteile zersetzen zu können. Die am Ligninabbau beteiligten Enzyme der Basidiomyceten können in drei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen Enzyme, wie z.B. die Laccasen und Peroxidasen, welche die Holzbestandteile Zellulose, Hemizellulose und Lignin direkt angreifen. Die zweite Gruppe umfasst die Enzyme, welche mit der ersten Gruppe zusammen agieren, aber niemals eigenständig Holz zersetzen, wie z.B. die Superoxiddismutase und Glyoxaloxidase. Die letzte Gruppe umfasst Rückkopplungsenzyme, wie z.B. die Arylalkohol-Oxidase oder Veratrylalkohol-Oxidase, welche für die Verbindung von Stoffwechselketten zuständig sind. Alle drei Enzymgruppen können separat oder miteinander fungieren (Staszczak *et al.*, 1996).

Weißfäule Pilze produzieren verschiedene extrazelluläre Oxidoreduktasen, wie z.B. Laccasen (Lcc) und lignolytische Peroxidasen, welche am Ligninabbau beteiligt sind. Laccasen (EC 1.10.3.2) sind Polyphenoloxidasen, welche phenolische Substanzen aufgrund ihres niedrigen Redoxpotentials direkt mithilfe von Sauerstoff (O_2) oxidieren können, wobei O_2 zu Wasser (H_2O) reduziert wird (Abb. 4) (Xu, 1996). Sie gehören zu den Multikupferoxidasen, da in ihrem aktiven Zentrum vier Kupferatome (Cu^{2+}) sind. Mithilfe von chemischen Mediatoren wie z.B. 1-Hydroxy-Benzotriazol (HBT) oder 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) können Laccasen auch nicht-phenolische Komponenten oxidieren (Abb. 4). Laccasen sind substratunspezifisch, wodurch sie eine Vielzahl an verschiedenen Substanzen oxidieren können, so auch ca. 80 – 90 % der Ligninstruktur (Camarero *et al.*, 2004; Leonowicz *et al.*, 1999; Bugg *et al.*, 2011).

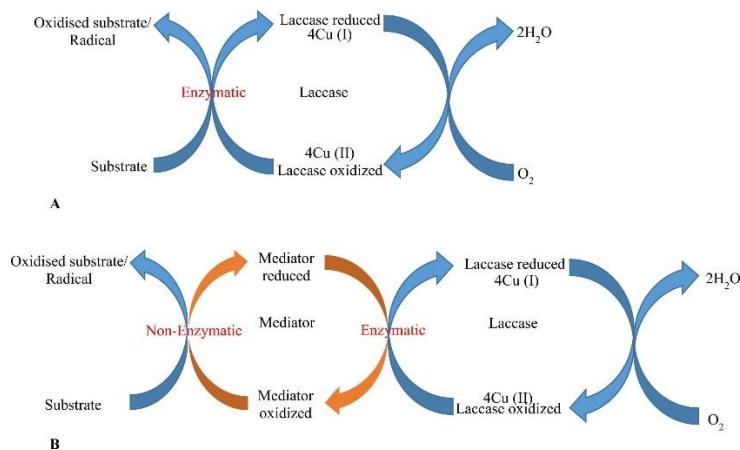


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Laccase- (A) und Laccase-Mediator (B) katalysierten Oxidation von Substraten (Kaur *et al.*, 2022).

Laccasen können sowohl native als auch synthetische Ligninpolymere abbauen. Dabei werden durch die Oxidation aromatische und aliphatische C–C-Bindungen aufgebrochen, wodurch das Lignin depolymerisiert wird (Eggert *et al.*, 1995). Laccasen sind technisch vielfältig einsetzbar, so werden sie schon in der Medizin, Agrarwirtschaft, Weinherstellung oder in der Papierindustrie erfolgreich verwendet (Singh Arora und Kumar Sharma, 2010). In Form von *Biopulping* tragen Laccasen von Weißfäulepilzen dazu bei, dass die Ligninstruktur der Holzspäne vor dem eigentlichen Aufschluss bereits teilweise abgebaut wird (Widsten und Kandelbauer, 2008). Beim *Biobleaching* wird das restliche Lignin im Zellstoff durch Laccasen abgebaut und entfärbt (Call, 1994).

Peroxidasen sind Häm-enthaltende Enzyme, die sowohl phenolische als auch nicht-phenolische Bestandteile des Lignins abbauen können, wobei Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Veratrylalkohol als Elektronendonoren fungieren. Man unterscheidet dabei die Lignin- und Manganabhängige Peroxidase (LiP & MnP) voneinander.

Bei Ligninperoxidasen (EC 1.11.14), auch Ligninasen genannt, wird Fe(III) durch H₂O₂ zu Fe(IV) oxidiert, wobei das Zwischenprodukt I (Fe(IV)=O) entsteht, welches als Radikal fungiert und das Substrat, z.B. Lignin, angreifen kann. In der nachfolgenden Reduktion durch ein Elektron aus dem Substrat wird das Zwischenprodukt I zu einem nichtradikalischen Kation umgewandelt (Zwischenprodukt II). Durch einen weiteren Elektronentransfer entsteht das Ausgangsprodukt Fe(III) (Abb. 5). Im Gegensatz zu den klassischen Peroxidasen können Ligninperoxidasen aromatische Ringe oxidieren (Hammel und Cullen, 2008; Schick Zapanta und Tien, 1997).

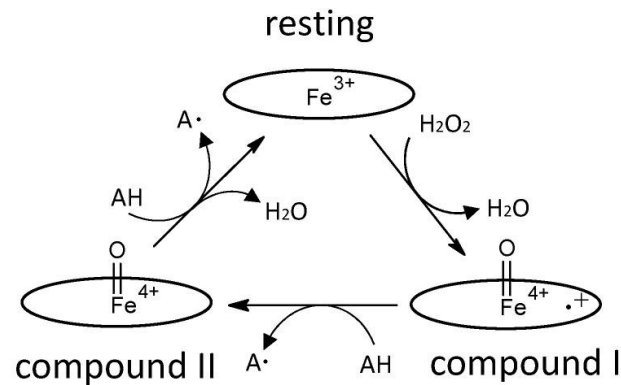


Abbildung 5: Darstellung eines katalytischen Zyklus einer Häm-Peroxidase (Sugano und Yoshida, 2021). AH ist das Substrat z.B. Lignin, A• ist das oxidierte Substrat und oval eingekreist sind die Häm-Zentren des Enzyms.

Innerhalb der Peroxidasen der Weißfäulepilze sind die Manganperoxidasen (EC 1.11.1.13) die am häufigsten Lignin modifizierenden Peroxidasen. Bei Manganperoxidasen wird zunächst, wie bei der LiP das Eisen im Zentrum des Enzyms durch H_2O_2 zu Fe(IV)=O oxidiert (Zwischenprodukt I), wobei das Wasserstoffperoxid zu H_2O reduziert wird (Abb. 6). Das Zwischenprodukt I fungiert als Radikal und es kommt zur Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{3+} . Das dabei entstehende Zwischenprodukt II hat keine radikalische Funktion mehr. Das chelatisierte Mn^{3+} fungiert als Redox-Mediator und kann die phenolischen Verbindungen innerhalb des Lignins angreifen. In einem letzten Schritt wird Mn^{2+} erneut zu Mn^{3+} oxidiert und das Ausgangsprodukt Fe(III) dadurch regeneriert (Hofrichter, 2002; Wariishi *et al.*, 1988).

Die Versatile Peroxidase (VP) (EC 1.11.1.16) hingegen besitzt beide katalytische Eigenschaften, die der Lignin- und der Manganabhängigen Peroxidase, man spricht daher auch von einem Hybridenzym (Camarero *et al.*, 1999).

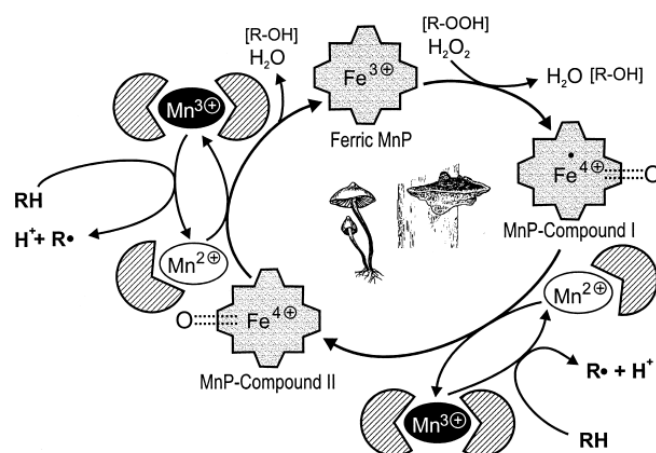


Abbildung 6: Darstellung eines katalytischen Zyklus einer Manganabhängigen Peroxidase (Hofrichter, 2002).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Derzeit wird der Großteil der Industrieabfälle weitestgehend zur Energiegewinnung genutzt und daher hauptsächlich verbrannt oder vergast, wodurch eine große Menge an CO₂ freigesetzt wird. Dies steht im Widerspruch zur klimaneutralen Umgestaltung industrieller Prozesse sowie der Ressourcenschonung, die Stahel und Reday-Mulvey bereits in den 1970er Jahren mit ihrem Modell *Circular Economy* vorgeschlagen haben. Daher ist es von besonderem Interesse, für die zahlreichen anfallenden Industrieabfälle alternative Verwertungs- bzw. Anwendungsmöglichkeiten zu finden, um eine nachhaltigere und ressourcenschonende Zukunft gestalten zu können (Haile *et al.*, 2021; Vigh, 2023; Stahel, 2016).

Im Fokus dieser Arbeit stand dabei die Nutzung industrieller Ligninabfälle, welche insbesondere in der Papier- und Zellstoffindustrie in großem Maße anfallen. Die derzeit häufigste Verwendung des anfallenden lignolytischen Abfalls ist die Verbrennung zur energetischen Nutzung (Rinaldi *et al.*, 2016). Aufgrund des strukturellen Aufbaus von Lignin und seine Eigenschaften als erneuerbares Biopolymer bietet es jedoch großes Potenzial für die Anwendung in der Kreislaufwirtschaft. Die biotechnologische Verwertung der industriellen Ligninabfälle, könnte langfristig nicht nur zur Gewinnung höherwertiger Produkte genutzt werden, sondern auch dazu beitragen fossile Rohstoffe, im Sinne einer nachhaltigen Zukunft, zu ersetzen (Vasile und Baican, 2023; Schutyser *et al.*, 2018).

Ziel dieser Arbeit war es daher, verschiedene filamentöse Pilze dahingehend zu analysieren, ob sie lignolytische Industrieabfälle degradieren und zugleich dabei verwertbare bzw. weiter anwendbare Metabolite produzieren können. Der Fokus lag dabei auf den Basidiomyceten, da diese bekannt dafür sind, viele am Ligninabbau beteiligte Enzyme, wie z.B. Laccasen und Peroxidasen, zu produzieren. Ergänzend wurden auch andere Pilzgruppen wie Ascomyceten und Endophyten berücksichtigt, um die Auswahl an möglichen Lignin-abbauenden Organismen zu erhöhen, wodurch sich möglicherweise auch die Anzahl an zukünftig potenziell industriell anwendbaren Metaboliten erhöht.

Ein weiteres Ziel war es, die bei der Kultivierung neu entstandenen Metabolite zu isolieren und aufzureinigen. Im Anschluss wurden diese chemisch analysiert sowie biologisch näher charakterisiert, um ihr mögliches Anwendungspotenzial prüfen zu können. Neben der Analyse der sekretierten Metabolite stand auch die Untersuchung der bei der Degradation des industriellen Ligninabfalls beteiligten Enzyme im Fokus. Hierzu wurden verschiedene Enzym-Assays mit den jeweiligen Kulturfiltraten durchgeführt, um die Aktivität der lignolytischen Enzyme der verschiedenen Pilze näher bestimmen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Medienbestandteile wurden von folgenden Herstellern bezogen: Carl Roth GmbH & Co. KG, Chemikalienlager Universität Mainz, Diagonal GmbH & Co. KG, Machery-Nagel, Merck KGaA, New England Biolabs, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Thermo Fisher Scientific und VWR International GmbH.

2.1.1 Wasser

Zur Medienherstellung sowie für Lösungen wurde, soweit nicht anders vermerkt, vollentionisiertes Wasser (H_2O_{VE}) von der Wasseraufbereitungsanlage Seradest SD 2000 (SERAL-Reinstwasser Systeme GmbH) des Biozentrums II verwendet. Für Antibiotika-Stammlösungen wurde ultrafiltriertes Wasser (H_2O_{UF}) aus der Milli-Q® IQ 7000 Anlage (Merck) und für molekularbiologische Arbeiten wurde Nuklease-freies Wasser (H_2O_{PCR}) verwendet.

2.1.2 Antibiotika

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden in H_2O_{UF} gelöst, sterilfiltriert und anschließend bei $-20^{\circ}C$ gelagert.

Tabelle 1: Zur Selektion neu isolierter Pilzstämmen und zur Durchführung biologischer Aktivitätstest verwendete Antibiotika-Stammlösungen.

Antibiotika	Lösungsmittel	Konzentration
Hygromycin (Hyg)	H_2O_{UF}	100 mg/mL
Penicillin (Pen)	H_2O_{UF}	100 mg/mL
Streptomycinsulfat (Strep)	H_2O_{UF}	100 mg/mL

2.1.3 Lösungsmittel

Acetonitril (AcN) *HPLC/MS grade* | Cyclohexan (CH) *pro analysis (p.a.)* | Dimethylsulfoxid (DMSO) *p.a.* | Ethanol (EtOH) *p.a.* | Ethylacetat (EA) *p.a.* | Isopropanol *p.a.* | Methanol (MeOH) *p.a.* | Toluol *p.a.*

2.1.4 Säuren und Laugen

Ameisensäure (FA) *p.a.* | Essigsäure (CH_3COOH) *p.a.* | Kaliumchlorid (KCl) *p.a.* | Kaliumhydroxid (KOH) *p.a.* | Natronlauge (NaOH) *p.a.* | Phosphorsäure (H_3PO_4) 85 % *p.a.* | Salzsäure (HCl) *p.a.* | Trifluoressigsäure (TFA) *HPLC/MS grade*

2.1.5 Industrielle Ligninabfälle

Zur Verfügung gestellt wurden die Lignine von der AG Waldvogel, Fachbereich Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Kraftlignin (KL): Nadelholz-Kraftlignin Indulin AT, MeadWestvaco, Lot-Nr.: KH22M

Magnesium-Lignosulfonat (LigS): Magnesium-Lignosulfonat, Borregaard, Lot-Nr.: DP- 28238

2.1.6 Lösungen, Puffer und weitere Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die Mengen auf einen Liter Endvolumen. Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH bzw. KOH eingestellt.

2.1.6.1 Lösungen zur Medienherstellung

Tabelle 2: Für die Herstellung von Medien zur Submerskultivierung sowie zum Nachweis von Enzymaktivitäten verwendete Lösungen.

Lösungen	Bestandteile
Biotinlösung	100 mg Biotin
Eisenchlorid-Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lösung	10 g FeCl ₃ 10 g K ₃ [Fe(CN) ₆]
Natriumhypochlorit-Lösung (5 %)	416,66 mL 12 % Natriumhypochlorit-Lösung
Nitratsalzlösung (20x)	120 g NaNO ₃ 10,4 g KCl 10,4 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 30,4 g KH ₂ PO ₄
Kraftlignin-Lösung (pH 12,0)	100 g Kraftlignin
Spurenelementlösung I (X-Trace) (pH 6,5)	1,7 g CoCl ₂ x 6 H ₂ O 1,6 g CuSO ₄ x 5 H ₂ O 5 g FeSO ₄ x 7 H ₂ O 11 g H ₃ BO ₃ 5 g MnCl ₂ x 4 H ₂ O 50 g Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 1,5 g Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O 22 g ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
Thiamindichloridlösung	10 g Thiamindichlorid

2.1.6.2 Puffer für molekularbiologische Arbeiten und Enzym-Assays

Tabelle 3: Für die Herstellung von genomischen DNA-Extraktionen, anschließender Auftrennung mittels Gelelektrophorese sowie für Enzym-Assays verwendete Puffer.

Puffer	Bestandteile
Extraktionspuffer (pH 8,0)	7,45 g KCl 0,29 g Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 1,21 g Tris
100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0)	4,52 g KH ₂ PO ₄ 11,6 g K ₂ HPO ₄
TAE-Puffer (50 x) (pH 8,0) pH-Wert wird mit CH ₃ COOH <i>p.a.</i> eingestellt	110 mM Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 2 M Tris
TE-Puffer (1x) (pH 8,0)	10 mM Tris 1mM Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O
TE-RNase-Puffer	40 µL RNase (20 mg/mL) ad 20 mL TE-Puffer

2.1.6.3 Weitere Chemikalien

Alle gelisteten Chemikalien wurden nach Herstellerangaben oder Bedarf in einem gut löslichen Lösungsmittel gelöst und je nach Anwendung sterilfiltriert oder direkt verwendet.

Tabelle 4: Für die Herstellung von Medien zur Submerskultivierung sowie zum Nachweis von Enzymaktivitäten verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Lösungsmittel
2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS))	H ₂ O _{VE}
5-nitro-1,3-benzodioxol (NBD)	Acetonitril <i>p.a.</i>
Abietinsäure	DMSO
Azur B	H ₂ O _{VE}
Dehydroabietinsäure	DMSO
Katalase	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0)
Poly R	H ₂ O _{VE}
Wasserstoffperoxid (30 %)	Gebrauchsfertig

2.1.7 Kulturmedien

Zur Sterilisierung wurden die angefertigten Medien, wobei die jeweiligen pH-Werte mit Natronlauge (NaOH) oder Salzsäure (HCl) zuvor eingestellt wurden, bei 121 °C und 2,1 bar für mindestens 20 Minuten (min) autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde vor der Sterilisation 2 % (w/v) Agar hinzugefügt. Thermoinstabile Zusätze, wie z.B. Antibiotika, wurden im Anschluss nach Abkühlung des Mediums auf ca. 55 °C steril hinzugefügt. Die jeweiligen Mengenangaben beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf einen Liter Endvolumen.

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)

Gebrauchsfertig (Gibco™ Thermo Fisher Scientific)

Hefeextrakt-Malzextrakt-Glukose-Medium (HMG) (pH 5,5)

4 g Hefeextrakt | 10 g Glukose | 10 g Malzextrakt

Kartoffelextrakt-Glukose-Medium (PDA) (pH 6,5)

26,5 g Kartoffel-Glukose-Bouillon

PDA+Pen+Strep

100 mg/L Penicillin | | 200 mg/L Streptomycinsulfat | ad 1 L PDA

Komplett-Medium (CM) (pH 6,5)

1 g *Casamino Acids* | 2 g Pepton | 1 g Hefeextrakt | 10 g Glukose | 50 mL Nitratsalzlösung (20 x) | 1 mL Spurenelementlösung I (X-Trace)

Luria-Bertani-Medium (LB) (pH 7,0)

10 g Pepton aus Casein | 5 g NaCl | 5 g Hefeextrakt

Lignin modifying enzyme basal medium (LBM) (nach Pointing, 1999)

Die Glukose wird separat angesetzt und sterilfiltriert. Die restlichen Komponenten werden autoklaviert und im Anschluss wird die Glukose steril hinzugefügt. Für Festmedien wurde 1,6 % (w/v) Agar hinzugefügt.

1 g KH_2PO_4 | 0,5 g $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ | 0,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ | 10 mg $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ | 1 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ | 1 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 1 mg $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ | 10 mg Hefeextrakt | 2 g Glukose

LBM + ABTS

1 g 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure (ABTS) | ad 1 L LBM

LBM + Azure B

100 mg Azure B | ad 1 L LBM

LBM + Kraftlignin-Lösung (KL)

25 mL KL-Lösung | ad 1 L LBM

LBM + Magnesium-Lignosulfonat (LigS)

2,5 g LigS | ad 1 L LBM

LBM + Poly-R

200 mg Poly-R | ad 1 L LBM

Minimal-Medium (MM) (pH 6,5)

10 g Glukose | 250 µL Biotinlösung (0,01 %) | 50 mL Nitratsalzlösung | 1 mL Spurenelementlösung I (X-Trace) | 1 mL Thiamindichloridlösung (1 %)

MM + Magnesium-Lignosulfonat (pH 6,5)

10 g Magnesium-Lignosulfonat | ad 1 L MM

MM + Kraftlignin-Lösung (pH 6,5)

100 mL Kraftlignin-Lösung wird separat autoklaviert | ad 1 L MM

Nutrient-Broth medium (NB) (pH 6,8)

3 g Fleischextrakt | 5 g Pepton

Soja-Medium (pH 6,6)

30 g Bio-Sojamehl (Borchers) | 15 g Maltose | 5 g Pepton

Tryptone-Soy-Broth medium (TSB) (pH 7,3)

17 g Trypton | 5 g NaCl | 3 g Sojapepton | 3 g Fleischextrakt | 2,5 g Glukose | 2,5 g K₂HPO₄

2.1.8 Programme und Software

Die Programme und Software, die während dieser Arbeit verwendet worden sind, sind nachfolgend tabellarisch gelistet.

Tabelle 5: Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Programme und Software.

Programme / Software	Anwendung
<i>Ape V</i> (©2003 – 2020 M. Wayne Davis)	Darstellung von Sequenzen (z.B. DNA, Oligonukelotide usw.)
<i>BioRender</i> (Science Suite Inc., Kanada)	Abbildungen und Vorlagen aus dem <i>Life Science</i> Bereich sowie Erstellung eigener Abbildungen
<i>BIOVIA Draw</i> (©2019 Dassault Systèmes)	Darstellung von chemischen Strukturformeln
<i>BLAST</i> (National Center for Biotechnology information (NCBI))	Abgleich von Sequenzen (Alignment)
<i>CAS Scifinder^r</i> (©2022 American Chemical Society)	Datenbank chemischer Strukturen und Anwendungsmöglichkeiten
<i>Image LabTM</i> (Bio-Rad Laboratories, Inc.)	Visualisierung und Dokumentation von Agarosegelen
<i>LabSolution 5.99</i> (©2008-2020 Shimadzu)	Auswertung und Visualisierung von Daten der analytischen HPLC
<i>LabSolution 5.110</i> (©2008-2021 Shimadzu)	Auswertung und Visualisierung von Daten der präparativen HPLC
<i>LabSolution 5.109</i> (©2008-2021 Shimadzu)	Auswertung und Visualisierung von Daten der HPLC-MS
<i>NEB-TM-Calculator</i> (New England Biolabs, Inc.)	Berechnung der Annealing-Temperatur für die Polymerase-Ketten-Reaktion
<i>Origin 7.5</i> (OriginLab Corporation, USA)	Analyse und Darstellung wissenschaftlicher Daten
<i>PCR Primer Design Tool</i> (Eurofins Scientific SE)	Design von Oligonukleotiden

2.2 Organismen

2.2.1 Kultivierte Pilzstämme

Die in der nachfolgenden Tabelle gelisteten Pilzstämme wurden für das in dieser Arbeit durchgeführte Screening-Verfahren verwendet. Die Pilze wurden im zweiwöchigen Rhythmus auf neue Nährmedien überimpft und bei 23 °C bzw. 26 °C inkubiert. Sie stammen teilweise aus der Stammsammlung des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF) und der AG Thines. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Pilze eigenständig isoliert.

Tabelle 6: Organismen und ihre Herkunft. Die Organismen stammen aus der Stammsammlung des IBWF sowie der AG Thines oder wurden zum Teil eigenständig isoliert. In der Tabelle befindet sich die jeweilige vergebene Nummer des Pilzstammes sowie ein Kürzel, falls vorhanden. Des Weiteren sind auch die Herkunft und die jeweilige IBWF- bzw. Kryostocknummer (AG Thines) der Tabelle zu entnehmen. * = Pilzisolat nicht näher bestimmt. X = IBWF- bzw. Kryostocknummer nicht vorhanden.

Nummer	Pilzstamm	Kürzel	Herkunft	IBWF- bzw. Kryostocknummer
1	<i>Serpula himantioides</i>		IBWF	05157
2	<i>Leucocoprinus birnbaumii</i>		IBWF	16001
3	<i>Gloeophyllum sepiarium</i>		IBWF	78002
4	<i>(Neo)-lentinus lepideus</i>		IBWF	93071
5	<i>Trametes versicolor</i>		IBWF	96287
6	<i>Morchella importuna</i>		IBWF	A04-91
7	<i>Morchella sp.</i>		IBWF	A15B-95
8	<i>Xylaria enterogena</i>		IBWF	A55-2009
9	<i>Tricharina sp.</i>		IBWF	E00097
10	<i>Epicoccum sp.</i>		IBWF	E00117
11	<i>Alternaria infectoria</i>		IBWF	E11032
12	<i>Epicoccum nigrum</i>		IBWF	E99013
13	<i>Pleosporo-mycetidae</i>		IBWF	E99050
14	<i>Penicillium sp.</i>		IBWF	E99105
15	<i>Alternaria alternata</i>		IBWF	E99230
16	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i>	<i>Pch</i>	BASF 1315	X
17	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	<i>Pmi</i>	BASF 1189	345
18	<i>Fomitiporia mediterranea</i>	<i>Fmed</i>	BASF	295
19	<i>Eutypa lata</i>	<i>Ela</i>	IBWF	IBWF 160112 bzw. 296
20	<i>Hyphoderma radula</i>		IBWF	83001
21	<i>Agaricales</i>		IBWF	83021
22	<i>Tyromyces chioneus</i>		IBWF	83101
23	<i>Fomitopsis pinicola</i>		IBWF	83109
24	<i>Phellinus igniarius</i>		IBWF	84066
25	<i>Phellinus igniarius</i>		IBWF	84067
26	<i>Fomes fomentarius</i>		IBWF	84068
27	<i>Phellinus igniarius</i>		IBWF	84070
28	<i>Phellinus sp.</i>		IBWF	84073

Nummer	Pilzstamm	Kürzel	Herkunft	IBWF- bzw. Kryostocknummer
29	<i>Fomitopsis pinicola</i>		IBWF	84074
30	<i>Fomes fomentarius</i>		IBWF	84075
31	<i>Daedalea quercina</i>		IBWF	84098
32	<i>Trametes gibbosa</i>		IBWF	84101
33	<i>Phellinus ferrugineus</i>		IBWF	84110
34	<i>Pleurotus dryinus</i>		IBWF	84113
35	<i>Coprinus radiatus</i>		IBWF	84115
36	<i>Armillariella mellea</i>		IBWF	84125
37	<i>Laetiporus sulfureus</i>		IBWF	85020
38	<i>Coprinellus micaceus</i>		IBWF	01077
39	<i>Coprinus sp.</i>		IBWF	05004
40	<i>Trametes cinnabarina</i>		IBWF	06026
41	<i>Pleurotus o. Pleurocybe</i>		IBWF	06033
42	<i>Trametes sp.</i>		IBWF	06042
43	<i>Coprinus sp.</i>		IBWF	06127
44	<i>Coprinellus micaceus</i>		IBWF	09110
45	<i>Crepidotus sp.</i>		IBWF	84103
46	<i>Rhodotus palmatus</i>		IBWF	84112
47	<i>Agaricles</i>		IBWF	84122
48	<i>Amaroposita stiptica</i>		IBWF	99117
49	*		IBWF	019-86
50	<i>Mortierella</i>		IBWF	031-86
51	<i>Mortierella</i>		IBWF	033-86
52	<i>Botrytis cinerea</i>		IBWF	038-86
53	<i>Botrytis cinerea</i>		IBWF	039-86
54	*		IBWF	040-86
55	<i>Mortierella</i>		IBWF	041-86
56	<i>Purpureocillium lilacinum</i>		IBWF	043-86
57	<i>Clonostachys</i>		IBWF	046-86
58	<i>Fusarium oxysporum</i>		IBWF	049-86
59	*		IBWF	055-86
60	<i>Fusarium accuminatum</i>		IBWF	065-86

Nummer	Pilzstamm	Kürzel	Herkunft	IBWF- bzw. Kryostocknummer
61	<i>Penicillium</i>		IBWF	069-86
62	<i>Omphalotus sp.</i>		IBWF	02045-2
63	<i>Omphalotus sp.</i>		IBWF	02045-4
64	<i>Omphalotus sp.</i>		IBWF	02045-5
65	<i>Omphalotus olearius</i>		IBWF	03020-03
66	<i>Omphalotus olearius</i>		IBWF	03020-04
67	<i>Omphalotus olearius</i>		IBWF	03021
68	<i>Omphalotus olearius</i>		IBWF	03021-02
69	<i>Omphalotus olearius</i>		IBWF	03021-09
70	<i>Omphalotus olearius</i>		IBWF	03021-13
71	<i>Penicillium steckii</i>	<i>P. steckii</i>	IBWF	104-06
72	*		IBWF	06022
73	<i>Roesleria subterranea</i>	IB-Rüd01-16	Eigenisolat (AG Thines)	351
74	<i>Coprinus cinerea</i>		Eigenisolat (AG Thines)	X
75	<i>Guignardia bidwellii</i>	Gb_10113	DLR-Rheinpfalz	399
76	<i>Guignardia bidwellii</i>	Gb_9450	DLR-Rheinpfalz	400
77	*		IBWF	053-86
78	<i>Umbelopsis sp.</i>	Umb	AG Thines	354
79	<i>Hypsizygus ulmarius</i>	Ulm	AG Thines	355
80	*	#14	AG Thines	X
81	*	#20	AG Thines	X
82	*	#16	AG Thines	356
83	*	#11	AG Thines	357
84	<i>Mortierella hyalina</i>	ALH2101	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	377
85	<i>Mortierella verticillata</i>	TP2101	Eigenisolat (AG Thines)	X
86	<i>Mortierella gamsii</i>	TP2102	Eigenisolat (AG Thines)	X
87	<i>Sordaria fimicola</i>	TP2103	Eigenisolat (AG Thines)	X
88	<i>Phanerochaete livescens</i>	TP2104	Eigenisolat (AG Thines)	X
89	<i>Phanerochaete sp.</i>	TP2105	Eigenisolat (AG Thines)	X
90	<i>Agrocybe pediades</i>	TP2106	Eigenisolat (AG Thines)	X
91	<i>Coprinellus radians</i>	TP2107	Eigenisolat (AG Thines)	X
92	<i>Fusarium culmorum</i>	TP2108	Eigenisolat (AG Thines)	X

Nummer	Pilzstamm	Kürzel	Herkunft	IBWF- bzw. Kryostocknummer
93	<i>Sordaria fimicola</i>	TP2109	Eigenisolat (AG Thines)	X
94	<i>Sordaria fimicola</i>	TP2110	Eigenisolat (AG Thines)	X
95	<i>Coprinellus radians</i>	TP2111	AG Thines	X
96	<i>Trametes gibbosa</i>	TP2112	Eigenisolat (AG Thines)	X
97	<i>Fusarium sp.</i>	TP2113	Eigenisolat (AG Thines)	X
98	<i>Panaeolous cinctulus</i>	TP2114	Eigenisolat (AG Thines)	X
99	<i>Magnaporthe oryzae</i>	70-15	Eigenisolat (AG Thines)	X
100	<i>M. oryzae</i> Mutante	<i>Mo::Lcc1::Efa</i>	IBWF	X
101	<i>M. oryzae</i> Mutante	<i>Mo::Lcc1::53Pro</i>	IBWF	X
102	<i>Panaeolous sp.</i>	TP2115	IBWF	X
103	<i>Trametes versicolor</i>	TP2116	Eigenisolat (AG Thines)	348
104	<i>Alternaria alstroemeriae</i>		AG Thines	352
105	*		AG Thines	X
106	*		AG Thines	X
107	*		AG Thines	X
108	*		AG Thines	X
109	*		AG Thines	X
110	*		AG Thines	X
111	*		AG Thines	X
112	*		AG Thines	X
113	*		AG Thines	X
114	*		AG Thines	X
115	*		AG Thines	X
116	*		AG Thines	X
117	*		AG Thines	X
118	*		AG Thines	X
119	*		AG Thines	X
120	*		AG Thines	X
121	*		AG Thines	X
122	*	CG2201	AG Thines	426
122.1	*	CG2201.1	AG Thines	489
122.2	*	CG2201.2	AG Thines	490

Nummer	Pilzstamm	Kürzel	Herkunft	IBWF- bzw. Kryostocknummer
123	*	CG2202	AG Thines	494
124	*	CG2203	AG Thines	492
125	*		Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	488
126	*	ALH2201	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	497
127	*	ALH2202	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	493
128	*	ALH2203	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	502
129	*	ALH2204	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	X
130	*	ALH2205	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	X
131	*	ALH2206	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	499
132	*	CG2204	AG Thines	491
133	*	CG2205	AG Thines	X
134	*	CG2206	AG Thines	X
135	*		AG Thines	X
136	*		AG Thines	495
137	*		AG Thines	X
138	<i>Plectosphaerella sp. / Fusarium sp. / Verticillium sp.</i>	CW #34	IBWF	X
139	<i>Pleosporales sp.</i>	CW #38	IBWF	496
140	<i>Emericellopsis maritima / Parasarocladium breve / Acremonium potronii</i>	CW #11	IBWF	X
141	<i>Clonostachys sp.</i>	CW #40	IBWF	X
142	<i>Fusarium sp.</i>	CW #47	IBWF	X
143	<i>Stachybotryis sp.</i>	CW #45	IBWF	X
144	<i>Penicillium virgatum</i>	CW #33	IBWF	X
145	<i>Penicillium sp. (vermutlich P. janczewskii)</i>	CW #41	IBWF	X
146	<i>Penicillium sp. (vermutlich P. bialowiezense)</i>	CW #43	IBWF	X
147	<i>Penicillium scabrosum</i>	CW #39	IBWF	X
148	<i>Penicillium sp.</i>	CW #35	IBWF	X
149	*	ALH2207	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	504
150	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ALH2208	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	506
151	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ALH2209	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	X

Nummer	Pilzstamm	Kürzel	Herkunft	IBWF- bzw. Kryostocknummer
152	<i>Pholiota</i>	ALH2210	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	X
153	<i>Epicoccum nigrum</i>	ALH2211	Eigenisolat A. Hiller (AG Thines)	505
154	<i>Fusarium oxysporum</i>	LS2201	Eigenisolat (AG Thines)	473
155	<i>Trichoderma sp.</i>	LS2202	Eigenisolat (AG Thines)	474
156	<i>Mucor hiemalis</i>	LS2203	Eigenisolat (AG Thines)	475
157	<i>Mucor genevensis</i>	LS2204	Eigenisolat (AG Thines)	476
158	<i>Mortierella minutissima</i>		AG Thines	X
159	<i>Trichoderma viride</i>	LS2205	Eigenisolat (AG Thines)	477
160	<i>Boeremia sp.</i>	LS2206	Eigenisolat (AG Thines)	478
161	<i>Neodidymelliopsis sambuci</i>	LS2207	Eigenisolat (AG Thines)	479
162	<i>Phoma sp.</i>	LS2208	Eigenisolat (AG Thines)	480
163	<i>Earliella scabrosa</i>	LS2209	Eigenisolat (AG Thines)	481
164	<i>Penicillium bialowiezense</i>	LS2210	Eigenisolat (AG Thines)	482
165	<i>Penicillium brevicompactum / bialowiezense</i>	LS2211	Eigenisolat (AG Thines)	483
166	<i>Aspergillus parasiticus / transmontanensis</i>	LS2212	Eigenisolat (AG Thines)	484
167	<i>Diploida mutila</i>	LS2213	Eigenisolat (AG Thines)	485
168	<i>Pleurotus ostreatus</i>		AG Thines	X
169	<i>Diaporthe foeniculina</i>	LS2214	Eigenisolat (AG Thines)	486
170	*	LS2215	Eigenisolat (AG Thines)	487
171	*		AG Thines	X
172	*		AG Thines	X
173	*		AG Thines	X
174	*		AG Thines	X
175	*		AG Thines	X
176	*		AG Thines	X
177	<i>Phomopsis sp.</i>		AG Thines	X
178	<i>Kräuterseitling</i>		AG Thines	X
179	<i>L. Leucocoprinus</i>		AG Thines	X
180	<i>M. oryzae</i> Expressionsmutante	Mo::AaeUPO	IBWF	X

2.2.2 Testorganismen zur biologischen Charakterisierung

In der nachfolgenden Tabelle sind alle Organismen gelistet, welche für die genauere biologische Charakterisierung einzelner Rohextrakte bzw. Reinsubstanzen, verwendet worden sind. Die biologische Charakterisierung erfolgte eigenständig sowie teilweise am Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF).

Tabelle 7: Bakterien, Pilze, Oomyceten, Pflanzen und Zellen, welche für die biologische Charakterisierung einzelner Substanzen verwendet worden sind. Angegeben sind die Organismen, der jeweilige verwendete Stamm sowie deren Temperaturoptimum in Grad Celsius [°C]. RT = Raumtemperatur.

Organismen	Stamm	Temperatur [°C]
Bakterien		
<i>Bacillus brevis</i> (99)	ATCC 9999	37
<i>Enterobacter dissolvens</i> (ED)	LMG 2683	27
<i>Micrococcus luteus</i> (SL)	ATCC 381	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA01 DSM 19880	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA14 DSM 19982	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	/	37
Pilze/Oomyceten		
<i>Botrytis cinerea</i>	DMS 877	RT
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	37
<i>Magnaporthe oryzae</i>	70-15	26 - 28
<i>Mucor miehi</i>	TÜ 284	37
<i>Nematospora coryli</i>	ATCC 10648	27
<i>Penicillium notatum</i> (Pn)	/	27
<i>Paecilomyces variotii</i> (Pvar)	/	37
<i>Phytophthora infestans</i>	CBS 430.90	18

Pflanzen		
<i>Lepidium sativum</i>	/	26
<i>Setaria italica</i>	/	26
Zellen		
HeLa S3	ACC 161	37
VH10tert	/	37
HepG2	/	37
RPE-1	/	37

2.2.3 Isolierung von Pilzen aus der Natur

Neue Pilze wurden sowohl mittels Fruchtkörper als auch aus Ästen unterschiedlicher Bäume isoliert. Die Isolierung über den Fruchtkörper erfolgte mittels kleiner Stücke aus dem Hut des Fruchtkörpers, wobei diese am Deckel einer Petrischale mittels Silikonfett befestigt worden sind, sodass die herunterfallenden Sporen auf der Selektions-Agarplatte (PDA + Pen + Strep) anwachsen konnten. Für die Isolierung aus Ästen, wurden diese zunächst in kleinere Stücke zerteilt, oberflächensterilisiert und anschließend nach Trocknung ebenfalls zur Kultivierung auf eine Selektions-Agarplatte (PDA + Pen + Strep) überführt. Die Oberflächensterilisation der Äste erfolgte mittels 5 % Natriumhypochlorit (NaOCl) und 70 % Ethanol (EtOH), wie der Tabelle 8 zu entnehmen. Sind auf den jeweiligen Agarplatten mehrere Pilze angewachsen wurden diese wiederum so lange auf weiteren Selektions-Agarplatten vereinzelt, bis alle getrennt voneinander vorlagen.

Tabelle 8: Protokoll der Oberflächensterilisation von Ästen. Angegeben ist die Reihenfolge der Lösungen (von oben nach unten), sowie die Inkubationszeit der Probe in Sekunden [s].

Lösungen	Inkubationszeit [s]
Natriumhypochlorit 5 %	15
Ethanol 70 %	30
Natriumhypochlorit 5 %	15

2.3 Fermentationsmethoden und Naturstoffanalyse

2.3.1 Vorkultivierung verschiedener Pilzstämme

Alle in Tabelle 6 gelisteten Pilzstämme wurden in 150 mL HMG-Medium in 250 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane für mindestens acht Tage bei Raumtemperatur (RT) und 120 Umdrehungen pro Minute (Upm) vorkultiviert. Dazu wurden die Kolben jeweils mit 10 – 15, mit dem jeweiligen Pilz, bewachsenen Agarstücken (ca. 0,5 cm x 0,5 cm) steril inokuliert. Mit Erreichen von ausreichender Biomasse wurde die Vorkultur zur Inokulation der Hauptkulturen verwendet (2.3.1.1).

2.3.1.1 Fermentation in Lignin-supplementierten Submerskulturen

Für das Screening-Verfahren wurde die Kultivierung in 500 mL Medium in 1 L Erlenmeyerkolben mit einer Schikane durchgeführt. Dazu wurden die verschiedenen Kulturmedien (2.1.7), Minimalmedium (MM), Minimalmedium mit Kraftlignin (MM + KL) sowie Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (MM + LigS), mit je 25 mL der jeweiligen Vorkultur (2.3.1) steril inokuliert. Die 14-tägige Kultivierung erfolgte bei RT und 120 Upm. Sowohl nach einer Woche wie auch am Ende der Fermentation, wurde der pH- und Glukosewert bestimmt und ein Aliquot der Kultur für z.B. Enzym-Assays bei -20 °C eingelagert.

2.3.1.2 Fermentation im 20 L Maßstab

Zur Fermentation im 20 L Maßstab wurde zunächst eine 250 mL HMG-Vorkultur des jeweiligen Pilzes in 500 mL Erlenmeyerkolben mit einer Schikane vorkultiviert (2.3.1). Mit Erreichen von ausreichender Biomasse wurde die gesamte Vorkultur in den zuvor autoklavierten Fermenter überführt. Die Fermentation erfolgte bei 23 °C, einer Rotation von 120 Upm und einer Luftzufuhr von 3 L/min. Bereits vor dem Autoklavieren sowie nach Bedarf wurde ca. 1 mL Antischaum (Antifoam, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) in den Fermenter steril hinzugegeben. Täglich wurde 150 mL Kultur steril entnommen, der pH- und Glukosewert bestimmt und ein Aliquot der Kultur für z.B. Enzym-Assays bei -20 °C eingelagert. Die Fermentation wurde nach 14 Tagen beendet.

2.3.2 Gewinnung von Rohextrakten aus Submerskulturen

Nach 14-tägiger Kultivierung wurde die gesamte Kultur mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat oder einer 1:1-Mischung aus Cyclohexan und Ethylacetat aufbereitet. Für die Extraktion wurde die Kultur im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem jeweiligen Lösungsmittel in einer 1 L Schottflasche extrahiert. Nach Trennung der organischen von der wässrigen Phase wurde die organische Phase über wasserfreies Natriumsulfat (Na_2SO_4) in einen Rundkolben überführt und im Anschluss am Rotationsverdampfer eingeeengt. Anschließend wurde der Rohextrakt (RE) mit ca. 2 mL Methanol *p.a.* (MeOH) rückgelöst und in ein zuvor eingewogenes Probengläschen (Supelco®) überführt und wiederum, zur Bestimmung des Gewichts, in einem Vakuumkonzentrator (Speedvac®) getrocknet. Die Lagerung der Probengläschen erfolgte bei 4 °C bzw. -20 °C bei dauerhafter Lagerung.

2.3.2.1 Kieselgelchromatographie

Zur weiteren Aufreinigung der, aus einer 20 L Fermentation gewonnenen, Rohextrakte (2.3.2) wurde eine Kieselgelchromatographie durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Menge an RE bestimmt und die ca. 3 – 5-fache Menge an Kieselgel 60 abgewogen. Der RE wurde dann in 1 – 2 mL MeOH *p.a.* rückgelöst und an das zuvor abgewogene Kieselgel 60 gebunden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das gesamte Lösungsmittel wieder verdampft. Ein zweiter Teil Kieselgel 60, ca. die 30 – 50-fache Menge des REs wurde abgewogen, in eine Saugflasche überführt, mit Cyclohexan überschichtet und mittels Vakuumpumpe entgast. Das entgaste Kieselgel 60 wurde dann in eine Glassäule überführt, dass an Kieselgel 60 gebundene RE obendrauf gegeben und mit einer ca. 1 – 2 cm breiten Schicht an Glastperlen oder Sand beschwert. Die anschließende Elution erfolgte mit dem in Tabelle 9 angegebenen Lösungsmittelgradienten unter Normaldruck. Alle Fraktionen wurden im Anschluss mittels Rotationsverdampfer eingetrocknet, in 1 – 2 mL MeOH *p.a.* rückgelöst und in ein zuvor eingewogenes Probengläschen (Supelco®) überführt. Die Lagerung der Probengläschen erfolgte bis zur HPLC-Analyse bei 4 °C bzw. -20 °C bei dauerhafter Lagerung.

Tabelle 9: Elutionsschritte der Kieselgelchromatographie. Angegeben sind die verschiedenen Lösungsmittel und ihr Anteil in Prozent [%] pro Elutionsschritt.

Elutionsschritt	Cyclohexan [%]	Ethylacetat [%]	Methanol [%]
1	100	0	0
2	90	10	0
3	75	25	0
4	50	50	0
5	0	100	0
6	0	75	25
7	0	0	100

2.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie (MS)

2.3.3.1 Analytische HPLC und HPLC-MS der Rohextrakte

Alle in dieser Arbeit generierten Rohextrakte (RE) wurden mittels analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) auf den Abbau von Lignin-Bestandteilen sowie möglichen neuen Metaboliten hin analysiert. Dazu wurden die RE mit MeOH *p.a.* auf eine Konzentration von 5 mg/mL eingestellt und anschließend für mind. 10 Minuten (min) bei 13.000 Upm zentrifugiert, um mögliche Schwebepartikel zu entfernen. Die Messungen erfolgten am Institut für Molekulare Physiologie (IMP) in der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie (AG Thines) an einem LC-System der Firma Shimadzu. Das System ist mit zwei LC-20AD-Pumpen, einem DGU-405-Degaser, einem SIL 20AC-Autosampler, einem CBM-20A-Controller sowie einem CTO-20-AC-Säulenofen ausgestattet. Die Trennung der einzelnen in dem RE enthaltenen Substanzen erfolgte auf einer analytischen RP18-Säule (Waters Sunfire C18, Partikelgröße 5 µM, 4,6 x 250 mm) bei 20 °C. Eluiert wurde mit zwei Eluenten, Eluent A (H₂O_{UF} mit 0,1 % TFA) und Eluent B (Acetonitril *p.a.*) mit einer Flussrate von 1 mL/min und dem in der Tabelle 10 beschriebenen Standard-Gradienten. Das Injektionsvolumen pro Probe beträgt 20 µL. Die anschließende Detektion der Metabolite erfolgte mit einem SPD-M20A *Photodioden Array Detector* (Shimadzu) bei 210 nm, 250 nm, 270 nm, 300 nm, 350 nm und 400 nm. Die UV-Spektren wurden von 200 – 800 nm aufgenommen. Die abschließende Analyse und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software LabSolution 5.99 (2.1.8).

Tabelle 10: Standard-Gradient der analytischen HPLC. Angegeben sind die Anteile der Eluenten in Prozent [%] über die Zeit in Minuten [min]. Eluent A: H₂O_{UF} mit 0,1 % TFA, Eluent B: Acetonitril *p.a.*

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,01	99	1
20	0	100
24	0	100
25	99	1
30	99	1

Die Vorbereitung der an der analytischen HPLC-MS zu messenden RE erfolgte wie zuvor bei der analytischen HPLC-Messung. Die LC-ESI-MS-Analysen erfolgten am IMP in der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie (AG Thines) an einem LC-System der Firma Shimadzu. Das System ist mit zwei LC-40AD-Pumpen, einem DGU-405-Degaser, einem SIL 40AC-Autosampler, einem SCL-40-Controller sowie einem CTO-40C-Säulenofen ausgestattet. Die Trennung der einzelnen in dem RE enthaltenen Substanzen erfolgte auf einer analytischen RP18-Säule (Nucleoshell™ RP18, Partikelgröße 2,7 µM, 2 x 100 mm) bei 40 °C. Eluiert wurde mit zwei Eluenten, Eluent A (H₂O_{UF} mit 0,1 % TFA) und Eluent B (Acetonitril *p.a.*) mit einer Flussrate von 0,3 mL/min und dem in der Tabelle 11 beschriebenen Standard-Gradienten. Das Injektionsvolumen pro Probe beträgt 1-10 µL. Die anschließende Detektion der Metabolite erfolgte mit einem SPD-M40A *Photodioden Array Detector* (Shimadzu) bei 210 nm, 250 nm, 270 nm, 300 nm, 350 nm und 400 nm. Die UV-Spektren wurden von 200 – 800 nm aufgenommen. Die Massenanalyse wurde mit einem Single quadrupol-LCMS-2020-System (Shimadzu) mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) unter folgenden Parametern durchgeführt: Scan-Modus, positiv und negativ, beginnend bei 150 bis 1000 m/z mit einer Aufnahmezeit von 2 – 10 min. DL-Temperatur 250 °C, Vernebelungsgasfluss 1,5 L/min, Trocknungsgasfluss 10 L/min bei 200 °C. Die abschließende Analyse und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software LabSolution 5.109 (2.1.8).

Tabelle 11: Standard-Gradient der analytischen HPLC-MS. Angegeben sind die Anteile der Eluenten in Prozent [%] über die Zeit in Minuten [min]. Eluent A: H₂O_{UF} mit 0,1 % FA, Eluent B: Acetonitril *p.a.*

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0,01	95	5
2	95	5
6	10	90
8	10	90
8,5	95	5
12	95	5

2.3.3.2 Präparative HPLC der Rohextrakte

Die Aufreinigung und Isolierung einzelner Substanzen aus dem RE erfolgte mittels präparativer HPLC. Dazu wurden 250 mg RE in 1 mL H₂O:AcN (1:1) gelöst, bei 13.000 Upm für mind. 10 min zentrifugiert und anschließend in die Anlage injiziert. Die Auftrennung erfolgte auf einer präparativen RP18-Säule (Waters Sunfire C18, Partikelgröße 5 µM, 19 x 250 mm) bei RT. Eluiert wurde mit zwei Eluenten, Eluent A (H₂O_{UF} mit 0,1 % FA) und Eluent B (Acetonitril *p.a.*) mit einer Flussrate von 17,1 mL/min und dem in der Tabelle 12 beschriebenen Standard-Gradienten. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 1 mL. Die Detektion der Metabolite erfolgte mit einem SPD-M40A *Photodiode Array Detector* (Shimadzu) bei 210 nm, 250 nm, 270 nm, 300 nm, 350 nm und 400 nm. Die UV-Spektren wurden von 200 – 800 nm aufgenommen. Die abschließende Analyse und Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software LabSolution 5.110 (2.1.8). Im Anschluss wurden die Fraktionen mit 5 % Toluol *p.a.* versetzt, in ein zuvor eingewogenes Probengläschen (Supelco®) überführt und in einem Vakuumkonzentrator (Speedvac®) getrocknet. Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen sowie der weiteren Analyse der isolierten Substanzen erfolgte im Anschluss eine analytische HPLC-MS Messung (2.3.3.1). Die Probengläschen wurden im Anschluss bei 4 °C oder längerfristig bei -20 °C gelagert.

Tabelle 12: Standard-Gradient der präparativen HPLC. Angegeben sind die Anteile der Eluenten in Prozent [%] über die Zeit in Minuten [min]. Eluent A: H₂O_{UF} mit 0,1 % TFA, Eluent B: Acetonitril *p.a.*

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	99	1
1	99	1
20	0	100
23	0	100
25	99	1
30	99	1

2.3.4 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kernspinresonanzspektroskopien wurden am Fachbereich Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Für die NMR-Analyse wurden die zuvor mittels präparativer HPLC (2.3.3.2) aufgereinigten und isolierten Reinsubstanzen im trocknen Zustand übergeben. Die Probenvorbereitung sowie Messung wurde am Fachbereich Chemie durchgeführt.

2.4 Enzym-Assays

2.4.1 Qualitativer Nachweis lignolytischer Enzymaktivität

Zur Charakterisierung lignolytischer Enzymaktivität wurden verschiedenen Organismen auf *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM)-Agarplatten mit verschiedenen Enzym-spezifischen Zusätzen, wie 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), Azur B, Poly R, Kraftlignin (KL) und Magnesium-Lignosulfonat (LigS) (2.1.7) inokuliert (Pointing, 1999). Dazu wurden zunächst Ø 1 cm große Stücke des jeweiligen Pilzes aus einer gut bewachsenen Agarplatte, mit Hilfe eines Korklochbohrers ausgestanzt und jeweils mittig auf die LBM-Platten platziert. Die Inkubation erfolgte bei RT für 10 Tage. Im Anschluss daran wurden die Platten mit KL und LigS zur Auswertung mit einer 1 % (w/v) Eisenchlorid-Kaliumhexacyanoferrat (III)-Lösung überschichtet. Dabei weist eine Aufhellung des Mediums die Oxidation phenolischer Substanzen nach. Die Entfärbung von Poly R impliziert eine Aktivität von Polyphenoxidasen, Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Azure B dient als Nachweis für Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen, jedoch nicht für Laccasen und ABTS ausschließlich für Laccasen.

2.4.2 Quantitativer Nachweis von Laccasen und Peroxidasen - ABTS-Test

Für den quantitativen Nachweis von Laccasen und Peroxidasen nach Niku-Paavola *et al.* (1990) im Kulturfiltrat (KF) wurden 1,5 mL pro Tagesprobe in ein Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt gemessen oder bei später Messung zunächst bei -20 °C gelagert. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde das KF vom Myzel getrennt. Von dem KF wurden drei verschiedene Verdünnungen mit H₂O_{ve} angesetzt (1:10, 1:100, 1:1000). Je 100 µL des unverdünnten bzw. verdünnten KFs wurde mit 100 µL H₂O_{ve} (Nachweis Laccase) oder 100 µL 4,5 mM H₂O₂-Lösung (Nachweis Peroxidase) in einer 96-Well-Platte vermischt. Nach Zugabe von 100 µL ABTS-Lösung zu den bereits vorgelegten Proben wurde die Extinktion bei 420 nm gemessen (FLUOstar® Omega, BMG LABTECH). Alle Proben wurden im Triplikat gemessen.

2.4.3 Qualitativer Katalase-Assay

Zum Ausschluss von Peroxidase-Aktivität wurden zunächst zwei Vorkulturen des zu untersuchenden Pilzes angesetzt (2.3.1) und diese für eine Woche bei RT und 120 Upm inkubiert. Danach wurde zu beiden Kolben Magnesium-Lignosulfonat (LigS) mit einer Endkonzentration von 10 g/L hinzugegeben. Zusätzlich wurde zu einem der beiden Kulturen zweimal am Tag 100 mg Katalase, gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, über einen Zeitraum von vier Tagen hinzugegeben. Täglich, sowie vor erstmaliger Zugabe der Katalase, wurden jeweils 100 mL Tagesprobe beider Kolben entnommen. Diese wurden jeweils direkt mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aufbereitet und der RE mittels HPLC analysiert (2.3.2 & 2.3.3). Der Kolben ohne Katalase diente zur Kontrolle.

2.4.4 Quantitativer Peroxygenase-Assay

Für den quantitativen Peroxygenase-Assay nach Poraj-Kobielska *et al.* (2012) wurde das KF einzelner Tagesproben in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und entweder direkt analysiert oder bei späterer Messung zunächst bei -20 °C gelagert. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde das KF vom Myzel getrennt. Von dem KF wurde eine 1:10 Verdünnungen mit H₂O_{ve} angesetzt. Je 30 µL KF wurden mit 30 µL 5-nitro-1,3-benzodioxol (NBD), 165 µL 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7), 60 µL H₂O und 15 µL Wasserstoffperoxid (20 mM) versetzt, in eine 96-Well-Platte überführt und bei 425 nm photometrisch gemessen (FLUOstar® Omega, BMG LABTECH). Alle Proben wurden im Triplikat gemessen.

2.4.5 Qualitativer P450-Monooxygenase-Assay

Zum Nachweis der P450-Monooxygenasen wurden zunächst zwei 250 mL HMG-Vorkulturen des jeweiligen Pilzisolats angesetzt (2.3.1). Nach einwöchiger Kultivierung wurden die Kolben an die Universität Stuttgart übergeben, welche den Kohlenstoffmonoxid-Assay (CO-Assay) durchführten. Kohlenstoffmonoxid blockiert das aktive Zentrum der P450-Monooxygenase, somit ist das Enzym inaktiv und kann das Substrat nicht umsetzen (Durairaj *et al.*, 2016; Omura und Sato, 1964). Einer der beiden Kolben wurde für ca. 5 min mit reinem CO geflutet und im Anschluss beide mit LigS versetzt. Nach 24 und 72 Stunden (h) wurde jeweils aus beiden Kolben eine 50 mL Probe entnommen und direkt bei -20 °C gelagert. Im Anschluss wurden die Proben an die AG Thines übergeben und diese mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat extrahiert und der RE anschließend mittels HPLC analysiert (2.3.2 & 2.3.3), um zu überprüfen, ob an der Umsetzung des LigS P450-Monooxygenasen beteiligt sind.

2.5 Biologische Aktivitätstests

2.5.1 Agardiffusionstest

Zur Testung möglicher antibiotischer oder antimykotischer Aktivität wurden alle im Rahmen dieser Arbeit isolierten Reinsubstanzen gegenüber verschiedenen Bakterien und Pilzen getestet. Die vom IBWF zur Verfügung gestellten Organismen *Bacillus brevis*, *Enterobacter dissolvens*, *Micrococcus luteus*, *Mucor miehi*, *Nematospora coryli*, *Penicillium notatum* und *Penicillium variotii* wurden in Agarplatten eingegossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Die zu untersuchenden Reinsubstanzen wurden mit MeOH *p.a.* rückgelöst und mit einer Konzentration von 10 µg, 50 µg, 100 µg und 200 µg auf Filterrondelle (Ø 0,6 cm) aufgetragen und nach Evaporation des Lösungsmittels in Triplikaten auf die jeweiligen Agarplatten überführt. Zur Positivkontrolle gegenüber Bakterien wurden 100 µg Penicillin und 100 µg Streptomycinsulfat sowie gegenüber Pilzen 100 µg Hygromycin verwendet. Als Negativkontrolle diente das zur Lösung der Reinsubstanzen verwendete Lösungsmittel MeOH *p.a.* Die Platten wurden nach Auftragen der Filterrondelle für 24 – 48 h bei dem jeweiligen Temperaturoptimum (2.2.2) inkubiert. Die Tests wurden sowohl selbstständig als auch am IBWF in Mainz durchgeführt. Letztere testeten außerdem die Bakterien *Staphylococcus aureus* (grammpositiv) und *Pseudomonas aeruginosa* (grammnegativ) in 96-Well-Platten.

2.5.2 Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest

Der Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest wurde gegenüber verschiedenen Pilzen und Pflanzen in 96- bzw. 48-Well-Platten am IBWF durchgeführt. Die zuvor isolierten und aufgereinigten Reinsubstanzen wurden in MeOH *p.a.* oder EtOH *p.a.* rückgelöst und auf folgende Konzentrationen eingestellt: 5 µg, 10 µg, 25 µg, 50 µg und 100 µg. Nach Vorlage der Reinsubstanzen in den Well-Platten, wurden nach Evaporation des Lösungsmittels 200 µL Sporen bzw. Sporangien von *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Magnaporthe oryzae* und *Phytophthora infestans* in einer bestimmten Konzentration (Tab. 13) hinzugegeben und bei dem jeweiligen Temperaturoptimum (2.2.2) für 48 h inkubiert. Als Negativkontrolle diente das zur Lösung der Reinsubstanzen verwendete Lösungsmittel sowie als Positivkontrolle Ciclopirox (1 mg/mL). Alle Tests wurden in Duplikaten durchgeführt.

Tabelle 13: Organismen, welche für den Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest verwendet worden sind. Angegeben sind die angewandten Sporen- bzw. Konidien- oder Zell-Konzentrationen in (X/mL) sowie das Inkubationsmedium.

Organismus	Sporen- bzw. Konidien- oder Zell-Konzentration [X/mL]	Inkubationsmedium
<i>Botrytis cinerea</i>	4×10^4	H ₂ O _{ve}
<i>Fusarium graminearum</i>	4×10^4	H ₂ O _{ve}
<i>Magnaporthe oryzae</i>	5×10^4	H ₂ O _{ve}
<i>Magnaporthe oryzae</i>	5×10^4	CM:H ₂ O _{ve} (1:1)
<i>Phytophthora infestans</i>	1×10^6	H ₂ O _{ve}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1×10^5	NB
<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^5	NB

Setaria italica und *Lepidium sativum* wurden für die Keimungsinhibitionstests gegenüber Pflanzen verwendet. Dabei wurden die Reinsubstanzen in den Konzentrationen von 10 µg, 20 µg und 50 µg zunächst in die Well-Platten vorgelegt. Nach Evaporation des Lösungsmittels MeOH *p.a.* wurden jeweils 12 Samen der jeweiligen Pflanze sowie 200 µL H₂O pro Well hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde Wasser anstelle der Reinsubstanzen verwendet sowie als Positivkontrolle 5 % Phosphorsäure. Die Inkubation erfolgte anschließend bei 26 °C für vier Tage in einer feuchten Kammer. Durchgeführt wurden die Tests in Triplikaten am IBWF in Mainz.

2.5.3 Zytotoxizitäts-Assay

Zur Überprüfung möglicher Humanpathogener Eigenschaften wurden die, in dieser Arbeit isolierten, Reinsubstanzen am IBWF gegenüber Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa S3) getestet. Die Zellen wurden dafür zunächst im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM mit 5 % fetalem Kälberserum (FKS, gebrauchsfertig) kultiviert. Zur Durchführung des Tests wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^4 Zellen/mL eingestellt und jeweils 200 µL in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte überführt. Nach 24 h wurde das Medium erneuert und die gelösten Reinsubstanzen hinzugegeben. Als Positivkontrolle diente 10 µg/mL Camptothecin oder 50 µg/mL Cycloheximid. Die Zelldifferenzierung wurde mikroskopisch überprüft (Leica DM IL LED Labormikroskop, Leica Systems GmbH). Bei Bedarf wurde das Zellwachstum anhand einer Kristallviolett-Färbung ermittelt.

Die Reinsubstanzen P1 und P2 wurden zusätzlich an der Universitätsmedizin Mainz, Fachbereich Toxikologie, AG Christmann, gegenüber Fibroblasten (VH10tert), Leberkrebszellen (HepG2) und retinalen Pigment Epithelzellen (RPE-1) getestet. Dazu wurden zunächst 20.000 Zellen pro Zelltyp mit DMEM in jedes Well einer 96-Well-Platte ausgesät und 24 h inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Reinsubstanzen P1 und P2 sowie der Kontrollen, Dehydroabietinsäure und Abietinsäure. Nach einer dreitägigen Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen in PBS gewaschen. Im Anschluss wurde pro Well 100 μ L MTT enthaltendes DMEM (c_{end} : 0,5 mg/mL) zugegeben und bei 37 °C inkubiert bis MTT-Kristalle entstanden sind. Daraufhin wurde das Medium entfernt, die Zellen wiederum mit PBS gewaschen und im Anschluss die Kristalle mit 100 μ L 0,04 M HCL in Isopropanol aufgelöst und die Absorption bei 570 nm gemessen. Nach Korrektur des Hintergrundes wurde die Absorption der Kontrolle als 100 % festgelegt und die Werte entsprechend berechnet.

2.5.4 Wachstums- und Biofilm-Assay

Um die Wirkung der aus der Kultivierung mit lignolytischem Industrieabfall isolierten Substanzen auf Wachstum und Biofilmbildung zu testen, wurden für die Substanzen mit bekanntem Molekulargewicht Konzentrationen von 10 μ M, 1 μ M und 100 nM sowie bei Substanzen mit unbekanntem bzw. noch nicht bestätigtem Molekulargewicht Konzentrationen von 1 μ g, 10 μ g und 100 μ g verwendet. Die zu testenden Bakterien, *Pseudomonas aeruginosa* PA 01 DSM 19880 und *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 DSM 19982, wurden über Nacht in LB-Medium vorkultiviert und am nächsten Morgen auf eine OD_{600} von 0,1 eingestellt. Anschließend wurden je 135 μ L der jeweiligen Bakteriensuspension in eine 96-Well-Platte überführt und mit den jeweiligen Konzentrationen der Substanzen versetzt. Zur Bestimmung des Wachstums wurde die OD_{600} über 6 h alle 30 min sowie nach 24, 48 und 72 h mittels Spektrometer bestimmt (Tecan Spark-Plattenlesegerät, Tecan Group Ltd.). Zur Kontrolle wurden die Bakterien jeweils ohne Reinsubstanzen inkubiert und gleichermaßen behandelt.

Zum Nachweis eines potenziellen Quorum-Quenching-Effekts nach der Inkubation mit den isolierten Substanzen wurden Biofilm-Assays durchgeführt (Christensen *et al.*, 1985; O'Toole und Kolter, 1998; O'Toole, 2011; Zamora-Lagos *et al.*, 2018). Die 96-Well-Platten wurden zunächst zur Entfernung von planktonischen Zellen auf Papiertüchern trocken geklopft und mit H_2O_{UF} gewaschen. Anschließend wurden die Platten über Nacht vollständig getrocknet und am nächsten Tag mit 135 μ L einer 1 % (w/v) Kristallviolett-Lösung für 30 min gefärbt. Das überschüssige Kristallviolett wurde im Anschluss durch Klopfen der 96-Well-Platten auf Papiertücher und dem zweimaligen Waschen mit H_2O_{UF} entfernt. Es erfolgte wiederum ein Trocknungsschritt über Nacht. Am nächsten Tag wurden die einzelnen Vertiefungen der 96-Well-Platte jeweils in 135 μ L 30 % (v/v) Essigsäure rückgelöst und mittels Absorptionsmessung nach O'Toole (2011) bei 575 nm quantifiziert.

Die Messung erfolgte am Tecan Spark-Plattenlesegerät (Tecan Group Ltd.). Für jede getestete Bedingung wurden Triplikate angesetzt. Die Auswertung erfolgte anhand der in Tabelle 14 gelisteten Absorptionswerte. Die Wachstums- und Biofilm-Assays wurden von der AG Heermann am IMP der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Tabelle 14: Absorptionswerte für die Auswertung des Biofilm-Assays.

Absorption	Auswertung
0 – 0,2	keine Biofilmbildung
0,2 – 1	schwache Biofilmbildung
1 – 2	gute Biofilmbildung
2 – 4	sehr gute Biofilmbildung

2.6 Molekularbiologische Arbeiten

2.6.1 Nukleinsäuren-Präparation

2.6.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Pilzen

Für die Isolierung genomische DNA (gDNA) aus Pilzmyzel wurde zunächst eine Submerskultur des jeweiligen Organismus angesetzt (2.3.1). Die Kultivierung erfolgte in HMG-Medium bei RT und 120 Upm für ca. ein bis zwei Wochen. Bei optisch ausreichender Biomasse wurde das Kulturfiltrat (KF) vom Myzel mittels Vakuumfiltration über einen Büchnertrichter abgetrennt und das Myzel für mindestens 2 – 4 Stunden (h) bei -80°C gelagert. Nach vollständiger Gefrierung wurde das Myzel für 24 – 48 h gefriergetrocknet (Lyophilizer Alpha 1-4 LD, Martin Christ). Im Anschluss an die Lyophilisierung wurde das getrocknete Myzel unter Zugabe von flüssigem Stickstoff (N₂) gemörsert und mittels GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher™) die gDNA nach Herstellerangaben isoliert. Die Lagerung der gDNA erfolgte bei -20 °C.

2.6.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Pilzen mittels FastPrep™

Zur schnelleren gDNA-Isolierung wurde das Protokoll von Chi *et al.* aus dem Jahr 2009 abgewandelt durchgeführt. Dazu wurde Luftmyzel von einer gut bewachsenen Agarplatte steril entnommen und in ein mit Glasperlen und 500 µL Extraktionspuffer befüllten, 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Der nachfolgende Aufschluss erfolgte mittels FastPrep™ (MP Biomedical™) für drei Minuten (min) bei 4,5 m/s. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 5.000 Upm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein mit 200 µL Isopropanol *p.a.* befülltes Reaktionsgefäß überführt und vermischt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 10 min bei 12.000 Upm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % EtOH *p.a.* gewaschen. Zum Schluss wurde das Pellet für ca. 15 min bei 37 °C im Konzentrator getrocknet. Das Rücklösen der gefällten gDNA erfolgte dann mit 50 µL H₂O_{VE} oder TE-Puffer (2.1.6). Hier erfolgte die anschließende Lagerung der gDNA ebenfalls bei -20 °C.

2.6.1.3 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Nach Aufschluss der gDNA wurde eine Konzentrations- und Reinheitsbestimmung photometrisch mit dem NanoDrop® Lite (Thermo Fisher™) durchgeführt. Die Konzentration wird durch die Absorption bei $\lambda = 260$ nm gemessen und die Reinheit anhand des Quotienten der Absorption bei 260/230 bestimmt.

2.6.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation der ITS-Region

Für die Amplifikation der *internal transcribed spacer region* (ITS-Region), welche im Anschluss für die Identifizierung des Pilzes mittels ITS-Sequenzierung genutzt werden kann, wurde eine PCR mit der DreamTaq™ DNA-Polymerase und den Primern ITS1-F oder ITS4 und ITS5 (Tab. 16) durchgeführt. Die Annealing-Temperatur der Primer, die Reaktionsansätze sowie der Ablauf der PCR sind den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen.

PCR-Reaktionsansatz mit der DreamTaq™ DNA-Polymerase

DreamTaq™ Puffer (10 x)	5,0	µL
dNTP's (10 mM)	1,0	µL
Dioxigenin-11-dUTP alkali lable	1,0	µL
Primer forward (5 pmol/µL)	2,5	µL
Primer reverse (5 pmol/µL)	2,5	µL
Template-DNA (~ 100 ng)	x	µL
DreamTaq™ Polymerase	0,5	µL
H ₂ O _{PCR}	ad 50,0	µL

Tabelle 15: Ablauf der Three-Step PCR mit der DreamTaq™ DNA-Polymerase zur Amplifikation der ITS-Region. Gelistet sind die Temperaturen in Grad Celsius [°C], die Zeit in Sekunden [s] und die jeweilige Anzahl der Zyklen pro Reaktionsschritt.

Reaktionsschritt	Temperatur in [°C]	Zeit in [s]	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	30	34
Primer-Annealing	49	15	
Elongation	72	36	
Terminale Elongation	72	300	1

2.6.2.1 Primer zur Amplifizierung der ITS-Region

Die Oligonukleotide, die der nachfolgenden Tabelle 16 zu entnehmen sind, wurden von Eurofins MWG Operon synthetisiert (Reinheitsgrad: *High Purity Salt Free* (HPSF)) und im lyophilisierten Zustand versandt. Alle Primer wurden vor Verwendung mit H_2O_{PCR} gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/ μ L eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabelle 16: Oligonukleotide, welcher zur Amplifikation der ITS-Region mittels PCR verwendet worden sind. Angeben ist die zu amplifizierende Region, die Oligonamen sowie die Oligonukleotidsequenz in 5'-3'-Richtung.

Amplifikat	Oligoname	Sequenz (5' → 3')
ITS-Region	ITS-1-F_forward	CTTGGTCAT TAGAGGAAGTA
	ITS-5_forward	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG
	ITS-4_reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC

2.6.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Mittels gelelektrophoretischer Auftrennung der zuvor mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente können diese der Größe nach aufgetrennt werden. Dazu werden die DNA-Proben zunächst mit *Loading Dye* versetzt und anschließend in ein 1 %iges Agarosegel, angesetzt in 1x TAE-Puffer (2.1.6) und mit 40 μ L 1:20 verdünntem Midori Green Advance (Nippon Genetics Japan) pro 100 mL Agarose versetzt, überführt. Als DNA-Größenstandard wird der *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) mitgeführt. Bei einer Spannung von 80 – 120 V in einer Standard-Gelkammer (Biorad Laboratories, Inc) wurden die Proben aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die Darstellung und Dokumentation des Gels mit dem *Molecular Image[®] Gel Doc[™] XR+* (Biorad Laboratories, Inc) und dem Programm ImageLab[™]. Für die anschließende Aufreinigung der gewünschten DNA-Fragmente wurden diese mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag erfolgte dann die Aufreinigung des DNA-Fragments mit dem GeneJET[™] Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific). Im Anschluss wurde die aufgereinigte DNA zur Sequenzierung an Eurofins Genomics versendet.

3. Ergebnisse

Aromatische Grundbausteine sind essenziell für zahlreiche industrielle Produkte, wie z.B. Kunststoffe, Arzneimittel oder Chemikalien. Derzeit werden diese hauptsächlich aus fossilen Rohstoffen, wie z.B. Erdöl, hergestellt. Im Hinblick auf die begrenzte Verfügbarkeit und die negative Klimawirkung fossiler Ressourcen, gewinnt die Anwendung alternativer, biobasierter Rohstoffe, wie Lignin, zunehmend an Bedeutung in der Industrie und Wissenschaft (Isikgor und Becer, 2015). Lignin ist die weltweit am häufigsten vorkommende natürliche Ressource für aromatische Verbindungen. Dennoch wird Lignin, welches größtenteils bei der Herstellung von Papier und Zellstoff als Abfall- oder Nebenprodukt anfällt, kaum genutzt. So fallen jährlich in der Papier- und Zellstoffindustrie ca. 50 – 70 Millionen Tonnen lignolytischer Abfall an, wovon derzeit nur etwa 2 % recycelt und z.B. für die Herstellung von Klebstoffen, Dispersionsmitteln, Tensiden oder Duftstoffen, wie z.B. Vanillin, verwendet werden (Gosselink *et al.*, 2004; Tanase-Opedal *et al.*, 2019). Daher ist es von großem Interesse andere Abbau- bzw. Verwertungsmöglichkeiten für industrielle Ligninabfälle zu finden. Im Zuge dieser Arbeit wurde die biotechnologische Verwertung lignolytischer Industrieabfälle mittels filamentöser Pilze untersucht, um mögliche Kandidaten zu finden, die den industriellen Ligninabfall verwerten können. Gleichzeitig wurde auch nach parallel neu entstandenen phenolischen Substanzen gesucht und diese, falls vorhanden, isoliert, aufgereinigt, analysiert und biologisch charakterisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 180 verschiedene Pilzisolat (2.2.1), hinsichtlich der Verwertung industrieller Ligninabfälle untersucht. Die Organismen stammen größtenteils aus der Stammsammlung der AG Thines und des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF). Zusätzlich wurden auch neue Stämme aus Boden- oder Holzproben sowie Fruchtkörpern isoliert (2.2.3). Die verschiedenen Pilzstämme wurden zunächst in HMG-Flüssigkulturen vorkultiviert (2.3.1). Nach ca. einer Woche war ausreichend Biomasse vorhanden, sodass die Hauptkulturen bestehend aus dem definierten Minimalmedium (MM), Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (MM + LigS) und Minimalmedium mit Kraftlignin (MM + KL) angeimpft werden konnten (2.3.1.1). Das Magnesium-Lignosulfonat stammt aus der norwegischen Bioraffinerie Booregaard und das Kraftlignin von dem amerikanischen Unternehmen MeadWestvaco, beide wurden von der AG Waldvogel, Fachbereich Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, zur Verfügung gestellt (2.1.5). Nach zweiwöchiger Kultivierung wurde diese beendet und wie unter Abschnitt 2.3.2 beschrieben extrahiert. Von allen Proben wurde der Glukose- und pH-Wert bestimmt. Wie nachfolgend in Abbildung 7 beschrieben wurde der Rohextrakt (RE) anschließend mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bzw. HPLC mit Massenspektrometrie (HPLC-MS) analysiert (2.3.3).

Wobei insgesamt bei 50 verschiedenen Pilzstämmen neue Signale nach Abgleich der Chromatogramme mit den Kontrollen detektiert werden konnten. Im Anschluss daran wurde von diesen Rohextrakten die extrazelluläre Laccase- und Peroxidase-Aktivität mittels ABTS-Test (2.4.2) bestimmt. Wobei bei 15 Pilzstämmen eine Aktivität analysiert werden konnte. Diese 15 verschiedenen Pilzstämmen wurden mehrfach in den verschiedenen Medien kultiviert, wobei durch das Screening-Verfahren 6 verschiedene Pilzisolat detektiert werden konnten, die industrielle Ligninabfälle konstant verwerten können. Während der Fermentation dieser sind 11 neue aromatische Verbindungen detektiert worden, die mittels NMR weitestgehend in ihrer Struktur aufgeklärt und anhand von ersten Bioaktivitätstests charakterisiert wurden. Bei den Pilzstämmen handelt es sich um drei Basidiomyceten mit *Agrocybe pediades*, *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus pulmonarius* und um drei Ascomyceten mit *Alternaria alstroemeriae*, *Chaetomium leptoderma* und *Coniolaria hispanica*.

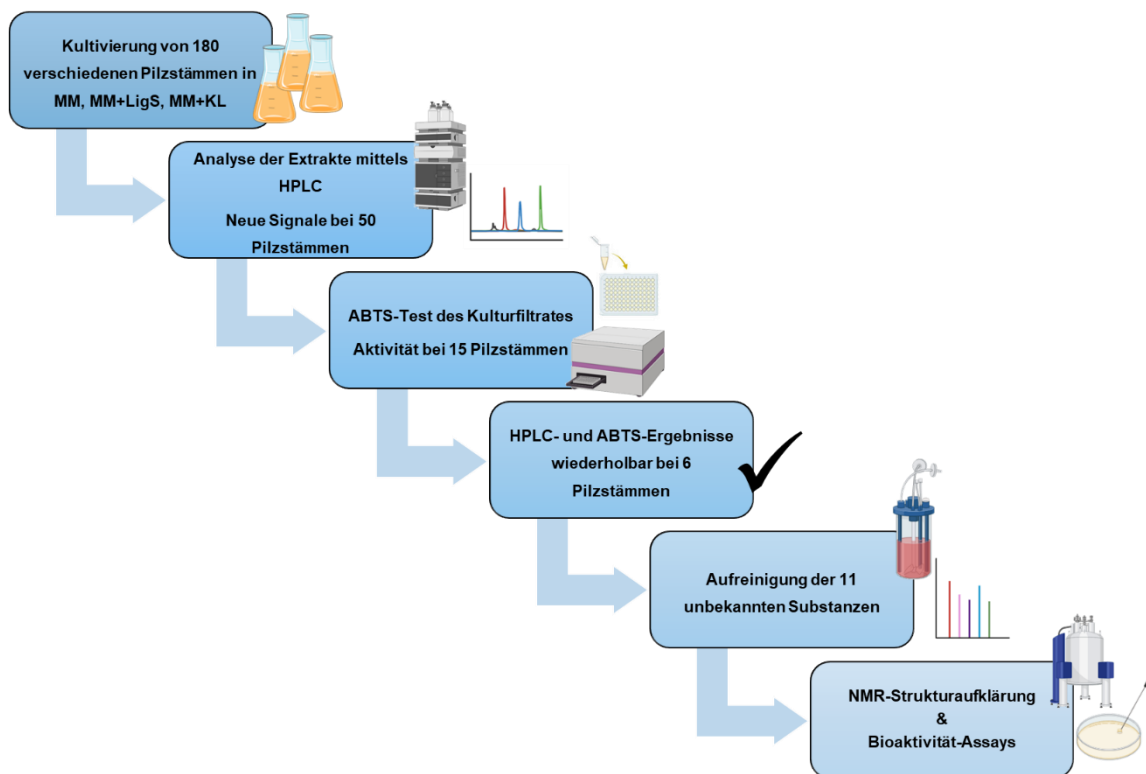


Abbildung 7: Darstellung des Ablaufs der im Verlauf dieser Arbeit angewandten Vorgehensweise. Erstellt mit BioRender.

3.1. Fermentation von *Agrocybe pediades* mit industriellem Ligninabfall

3.1.1. Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat und Isolierung neuer phenolischer Substanzen

Agrocybe pediades wurde während dieser Arbeit isoliert und morphologisch sowie molekularbiologisch charakterisiert (6.1). Nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (MM + LigS) wurde die Kultur nach Bestimmung des pH- und Glukosewerts beendet und vollständig mit Ethylacetat extrahiert (2.3.2). Der daraus resultierende Rohextrakt (RE) wurde im Anschluss mittels HPLC analysiert (2.3.3.1). Dabei konnte der Abbau des Magnesium-Lignosulfonats durch *A. pediades* beobachtet werden (Abb. 8). Die signifikanten Signale im Chromatogramm der Kontrolle MM + LigS fehlen in dem Chromatogramm des RE von *A. pediades* (Abb. 8). In dem RE hingegen ist ein neues Signal (Substanz P) bei einer Retentionszeit (Rt) von 14,5 min zu beobachten. Dieses Signal ist in keiner der Kontrollen, MM + LigS, MM oder *A. pediades* kultiviert in MM, detektierbar (6.2.1, Abb. 81). Das UV-Spektrum der Substanz P ist in Abbildung 9 zu sehen. Nach zweiwöchiger Kultivierung ist die freie Glukose im Medium verbraucht und der pH-Wert von 6,5 zu Beginn auf 4,62 am Ende gesunken. Des Weiteren konnte mittels ABTS-Test eine Laccase-Aktivität von 33 U/L gemessen werden. Eine Peroxidase-Aktivität war unter den gegebenen Bedingungen nicht messbar. Eine anschließende Messung mittels HPLC-MS ergab für das Signal bei Rt 14,5 min eine Masse von 330 m/z (Abb. 9). Ein Abgleich mit der Datenbank der AG Thines sowie des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF) ergab keine Übereinstimmung. Woraufhin eine 20 L Fermentation durchgeführt wurde, um die Substanz P im Anschluss mittels Strukturaufklärung identifizieren zu können.

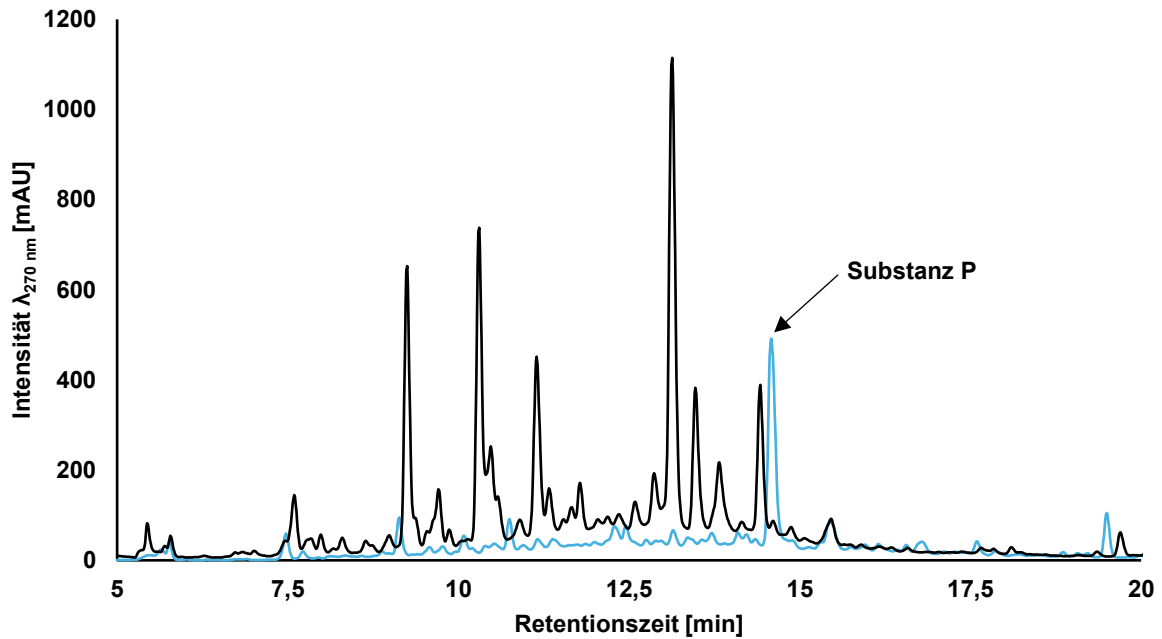


Abbildung 8: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurde Substanz P mit einer Retentionszeit von 14,5 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

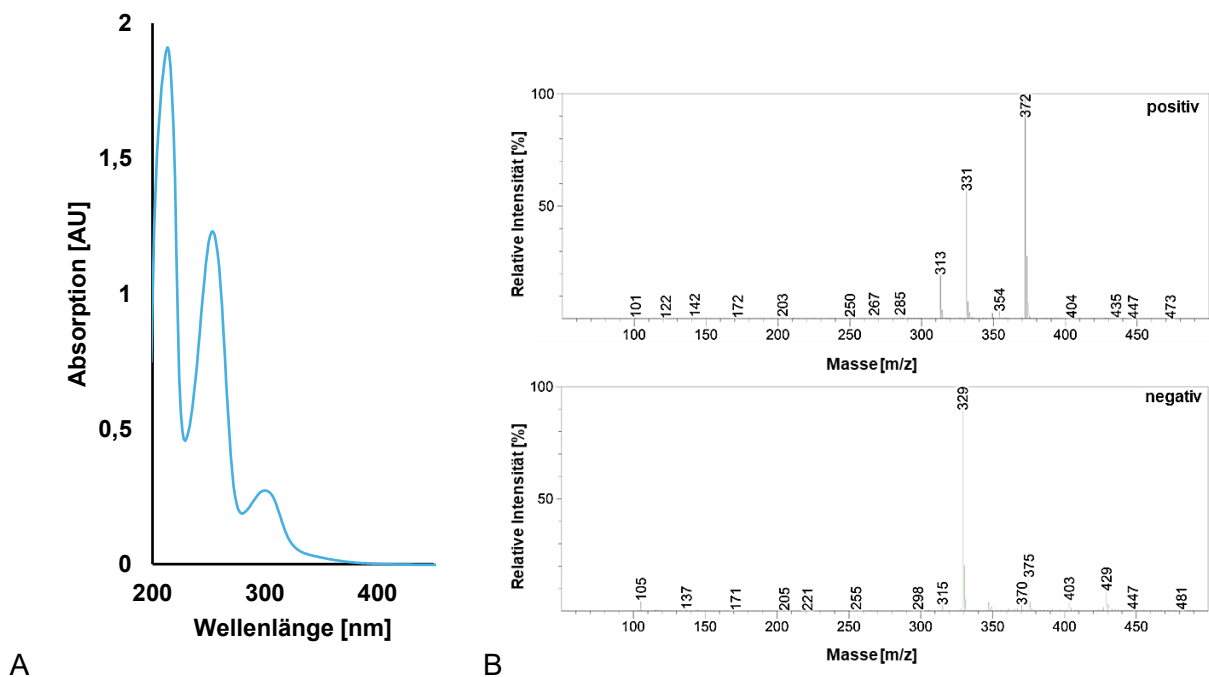


Abbildung 9: UV- (A) und Massenspektren (B) der Substanz P aus dem Rohextrakt von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat. Für Substanz P konnte eine Masse von 330 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) an der HPLC-MS aufgenommen.

Nach 14-tägiger Fermentation im 20 L Maßstab wurde die gesamte Kultur mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat extrahiert (2.3.2). Der daraus gewonnene RE wurde im Anschluss über eine Kieselgelchromatographie (2.3.2.1) weiter aufgetrennt, sodass danach die Fraktion 4, welche die Substanz P enthielt, mittels präparativer HPLC (2.3.3.2) weiter aufgereinigt werden konnte. Nachfolgend wurde die Probe am Fachbereich Chemie (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) mittels NMR-Spektroskopie untersucht (2.3.4). Hierbei konnte festgestellt werden, dass es sich bei der Substanz P, um zwei sehr ähnliche Substanzen handelt. Die in der AG Thines zur Verfügung stehenden Messmethoden detektierten immer nur eine Substanz. Nachfolgend werden die zwei Substanzen daher P1 und P2 genannt. Anhand der NMR-Analyse (6.4.1, Abb. 104 - 107) konnte die bereits zuvor analysierte Masse von 330 m/z für beide Substanzen bestätigt werden. Es handelt sich dabei um Derivate der Dehydroabietinsäure mit einer Summenformel von $C_{20}H_{26}O_4$. P1 konnte als 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure und P2 als 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure identifiziert werden. In der nachfolgenden Abbildung 10 sind die Strukturformeln von P1 und P2 zu sehen.

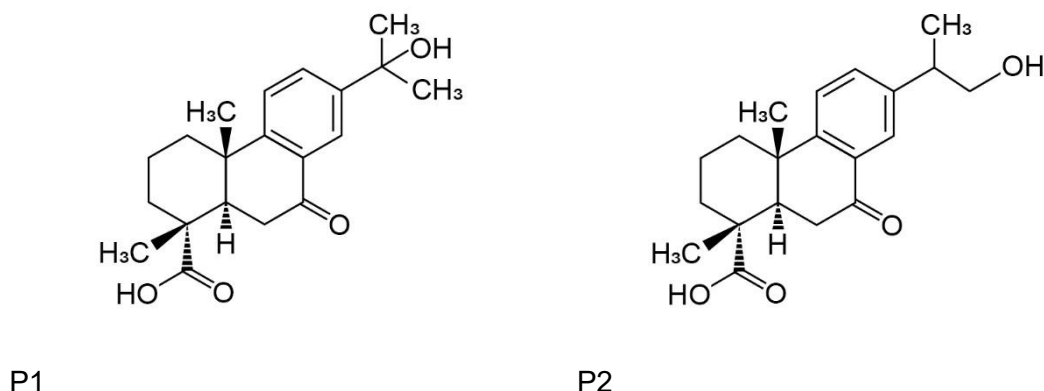


Abbildung 10: Chemische Struktur von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) aus der Fermentation von *Agrocybe pediades* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.

Die zwei Substanzen unterscheiden sich an der Hydroxygruppe, welche sich bei P1 an der Position C_{15} befindet und bei P2 an C_{16} . Aufgrunddessen, dass es sich bei P1 und P2 um Derivate der Dehydroabietinsäure (DHAA) handelt, wurde überprüft, ob die möglichen Ausgangsprodukte, DHAA und Abietinsäure (AA), in dem industriellen Magnesium-Lignosulfonat vorhanden sind. Die Reinsubstanzen wurden an der analytischen sowie HPLC-MS gemessen und mit dem Chromatogramm der Kontrolle, Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat, verglichen (Abb. 11 & 13). Die Abietinsäure wurde dafür kommerziell erworben und die Dehydroabietinsäure aufgrund des hohen Preises von der AG Waldvogel (Fachbereich Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) aus der von uns zur Verfügung gestellten Abietinsäure synthetisiert.

Nach Abgleich der Chromatogramme, wobei diese zur besseren Darstellung von AA und DHAA bei einer Wellenlänge von 250 nm dargestellt werden, konnte sowohl AA mit einer Retentionszeit von 24,8 min (Abb. 11) sowie DHAA mit einer Rt von 22,4 min (Abb. 13) in der Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat detektiert werden, jedoch nicht in Minimalmedium alleine (6.2.2, Abb. 88 & 89). In den Abbildungen 12 und 14 sind zudem die UV- und Massenspektren von AA und DHAA zu sehen.

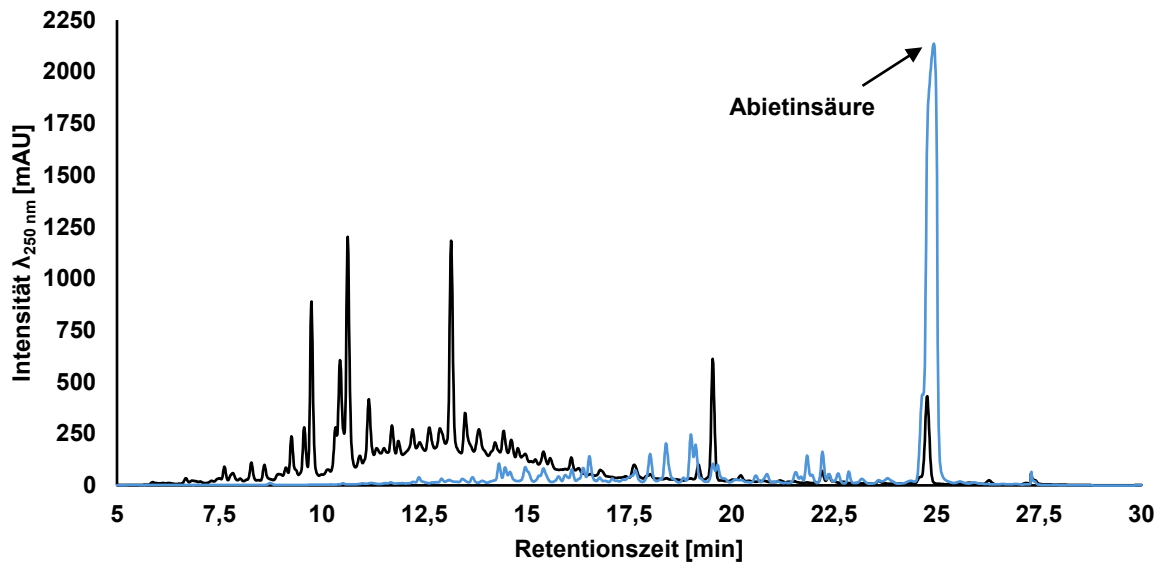


Abbildung 11: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Abietinsäure (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurde Abietinsäure mit einer Retentionszeit von 24,8 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 250 nm.

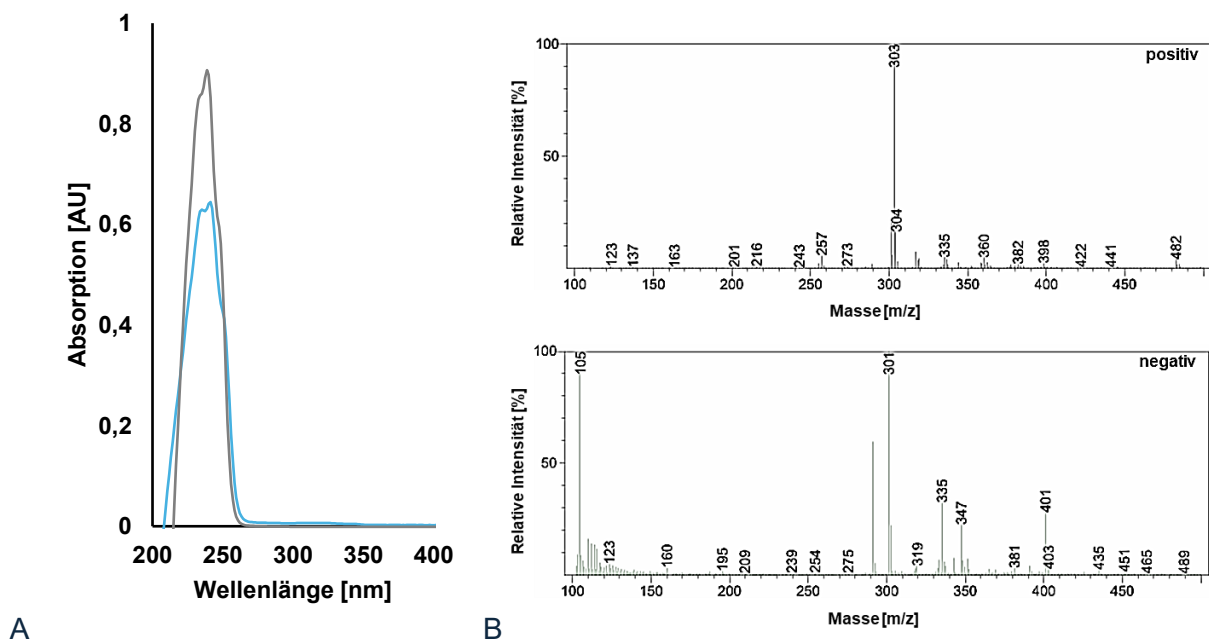


Abbildung 12: UV- (A) und Massenspektren (B) von Abietinsäure aus der Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Reinsubstanz (grau). Für Abietinsäure konnte eine Masse von 302 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

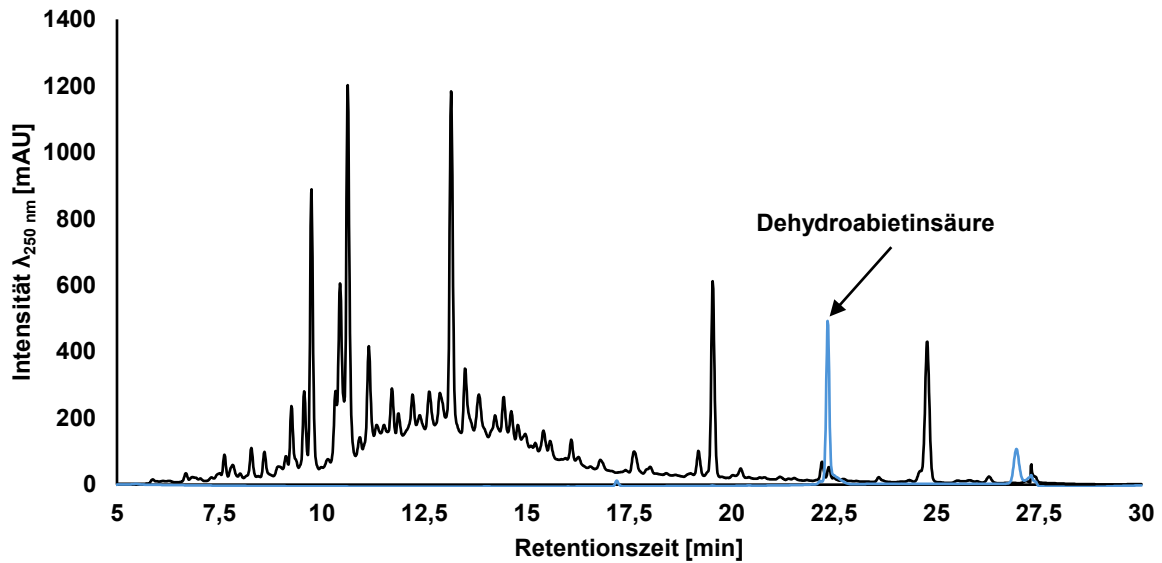


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Dehydroabietinsäure (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurde Dehydroabietinsäure mit einer Retentionszeit von 22,4 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 250 nm.

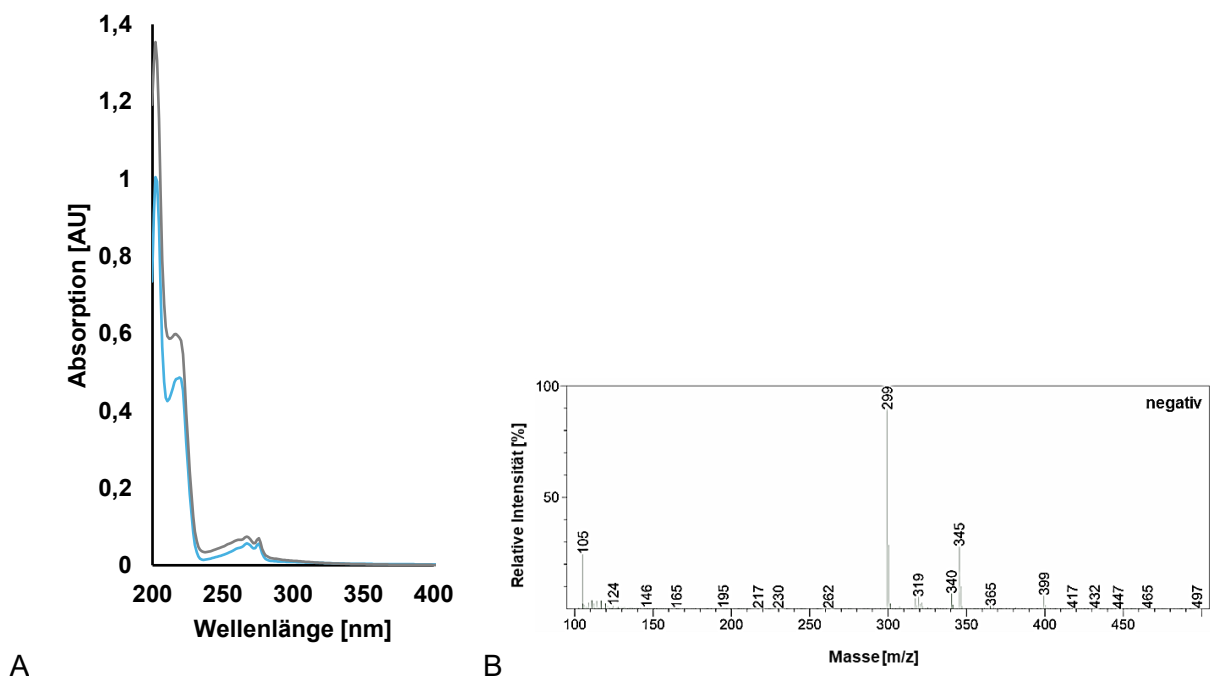


Abbildung 14: UV- (A) und Massenspektrum (B) von Dehydroabietinsäure aus der Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Reinsubstanz (grau). Für Dehydroabietinsäure konnte eine Masse von 300 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

3.1.1.1 Supplementierung potenzieller Vorstufen zur Bestätigung der Produktion von P1 und P2

Anhand der HPLC-Analyse, welche bestätigte, dass die möglichen Vorstufen, Abietinsäure (AA) und Dehydroabietinsäure (DHAA), der Substanzen P1 und P2 im industriellen Magnesium-Lignosulfonat vorhanden sind (Abb. 11 & 13), wurde *Agrocybe pediades* mit AA bzw. DHAA zusammen für 14 Tage in Minimalmedium kultiviert. Zunächst wurden 500 mL Minimalmedium separat in 1 L Schikanekolben autoklaviert sowie AA und DHAA in DMSO gelöst, sterilfiltriert und zugegeben. Durch die Zugabe von 5 mL einer 50 mM Stammlösung von AA bzw. DHAA wurde eine Endkonzentration von 0,5 mM AA bzw. DHAA erreicht. Als Kontrolle diente Minimalmedium mit 5 mL DMSO. In regelmäßigen Abständen wurde der pH- und Glukosewert überprüft, sowie die Laccase- und Peroxidase-Aktivität bestimmt (2.4.2). Dabei konnte festgestellt werden, dass über die gesamte Kultivierung hinweg, die freie Glukose im Medium bei beiden Ansätzen nicht aufgebraucht wurde. Bei der Kultivierung mit Abietinsäure stieg der pH-Wert von anfänglich 4,04 auf 4,36 bis Tag 7 und fiel danach wieder auf 4,13 bis Tag 14 ab. Während der Kultivierung mit Dehydroabietinsäure stieg der pH-Wert ebenfalls von zu Beginn 4,26 bis Tag 7 auf 4,51 an und fiel danach wieder auf 4,19 bis Tag 14 ab. Der zu Beginn so niedrige pH-Wert kam durch die Zugabe von AA und DHAA. Laccase- oder Peroxidase-Aktivität konnte nicht detektiert werden.

Im Kultivierungsansatz mit DHAA konnten bereits ab Tag 3 die Substanzen P1 und P2 mittels HPLC detektiert werden, im Ansatz mit AA hingegen erst ab Tag 7. Insgesamt produzierte *A. pediades* während der Kultivierung mit DHAA ca. doppelt so viel P1 und P2 (0,57 g/mL) als während der Kultivierung mit AA (0,33 g/mL) (Abb. 15). Im Anhang in den Abbildungen 82 und 83 (6.2.1) sind die Chromatogramme mit allen Kontrollen (MM + AA bzw. MM + DHAA, MM + DMSO, *A. Pediades* kultiviert in MM + DMSO) abgebildet.

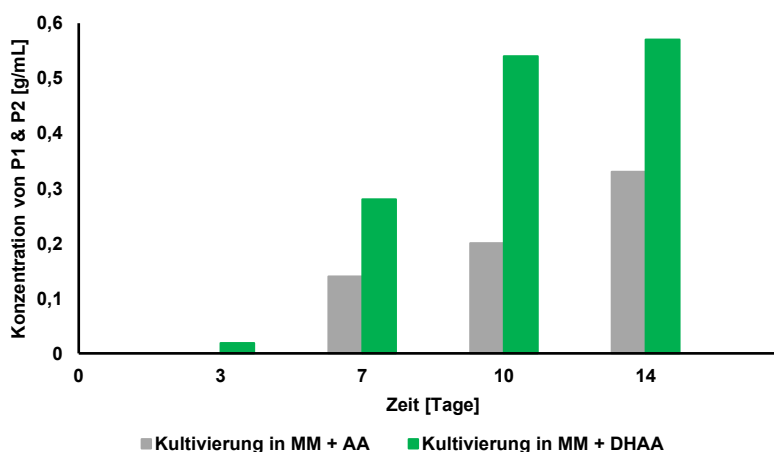


Abbildung 15: Konzentration von P1 und P2 während der Kultivierung von *Agrocybe pediades* in Minimalmedium mit Abietinsäure im Vergleich zur Kultivierung in Minimalmedium mit Dehydroabietinsäure über einen Zeitraum von 14 Tagen. Angegeben ist die Konzentration der Substanzen P1 und P2 in g/mL über einen Zeitraum von 14 Tagen nach Kultivierungsbedingung. Grau: Kultivierung in Minimalmedium mit Abietinsäure (MM + AA), grün: Kultivierung in Minimalmedium mit Dehydroabietinsäure (MM + DHAA).

3.1.2 Fermentation mit Kraftlignin

Agrocybe pediades wurde ebenfalls in Minimalmedium mit Kraftlignin (MM + KL) kultiviert. Nach 14-tägiger Kultivierung konnte der Abbau des Kraftlignins anhand des analysierten RE im Vergleich zu den Kontrollen (MM + KL, MM und MM inokuliert mit *A. pediades*) beobachtet werden (6.2.1, Abb. 84). Dabei konnte ein Signal bei Rt 14,6 min detektiert werden (Abb. 16). Anhand des Abgleichs des UV-Spektrums sowie der Masse (Abb. 17) konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem Signal ebenfalls um die Substanzen P1 und P2 handelt, wie bei dem Signal bei Rt 14,5 min aus der Kultivierung mit MM + LigS.

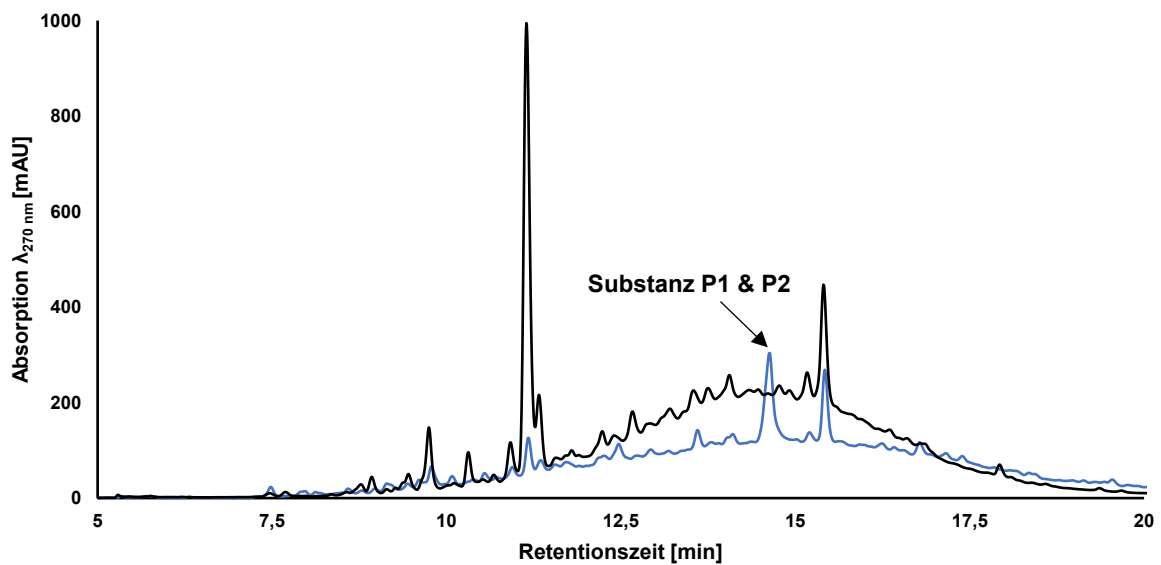


Abbildung 16: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,6 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

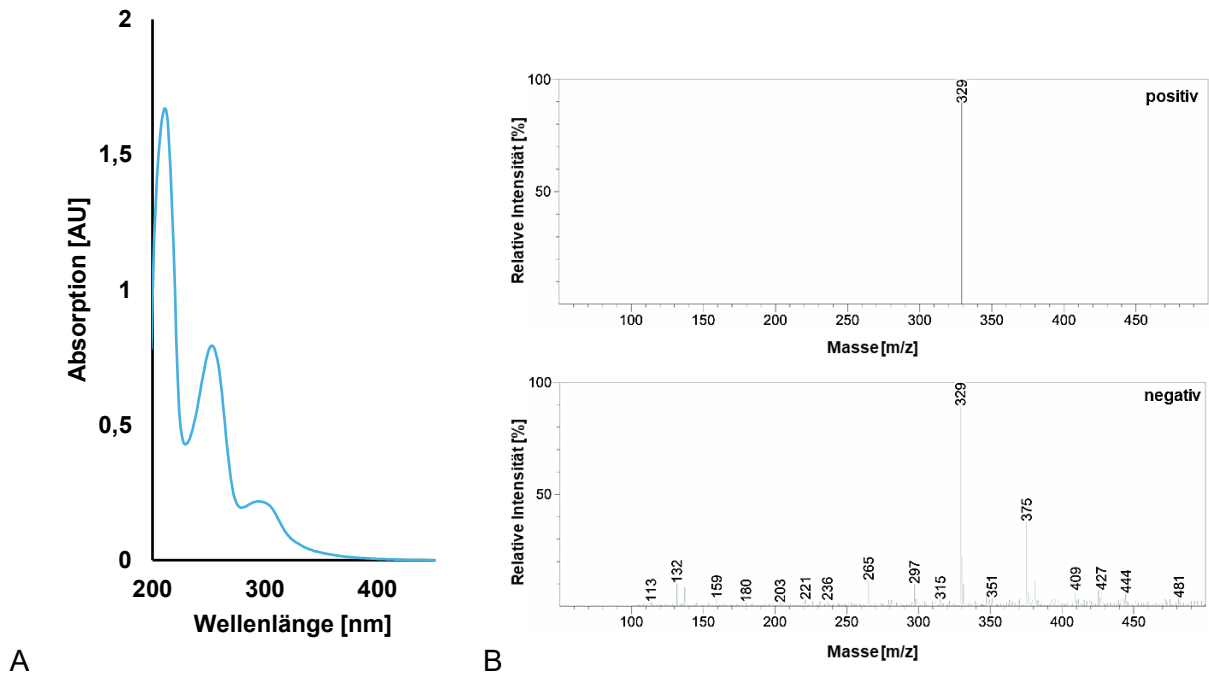


Abbildung 17: UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz P1 und P2 aus dem Rohextrakt von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin. Für die Substanzen P1 und P2 konnte eine Masse von 330 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

3.1.3 Fermentations-Monitoring sowie quanti- und qualitative Enzym-Assays

Um feststellen zu können wieviel von den Substanzen 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) von *Agrocybe pediades* in MM + LigS produziert wurde und um das dafür potenziell zuständige Enzym besser charakterisieren zu können wurde ein Fermentationsverlauf über 14 Tage durchgeführt (Abb. 18). Dazu wurde eine 2,5 L Fermentation angesetzt, von der täglich eine 150 mL Probe entnommen und der pH- und Glukosewert, die Konzentration der neu entstandenen Substanzen sowie die Enzymaktivität der extrazellulären Laccasen und Peroxidasen im Kulturfiltrat (KF) analysiert wurde. Dabei konnte beobachtet werden, dass der pH-Wert, wie in Abbildung 18 zu sehen, über die Kultivierungszeit hinweg sich nicht maßgeblich veränderte und insgesamt im sauren Bereich blieb. Die freie Glukose im Medium war bereits nach 2 Tagen verbraucht. Ebenfalls nach 2 Tagen konnten bereits die Substanzen P1 und P2 mittels HPLC-Analyse detektiert werden. Die Menge an P1 und P2 schwankte über die Zeit. Zunächst stieg die Menge bis Tag 4 auf 4,6 mg/L, um dann im Anschluss bis Tag 9 auf 1,4 mg/L zu fallen. Danach stieg sie wieder auf 2,6 mg/L an, um dann wieder auf 1 mg/L an Tag 12 abzufallen. Ein zweites Maximum von 4,3 mg/L war am letzten Tag der Fermentation zu beobachten. Die hohe Laccase-Aktivität von 33 U/L während der ersten Kultivierung (3.1.1) konnte nicht nochmal beobachtet werden.

Innerhalb der ersten vier Tage konnte nur Peroxidase-Aktivität mit einem Höhepunkt von 6,2 U/L an Tag 4 gemessen werden, wobei an diesem Tag auch die größte Menge an P1 und P2 vorlag. An Tag 5 und 6 hingegen wurden Laccase-Aktivitäten von 11,4 U/L und 6,2 U/L gemessen, wobei die Menge an P1 und P2 wieder abnahm. An Tag 7 wiederum konnte mit 10,2 U/L wiederum eine höhere Peroxidase-Aktivität gemessen werden, die am nachfolgenden Tag jedoch nicht mehr detektiert werden konnte und stattdessen eine Laccase-Aktivität von 1,5 U/L gemessen wurde. Danach konnte nur noch Peroxidase-Aktivität mit einem Höhepunkt von 25,4 U/L an Tag 11 gemessen werden. Am letzten Tag, wo ein zweites Maximum an P1 und P2 vorlag, konnte weder Laccase- noch Peroxidase-Aktivität gemessen werden.

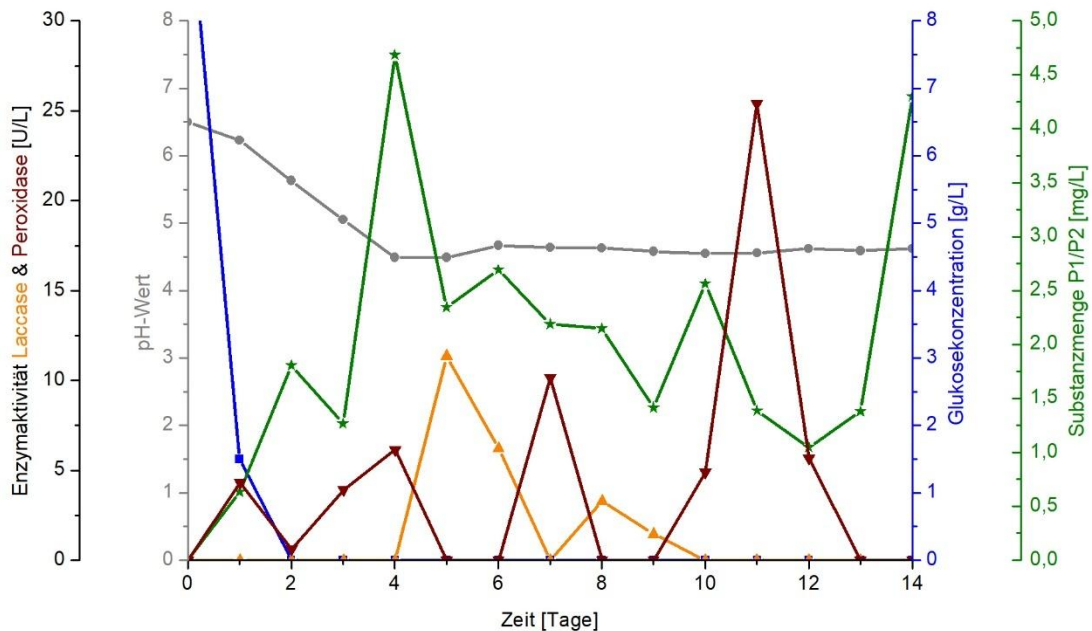


Abbildung 18: Fermentationsverlauf von *Agrocybe pediades* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab. Abgebildet sind die pH-Werte (grau), die Glukosekonzentration in g/L (blau), die Substanzmenge von P1 und P2 in mg/L (grün) sowie die Laccase- (orange) und Peroxidase-Aktivität (dunkelrot) in U/L. Erstellt mit Origin 7.5.

3.1.3.1 Qualitativer Nachweis extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme

Um die Aktivität noch anderer am extrazellulären Ligninabbau beteiligten Enzyme, wie z.B. die Polyphenoloxidasen oder die Lignin- bzw. Manganabhängigen Peroxidasen, nachweisen zu können, wurde ein qualitativer Enzymtest auf Agarplatten nach Pointing (1999) durchgeführt. Das dafür verwendete *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen, für die jeweiligen Enzyme charakteristischen Substraten, versetzt (2.1.7). Die Entfärbung von Poly R impliziert die Anwesenheit von Polyphenoloxidasen sowie Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Die Verfärbung von ABTS weist die Aktivität von Laccasen nach und die Entfärbung des Azur B Lignin- und Manganabhängige Peroxidasen. Für den Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen wurden LBM-Platten mit Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) versetzt. Alle Platten wurden mit gleichgroßen Stücken von *Agrocybe pediades* inokuliert und anschließend für 10 Tage bei 25 °C inkubiert (2.4.1). Nach der Inkubationszeit konnte, wie in Abbildung 19 zu sehen, im Vergleich zur Negativkontrolle, *Penicillium steckii* IBWF 104-06, eine starke gelbliche Verfärbung der LBM-Poly R-Platte beobachtet werden. Das *A. pediades* Laccase-Aktivität hat, zeigt die grün-blaue Verfärbung der LBM-ABTS-Platte. Auf der LBM-Platte versetzt mit Azur B ist eine sehr geringe Aufhellung der Platte, so groß wie das Pilzwachstum, zu sehen. Wiederum sehr stark entfärbt waren die Platten mit LigS und KL zum Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen.

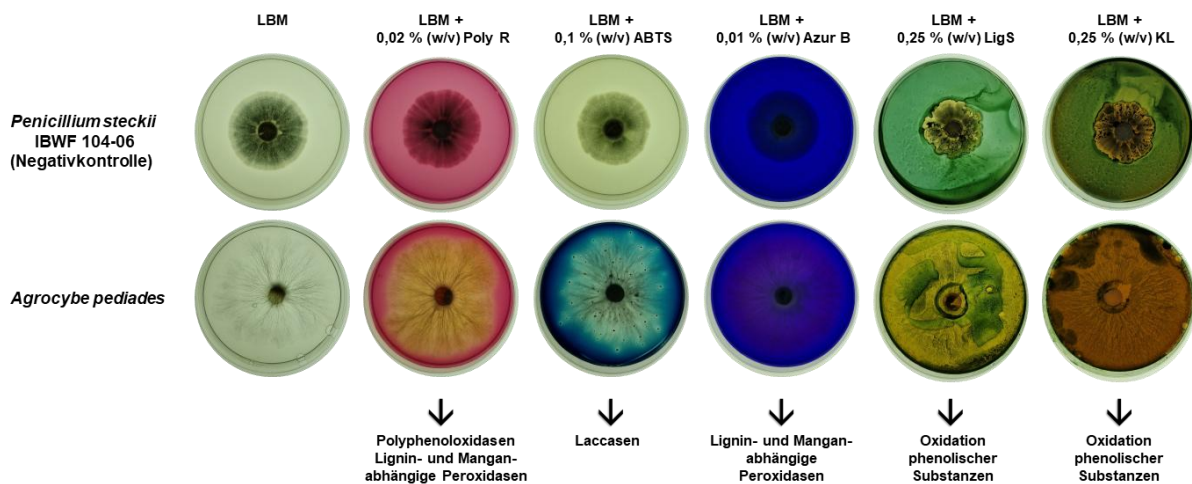


Abbildung 19: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Agrocybe pediades*. *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen Substraten versetzt und mit *A. pediades* inokuliert, um extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme nachzuweisen. Die Entfärbung von Poly R weist Polyphenoloxidasen und Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen nach. Die Verfärbung von ABTS weist Laccasen nach und die von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen. Zum Nachweis der Oxidation phenolischer Komponenten wurden Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) verwendet. Als Wachstumskontrolle wurde eine LBM-Platte ohne Zusätze inokuliert und als Negativkontrolle wurde *Penicillium steckii* IBWF 104-06 mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über 10 Tage bei RT. Angesetzt in Triplikaten.

3.1.3.2 Analyse der Laccase-Aktivität während der Produktion von P1 und P2

Aufgrund der detektierten hohen Laccase-Aktivität während der Fermentation mit LigS (3.1.1) sowie beim qualitativen Enzymtest (3.1.3.1, Abb. 19), wurde vermutet, dass bei der Produktion von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) Laccasen beteiligt sein könnten. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst nach einem Medium gesucht, indem *Agrocybe pediades* ebenfalls eine hohe Laccase-Aktivität aufwies, um mit den dabei produzierten extrazellulären Enzymen arbeiten zu können. Während der Kultivierung in Soja-Medium konnte die höchste Aktivität von 28 U/L nach 8 Tagen gemessen werden. Für den weiteren Versuch wurde *A. pediades* daher für 8 Tage in Soja-Medium vorkultiviert. Anschließend wurde das Myzel vom Kulturfiltrat mittels Vakuumfiltration getrennt, um mit den sekretierten Enzymen weiterzuarbeiten. Mittels ABTS-Test (2.4.2) konnte für das KF eine Laccase-Aktivität von 40 U/L gemessen werden. Dieses wurde sterilfiltriert und mit LigS (c_{end} : 10 g/L) versetzt und für weitere 48 h inkubiert. Parallel dazu wurde zur Kontrolle auch das Myzel mit LigS versetzt. Bereits nach 24 h konnten in beiden Ansätzen die Substanzen P1 und P2 mittels HPLC-Analyse detektiert werden (Abb. 20). Die Laccase-Aktivität des Kulturfiltrat-Ansatzes hatte nach 24 h eine Aktivität von 36 U/L.

Zahlreiche Wiederholungen dieses Versuchs blieben ohne Ergebnis, sodass weitere Enzym-Tests durchgeführt worden sind, um die während der Produktion von P1 und P2 beteiligten Enzyme identifizieren zu können.

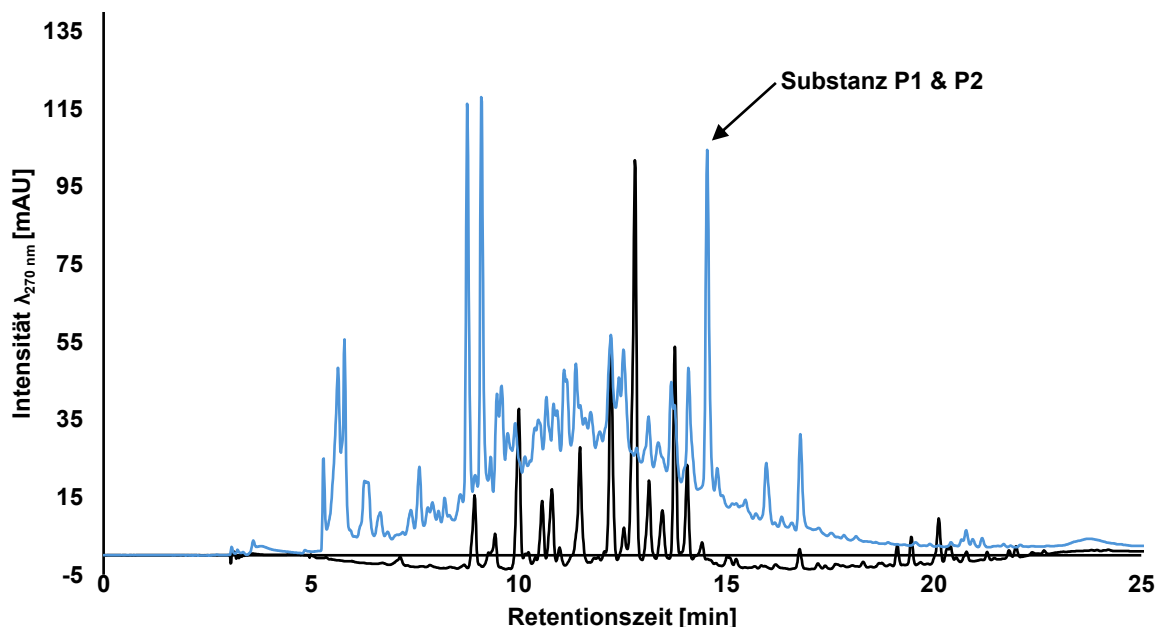


Abbildung 20: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 24-stündiger Kultivierung des Kulturfiltrates der einwöchigen Soja-Vorkultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Sojamedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

3.1.3.3 Analyse der Peroxidase-Aktivität während der Produktion von P1 und P2

Um eine Beteiligung der Peroxidasen, wie z.B. den am Ligninabbau beteiligten Mangan- oder Ligninperoxidasen, an den von *Agrocybe pediades* während der Kultivierung mit LigS produzierten Substanzen, 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2), zu bestätigen bzw. ausschließen zu können, wurde ein Katalase-Assay durchgeführt. Katalasen spalten das für die Peroxidasen zur Reaktion notwendige Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O), sodass diese nicht mehr funktionsfähig sind (Stellmach, 1988). Zur Durchführung dieses Experiments wurden zunächst zwei 1 L Schikanekolben, befüllt mit 500 mL HMG-Medium, mit *A. pediades* inokuliert und für 7 Tage vorkultiviert (2.3.1). Anschließend wurden beide mit LigS (c_{end} : 10 g/L) versetzt. Der eine Kolben enthielt zusätzlich noch Katalase, wobei zweimal täglich 100 mg Katalase zugegeben wurden, um das von *A. pediades* produzierte Wasserstoffperoxid zu spalten. Dies wurde vier Tage lang durchgeführt. Bereits nach 24 h konnte P1 und P2 mittels HPLC-Analyse in beiden Ansätzen detektiert werden (Abb. 21). Auch in den nachfolgenden Tagen, konnte trotz regelmäßiger Zugabe von Katalase, P1 und P2 detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

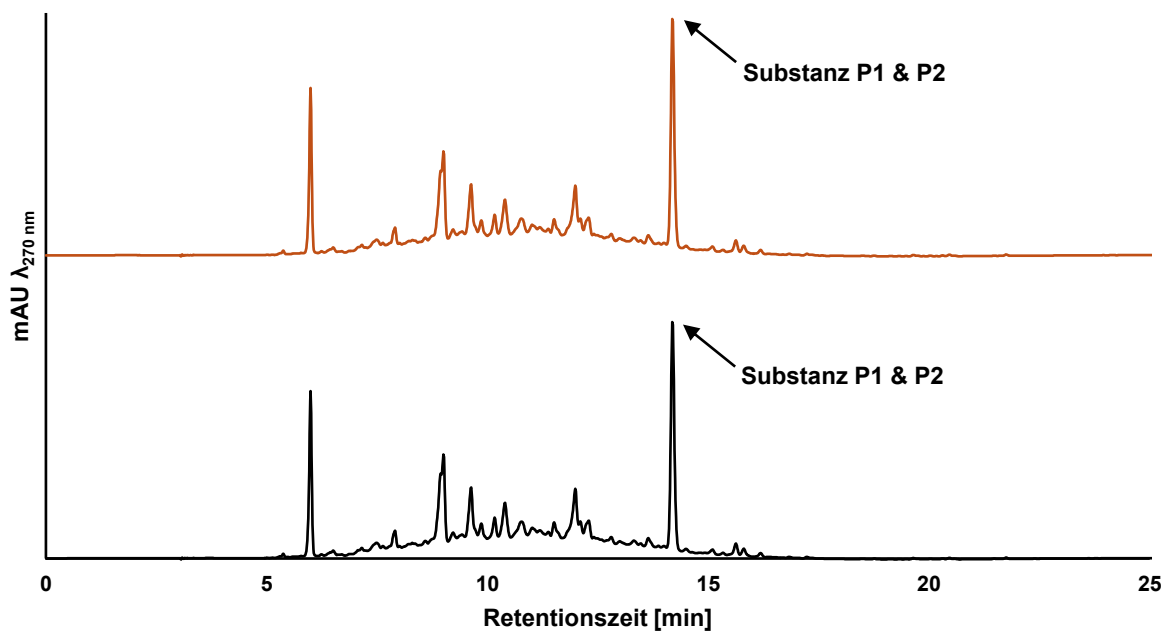


Abbildung 21: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 24-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zur Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat unter Zugabe von Katalase (orange). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 min in beiden Ansätzen. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

3.1.3.4 Analyse der Peroxygenase-Aktivität während der Produktion von P1 und P2

Die Biotransformation von Abietinsäure bzw. Dehydroabietinsäure zu 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2), welche bei der Kultivierung von *Agrocybe pediades* in MM + LigS detektiert wurde, könnte auch durch eine unspezifische Peroxygenase (UPO) katalysiert worden sein. UPOs sind extrazelluläre Monooxygenasen, welche ein Sauerstoffatom (O_2) von dem Co-Substrat Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf das Zielsubstrat übertragen, ganz gleich ob es sich dabei beispielsweise um eine Epoxidierung, Dealkylierung oder Hydroxylierung handelt (Hofrichter und Ullrich, 2006; Hofrichter *et al.*, 2015). Für den Peroxygenase-Assay wurde das Kulturfiltrat (KF) aus einer Kultivierung mit LigS mit 5-nitro-1,3-benzodioxol (NBD) versetzt und photometrisch bei 425 nm gemessen (2.4.4). Alle Tagesproben des 14-tägigen Fermentationsverlaufs von *A. pediades* wurden analysiert. Zur Kontrolle wurde außerdem das KF der *Magnaporthe oryzae* Expressionsmutante *Mo::AaeUPO* (2.2.1) mitgeführt (Jacob *et al.*, 2021). Dabei konnte im Vergleich zur Kontrolle, welche eine Aktivität von 2050 U/L aufwies, keine Aktivität bei *Agrocybe pediades* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3.5 Analyse der P450-Monooxygenase-Aktivität während der Produktion von P1 und P2

Da der Peroxygenase-Assay negativ ausgefallen war, wurde untersucht, ob während der Produktion von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2), welche bei der Kultivierung von *A. pediades* in MM + LigS entstehen, eine P450-Monooxygenase aktiv ist. Dazu wurden zunächst zwei HMG-Vorkulturen von *A. pediades* angesetzt und für mindestens eine Woche vorkultiviert (2.3.1). Im Anschluss wurde eine der beiden Kulturen mit Kohlenstoffmonoxid (CO) versetzt, was dazu führt, dass das aktive Zentrum des Enzyms blockiert ist und somit keine Enzymaktivität vorliegt (Durairaj *et al.*, 2016; Omura und Sato, 1964). Beide Submerskulturen wurden danach mit LigS (C_{end} : 10 g/L) versetzt und für drei Tage bei RT inkubiert. Nach 24 und 72 h wurde jeweils eine 50 mL Tagesprobe entnommen, extrahiert und mittels HPLC analysiert (2.3.2 & 2.3.3.1). Dabei konnte sowohl nach 24 h wie in der Abbildung 22 zu sehen, als auch nach 72 h kein Unterschied zwischen der Probe, welche zuvor mit CO versetzt wurde und der Kontrollprobe (ohne CO) beobachtet werden. In allen Proben konnten die Substanzen P1 und P2 detektiert werden (6.2.1, Abb. 85 – 87).

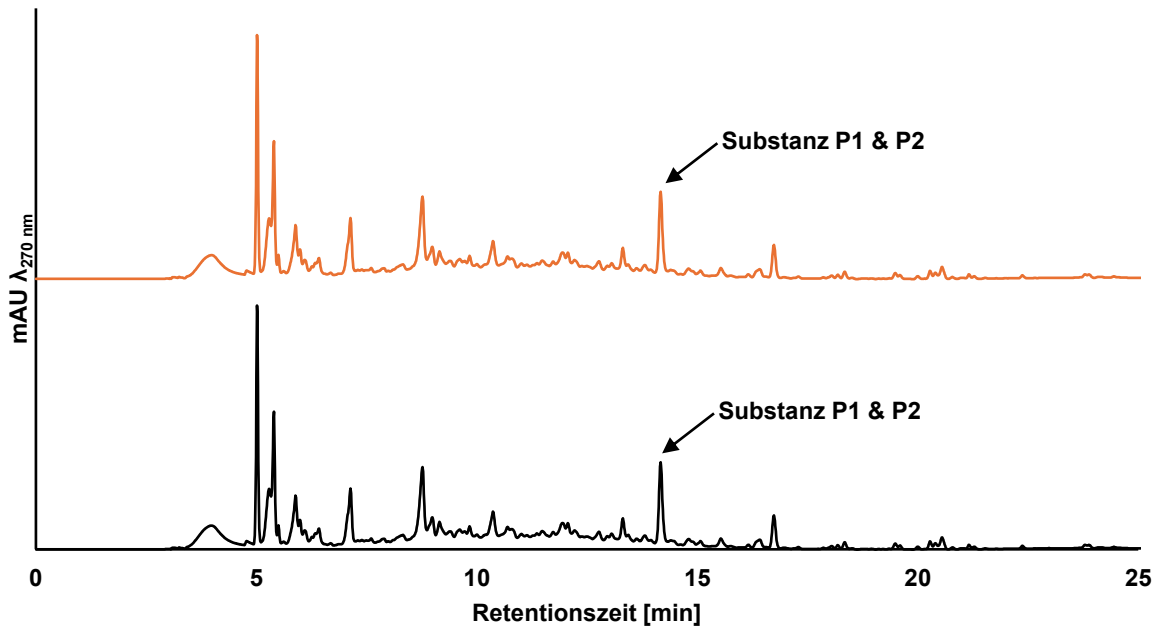


Abbildung 22: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 24-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zur Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat unter Zugabe von Kohlenmonoxid (orange). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 min in beiden Ansätzen. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

3.1.4 Biologische Charakterisierung der Substanzen P1 und P2

Zur biologischen Charakterisierung der von *Agrocybe pediades* bei der Fermentation mit LigS produzierten Substanzen 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) wurden diese gegenüber verschiedenen Organismen, wie z.B. Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Humanzellen, getestet. Dazu wurde zunächst ein Agardiffusionstest (2.5.1) durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte ein Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest (2.5.2) am Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF), ein Biofilm-Assay (2.5.4) durchgeführt von der AG Heermann am IMP der Johannes Gutenberg-Universität Mainz sowie ein Toxizitäts-Assay (2.5.3) gegenüber Humanzellen am IBWF und an der Universitätsmedizin Mainz.

3.1.4.1 Agardiffusionstest gegenüber Bakterien und Pilzen

Zum Nachweis möglicher antibiotischer bzw. antimykotischer Aktivität wurden P1 und P2 zunächst gegenüber den Organismen *Bacillus brevis*, *Enterobacter dissolvens*, *Micrococcus luteus*, *Mucor miehi*, *Nematospora coryli*, *Penicillium notatum* und *Paecilomyces variotii* auf eine Wachstumsinhibition dieser getestet. Dazu wurden P1 und P2 in MeOH *p.a* gelöst, auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und auf die Filterrondelle, welche zuvor auf den verschiedenen Testplatten platziert wurden, aufgetragen (2.5.1). Nach einer Inkubation von 24 – 48 h bei dem entsprechenden Temperaturoptimum des jeweiligen Organismus (2.2.2) erfolgte die Auswertung. Dabei konnte keine Aktivität gegenüber den oben genannten Testorganismen beobachtet werden.

3.1.4.2 Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest gegenüber Pilzen, Oomyceten und Pflanzen

Zur Testung möglicher keimungs- und wachstumsinhibierender Wirkung der Substanzen P1 und P2 gegenüber den Organismen *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Phytophthora infestans* sowie *Setaria italica* und *Lepidium sativum* wurden diese zunächst in MeOH *p.a* oder EtOH *p.a* rückgelöst, auf die jeweilige Konzentration eingestellt und dann in die Vertiefungen der Well-Platten vorgelegt (2.5.2). Nach Evaporation des Lösungsmittels wurden die entsprechenden Sporen- bzw. Konidiensuspensionen (Tab. 13) oder die jeweiligen Pflanzensamen hinzugefügt und anschließend bis zur Auswertung bei dem jeweiligen Temperaturoptimum inkubiert (2.2.2). Es konnte keine Aktivität gegenüber den oben genannten Testorganismen beobachtet werden.

3.1.4.3 Toxizitäts-Assay gegenüber Zellen

Um die Substanzen P1 und P2 auf eine mögliche toxische Aktivität gegenüber Humanzellen zu testen, wurden diese am IBWF gegenüber HeLa S3 Zellen getestet. P1 und P2 wurden in DMSO rückgelöst, auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und zu den Zellen zugegeben (2.5.3). Nach 72-stündiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auswertung. Für P1 und P2 konnte keine Aktivität festgestellt werden.

Des Weiteren wurde die Zellebensfähigkeit von VH10tert, HepG2 und RPE-1 Zellen nach Behandlung mit P1 und P2 als Reinsubstanzen, dem Gemisch P1 & P2 sowie den Ausgangsstoffen, Abietinsäure (AA) und Dehydroabietinsäure (DHAA), indirekt über die metabolische Aktivität mittels MTT-Assay bestimmt (2.5.3). Dies wurde am Institut für Toxikologie an der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt (Abb. 23). Bei der Durchführung des MTT-Assays mit den RPE-1 Zellen konnte gemessen werden, dass DHAA mit einem ED50 von 241 μM am stärksten toxisch von allen getesteten Substanzen war. Unmittelbar danach folgte AA mit einem ED50 von 479 μM . Am wenigsten toxisch war das Gemisch P1 & P2 mit einem Wert von 2465 μM . Etwas toxischer, aber immer noch gering im Vergleich zu AA und DHAA, waren P1 mit einem ED50 von 1560 μM und P2 mit einem ED50 von 1206 μM .

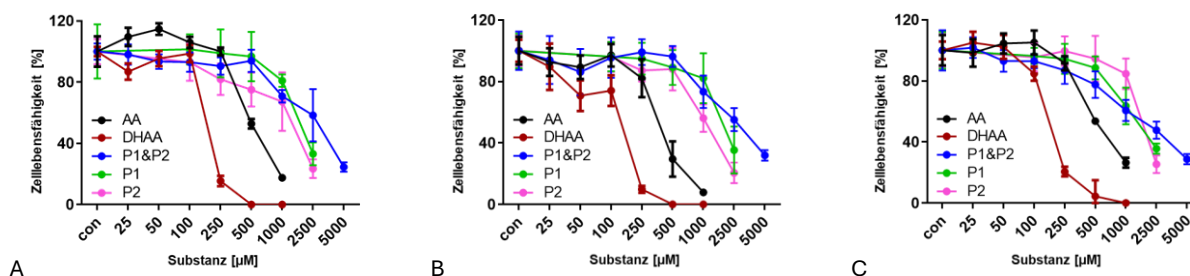


Abbildung 23: Auswertung des MTT-Assays der Zelllinien RPE-1 (A), HepG2 (B) und VH10tert (C). Getestet wurden folgende Substanzen in Triplikaten: Abietinsäure (AA), Dehydroabietinsäure (DHAA), P1 (15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure), P2 (16-hydroxy-7-oxo-Dehydro-abietinsäure) sowie das Gemisch P1 & P2. Der ED50 Wert wurde mit dem *Quest Graph™ ED50 Calculator* berechnet.

Der mit der Zelllinie HepG2 durchgeführte MTT-Assay ergab ähnliche Ergebnisse, wie der zuvor mit der Zelllinie RPE-1 durchgeführte Assay. Auch hier war am stärksten toxisch mit einem ED50 von 167 μM die DHAA, gefolgt von der AA mit einem ED50 von 394 μM . P1 hatte einen ED50 von 1082 μM und P2 von 1203 μM . Das Gemisch war wiederum am schwächsten toxisch mit einem ED50 von 2438 μM . Bei der Auswertung des MTT-Assays mit den VH10tert Zellen fiel auf, dass das Gemisch P1 & P2, welches zuvor immer am schwächsten toxisch war, zwar weiterhin am schwächsten toxisch blieb, jedoch der ED50 mit 1751 μM sich nur wesentlich von den Reinsubstanzen P1 (1631 μM) und P2 (1604 μM) unterschied. Am stärksten toxisch war wiederum DHAA mit einem ED50 von 155 μM gefolgt von AA mit 525 μM .

3.1.4.4 Wachstums- und Biofilm-Assay

Für den Nachweis einer inhibitorischen Aktivität gegenüber verschiedenen Biofilmen wurden die Reinsubstanzen 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) zunächst zusammen in MeOH *p.a* gelöst und auf Konzentrationen von 10 µM, 1 µM und 100 nM eingestellt. Im Anschluss übernahm die AG Heermann am IMP der Johannes Gutenberg-Universität Mainz die Durchführung des Biofilm-Assays (2.5.4). Dabei konnte beobachtet werden, dass sich das Wachstumsverhalten bei beiden *P. aeruginosa* Stämmen trotz Zugabe von P1 und P2 ähnlich zu dem der Kontrollen (6.5.1, Abb. 120) verhielt. In Bezug auf die Biofilmbildung konnte keine inhibitorische bzw. reduzierende Wirkung detektiert werden. Bei *Pseudomonas aeruginosa* PA 01 DSM 19880 konnte mit 104 % nahezu keine Zunahme im Vergleich zur Kontrolle (*P. aeruginosa* PA 01 DSM 19880 kultiviert in TSB-Medium) detektiert werden (6.5.2, Abb. 126). Bei *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 DSM 19982 wurde mit 249 % mehr als eine Verdopplung des Biofilms detektiert (6.5.2, Abb. 127). Aufgrund des gemessenen Absorptionswerts von 0,54 (OD₅₇₅) ist dies jedoch, unter Berücksichtigung der in Tabelle 14 (2.5.4) gelisteten Werte, als schwache Biofilmbildung einzustufen.

3.2 Fermentation von *Alternaria alstroemeriae* mit industriellem Ligninabfall

3.2.1. Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat und Isolierung einer neuen phenolischen Substanz

Alternaria alstroemeriae stammt aus der Stammsammlung der AG Thines und wurde zuvor isoliert und molekularbiologisch sowie morphologisch charakterisiert (6.1). Im Gegensatz zu *A. pediades* handelt es sich bei *A. alstroemeriae* um einen Ascomyceten, welche in der Natur eher weniger Lignin abbauen als die dafür bekannten Basidiomyceten. Dennoch verfügen auch Ascomyceten über Enzyme, welche Lignin abbauen können (Lee, 2000; Ferrari *et al.*, 2021). *A. alstroemeriae* wurde für 14 Tage in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (MM + LigS) kultiviert. Am Ende der Kultivierung wurde der pH- und Glukosewert bestimmt und die Proben vollständig mit einem Lösungsmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat (1:1 (v/v)) extrahiert (2.3.2). Während der Kultivierungszeit von zwei Wochen ist die freie Glukose im Medium vollständig verbraucht worden und der pH-Wert von 6,5 auf 8,72 gestiegen. Nach Analyse des Rohextraktes (RE) mittels analytischer HPLC (2.3.3.1) konnte der vollständige Abbau des Magnesium-Lignosulfonats anhand des Abgleichs des Chromatogramms des RE mit dem der Kontrollen (MM, MM + LigS und *A. alstroemeriae* kultiviert in MM) detektiert werden (6.2.3, Abb. 91). In dem RE von *Alternaria alstroemeriae* kultiviert in MM + LigS ist ein neues Signal (Substanz X1) bei einer Retentionszeit (Rt) von 14,2 min zu beobachten (Abb. 24). Dieses Signal ist in keiner der Kontrollen, MM + LigS, MM oder MM kultiviert mit *A. alstroemeriae*, detektierbar (6.2.3, Abb. 91). Das dazugehörige UV-Spektrum der Substanz X1 ist in Abbildung 25 zu sehen. Eine anschließende Messung in der HPLC-MS ergab für das Signal bei Rt 14,2 min eine Masse von 352 m/z (Abb. 25). Ein Abgleich mit der Datenbank der AG Thines sowie des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF) ergab keine Übereinstimmung.

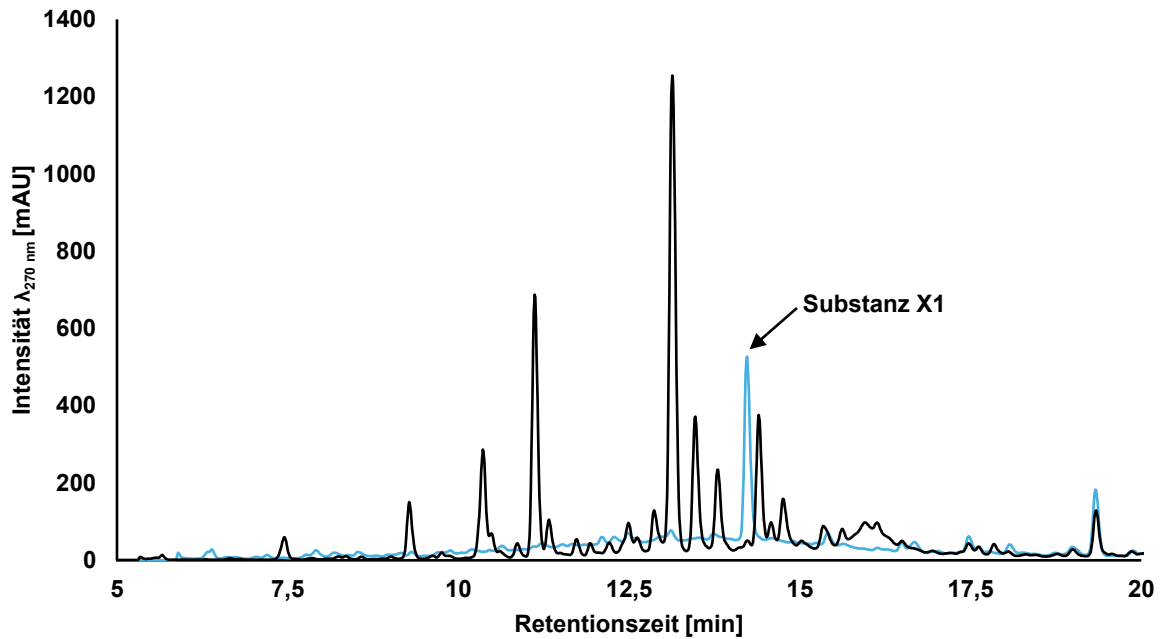


Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Alternaria astroemeriae* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurde Substanz X1 mit einer Retentionszeit von 14,2 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

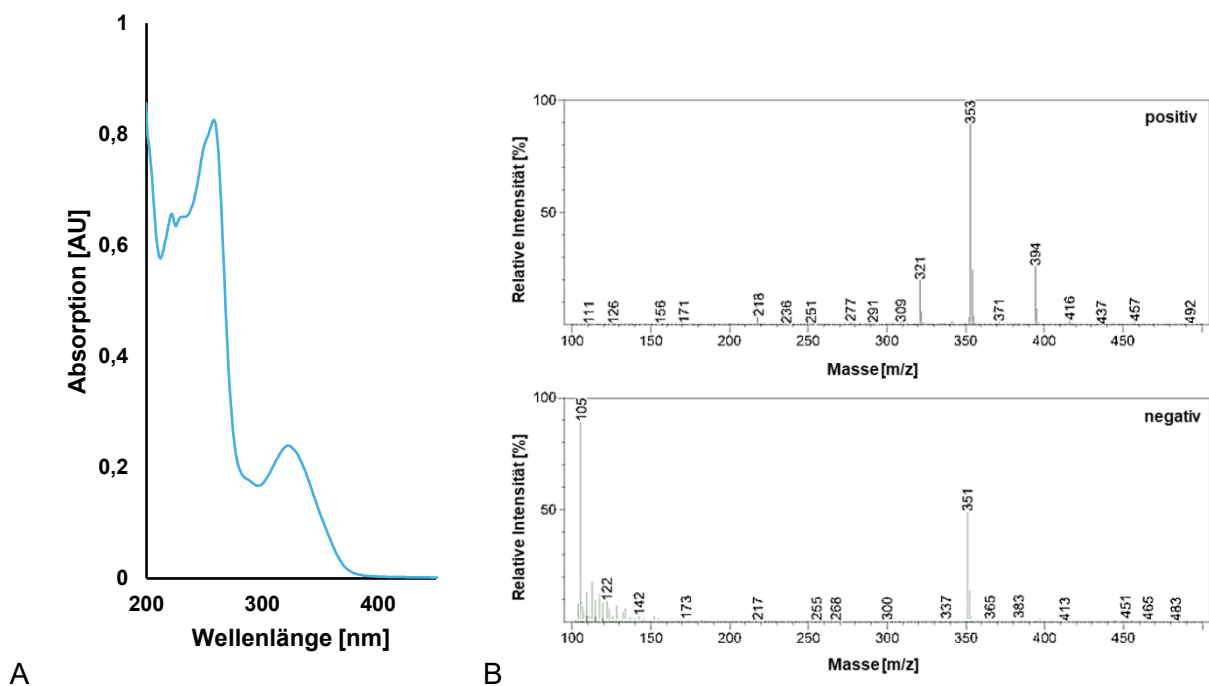


Abbildung 25: UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz X1 aus dem Rohextrakt von *Alternaria astroemeriae* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat. Für Substanz X1 konnte eine Masse von 352 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) an der HPLC-MS aufgenommen.

Für die Aufreinigung von Substanz X1 wurde das am Ende der 14-tägigen Kultivierung gewonnenen RE einer nachfolgenden 20 L Fermentation verwendet (2.3.1.2). Im ersten Schritt wurde eine Kieselgelchromatographie (2.3.2.1) durchgeführt, wobei Substanz X1 danach in Fraktion 4 nachweisbar war. Diese Fraktion wurde an der präparativen HPLC weiter aufgereinigt (2.3.3.2), sodass am Ende Substanz X1 isoliert wurde. Eine erneute Messung an der HPLC-MS bestätigte, die bereits zuvor gemessene Masse von 352 m/z. Die anschließende NMR-Analyse (6.4.2, Abb. 108 & 109) wurde am Fachbereich Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Diese konnten für die Substanz X1 eine Summenformel von $C_{20}H_{16}O_6$ detektieren und die Struktur gänzlich aufklären (Abb. 26). X1 konnte als Detetrahydroconidendrin identifiziert werden.

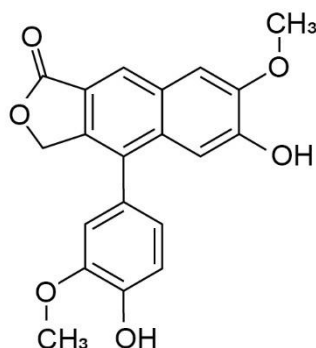


Abbildung 26: Chemische Struktur von Detetrahydroconidendrin (X1) aus der Fermentation von *Alternaria alstroemeriae* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.

Bei genauer Betrachtung der HPLC-Messungen fällt auf, dass das Signal bei Rt 12,8 min, welches sich in der Kontrolle MM + LigS befindet, jedoch nicht in der Kontrolle MM, mit Verlauf der Fermentation abgebaut wurde und das Signal, zugehörig zu Substanz X1, bei Rt 14,2 min dafür entstanden ist (Abb. 24). Aufgrund der Annahme, dass es sich dabei möglicherweise um eine Vorstufe von Detetrahydroconidendrin handelt, wurde die Substanz bei Rt 12,8 min ebenfalls mittels präparativer HPLC (2.3.3.2) aus dem Magnesium-Lignosulfonat aufgereinigt. Mittels HPLC-MS-Messung konnte eine Masse von 356 m/z und das dazugehörige UV-Spektrum detektiert werden (Abb. 27). Die anschließend Strukturaufklärung bestätigte die Masse von 356 m/z und konnte die Substanz als Conidendrin identifizieren (Abb. 28). Eine anschließende analytische HPLC-Messung des aufgereinigten Conidendrins und der anschließende Vergleich mit den Kontrollen Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (Abb. 29) und Minimalmedium (6.2.4, Abb. 93) bestätigten ebenfalls, dass Conidendrin im Magnesium-Lignosulfonat vorhanden ist.

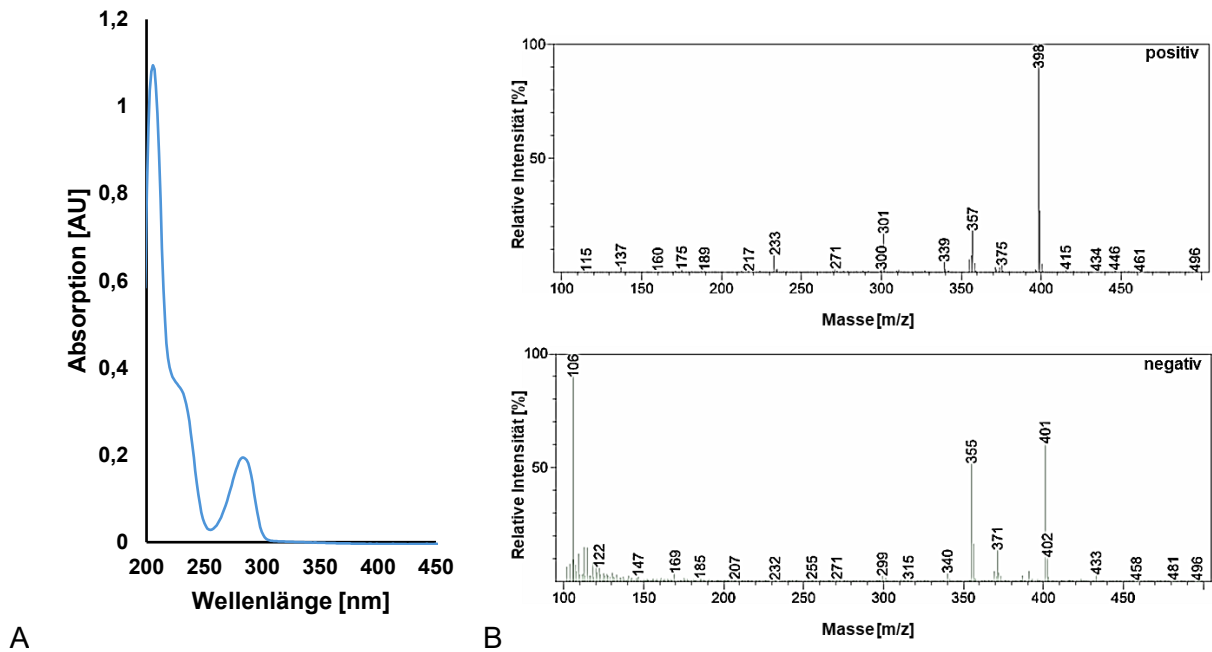


Abbildung 27: UV- (A) und Massenspektren (B) von Conidendrin aus dem Rohextrakt von Magnesium-Lignosulfonat. Für Conidendrin konnte eine Masse von 356 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

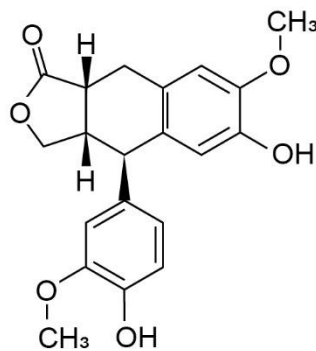


Abbildung 28: Chemische Struktur von Conidendrin isoliert aus dem Rohextrakt von Magnesium-Lignosulfonat.

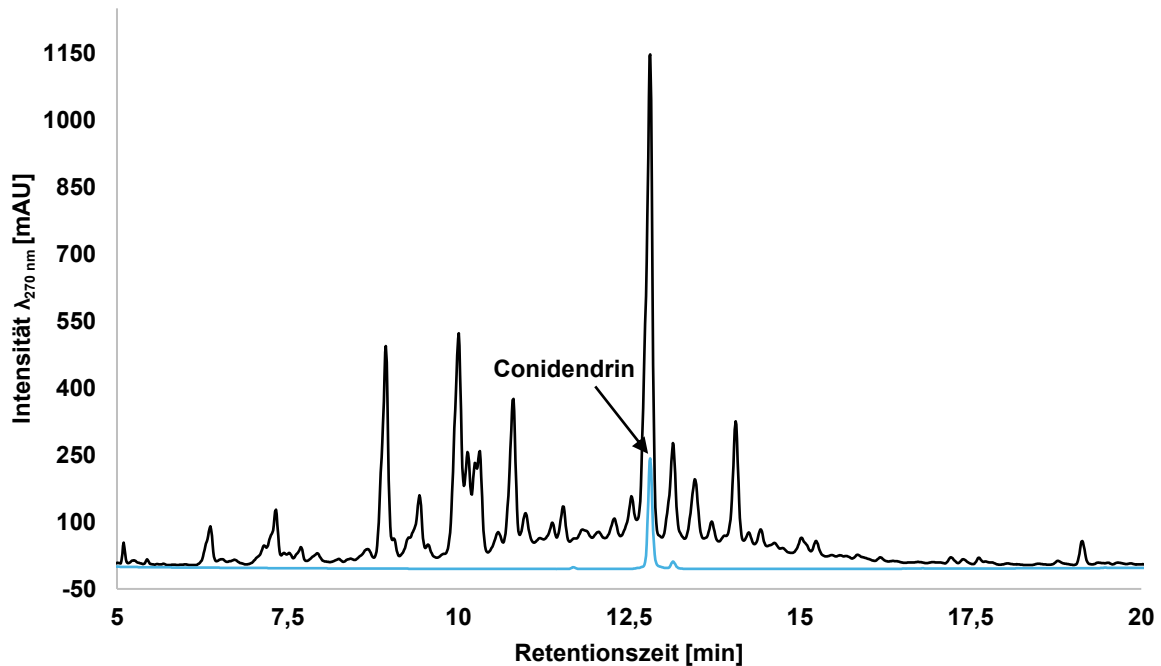


Abbildung 29: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Conidendrin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm. Conidendrin hat eine Retentionszeit von 12,8 min.

3.2.1.1 Supplementierung von Conidendrin zur Bestätigung der Produktion von X1

Zur Bestätigung, dass Conidendrin das Ausgangsprodukt von Detetrahydroconidendrin (Substanz X1) ist, wurde das zuvor aus dem Magnesium-Lignosulfonat isolierte Conidendrin wiederum für 14 Tage mit *Alternaria astroemeriae* kultiviert. Zunächst wurden 500 mL Minimalmedium separat in einem 1 L Schikanekolben autoklaviert sowie Conidendrin in MeOH *p.a.* gelöst und nachträglich zugegeben. Durch die Zugabe von 5 mL einer 50 mM Stammlösung des Conidendrins wurde eine Endkonzentration von 0,5 mM erreicht. Als Kontrolle diente Minimalmedium mit 5 mL MeOH *p.a.* In regelmäßigen Abständen wurde der pH- und Glukosewert überprüft. Dabei konnte festgestellt werden, dass die freie Glukose bereits nach drei Tagen vollständig verbraucht war. Der pH-Wert stieg von anfänglich 6,17 auf 8,24 nach einer Woche und auf 8,86 nach zwei Wochen stetig an. Da sowohl für die einzelnen Tagesproben sowie nach zwei Wochen die Substanz X1, Detetrahydroconidendrin, mittels HPLC-Analyse nicht detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde auf die Durchführung des ABTS-Test verzichtet. Trotz mehrmaliger Wiederholung konnte Detetrahydroconidendrin nach Kultivierung von *A. astroemeriae* mit Conidendrin nicht nachgewiesen werden.

3.2.2. Fermentation mit Kraftlignin

Alternaria astroemeriae wurde gleichermaßen in Minimalmedium mit Kraftlignin (MM + KL) kultiviert. Durch den Abgleich der Chromatogramme des RE von *A. astroemeriae* kultiviert in MM + KL mit dem RE der Kontrollen (6.2.3, Abb. 92) konnte nur ein Abbau des im Kraftlignin vorkommenden signifikanten Signals bei Rt 11,1 min beobachtet werden (Abb. 30). Der Abbau der anderen Signale bei Rt 9,75 min und Rt 15 min ist anhand der HPLC-Analyse des RE von *A. astroemeriae* kultiviert in MM + KL nicht zu beobachten. Das Signal bei Rt 14,2 min, welches während der Kultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat detektiert werden konnte, wurde während der Kultivierung mit Kraftlignin nicht beobachtet (Abb. 30).

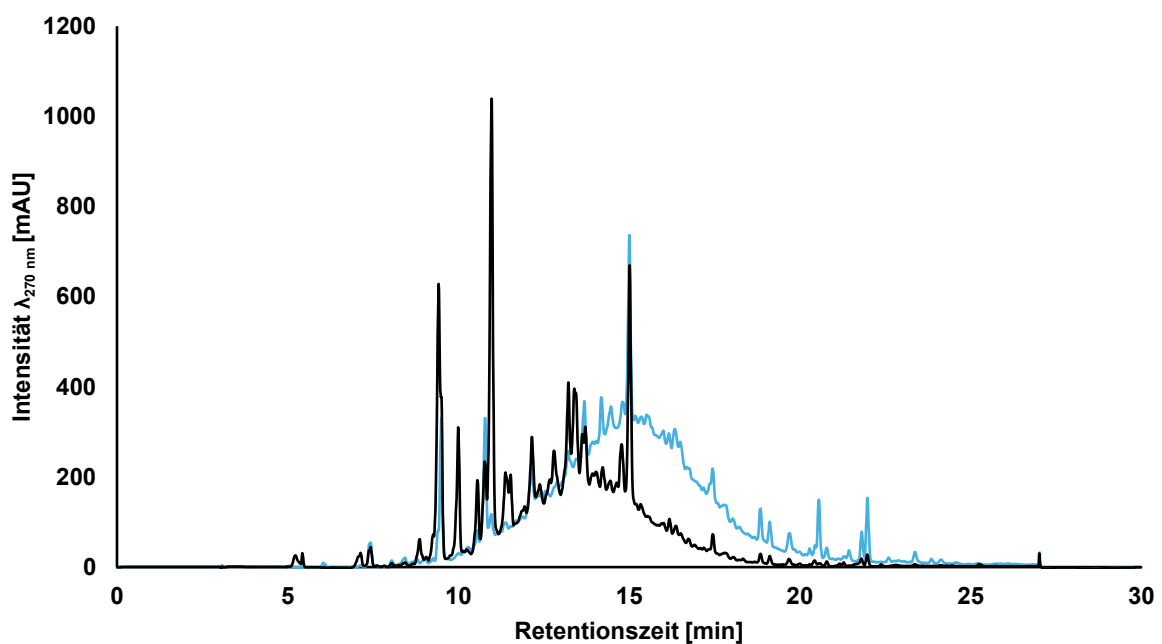


Abbildung 30: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Alternaria astroemeriae* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz). Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

3.2.3 Fermentations-Monitoring sowie quanti- und qualitative Enzymtests

Für die Durchführung des Fermentations-Monitorings über 14 Tage wurde eine 2,5 L Fermentation angesetzt, von der täglich 150 mL entnommen und analysiert wurden. Es wurde der pH- und Glukosewert, die Enzymaktivität der Laccasen und Peroxidasen im Kulturfiltrat (KF) mittels ABTS-Test (2.4.2) sowie die Menge an Substanz X1 gemessen (Abb. 31). Nach Analyse der einzelnen Tagesproben konnte beobachtet werden, dass die freie Glukose im Medium bereits nach 48 h vollständig verbraucht war. Der pH-Wert hingegen ist mit zunehmender Fermentationsdauer von 6,38 an Tag 1 auf 8,72 an Tag 14 kontinuierlich im alkalischen Bereich gestiegen. Das Signal bei Rt 14,2 min, zugehörig zur Substanz X1, konnte ab Tag 7 mit einer Menge von 2,4 mg/L detektiert werden. Danach nahm die Menge bis Tag 10 mit 1,2 mg/L ab, um dann kurzfristig an Tag 11 wieder auf 2,2 mg/L anzusteigen. Danach fiel die Menge ein zweites Mal ab, um dann zum Maximum von 3,6 mg/L an Tag 14 anzusteigen. Zu Beginn konnte zunächst eine zunehmende Peroxidase-Aktivität von 5,5 U/L an Tag 2 gemessen werden. An Tag 3 betrug die Laccase-Aktivität 2,9 U/L, welche an Tag 4 wieder von der Peroxidase mit 4,9 U/L abgelöst wurde. An den nachfolgenden Tagen 5 – 11 konnte nur Laccase-Aktivität gemessen werden. Diese war an Tag 5 mit 4,1 U/L am höchsten, nahm dann ab, bis zum Minimum von 0,3 U/L an Tag 9, um anschließend wieder auf 1,2 U/L an Tag 11 anzusteigen. An Tag 12 war wiederum eine Peroxidase-Aktivität von 1,6 U/L messbar.

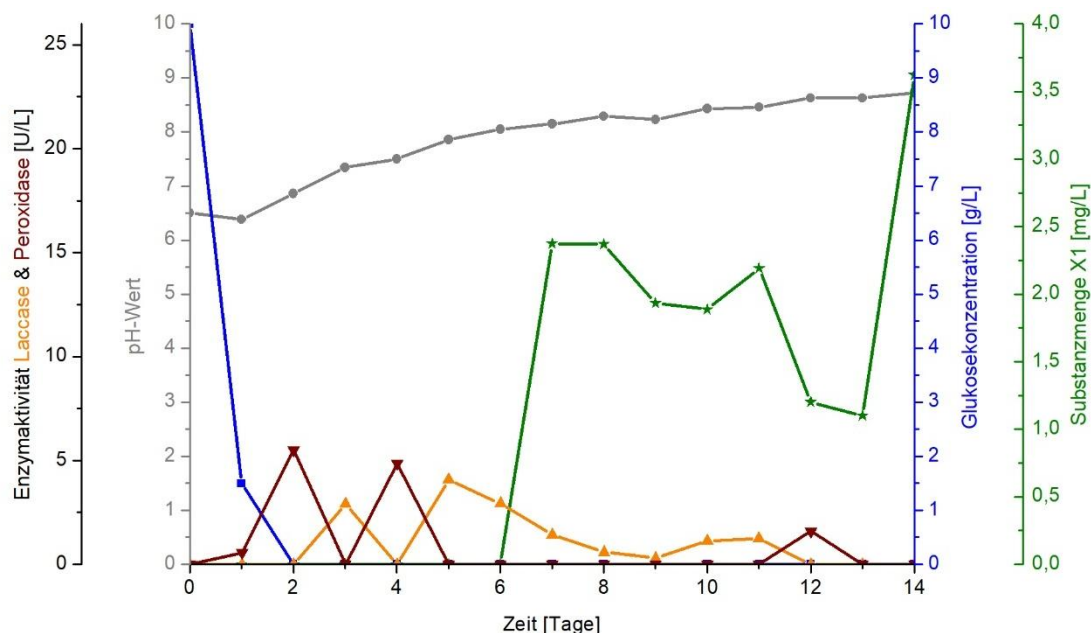


Abbildung 31: Fermentationsverlauf von *Alternaria astroemeriae* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab. Abgebildet sind die pH-Werte (grau), die Glukosekonzentration in g/L (blau), die Substanzmenge von X1 in mg/L (grün) sowie die Laccase- (orange) und Peroxidase-Aktivität (dunkelrot) in U/L. Erstellt mit Origin 7.5.

3.2.3.1 Qualitativer Nachweis extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme

Um die Aktivität noch anderer am extrazellulären Ligninabbau beteiligten Enzyme, wie z.B. die Polyphenoloxidasen oder die Lignin- bzw. Manganabhängigen Peroxidasen, nachweisen zu können, wurde ein qualitativer Enzymtest auf Agarplatten nach Pointing (1999) durchgeführt. Das dafür verwendete *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen, für die jeweiligen Enzyme charakteristischen Substraten, versetzt (2.1.7). Die Verfärbung von ABTS weist die Aktivität von Laccasen nach und die Entfärbung des Azur B Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Für den Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen wurden LBM-Platten mit Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) versetzt. Alle Platten wurden mit gleichgroßen Stücken von *Alternaria alstroemeriae* inokuliert und anschließend für 10 Tage bei 25 °C inkubiert (2.4.1). Nach der Inkubationszeit konnte wie in Abbildung 32 zu sehen im Vergleich zur Negativkontrolle, *Penicillium steckii* IBWF 104-06, eine starke blaue Verfärbung der LBM-ABTS-Platte beobachtet werden, was auf eine Laccase-Aktivität hinweist. Bei den Platten mit Poly R und Azur B hingegen konnte keine Entfärbung beobachtet werden. Stark verfärbt waren die Platten mit LigS und KL zum Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen.

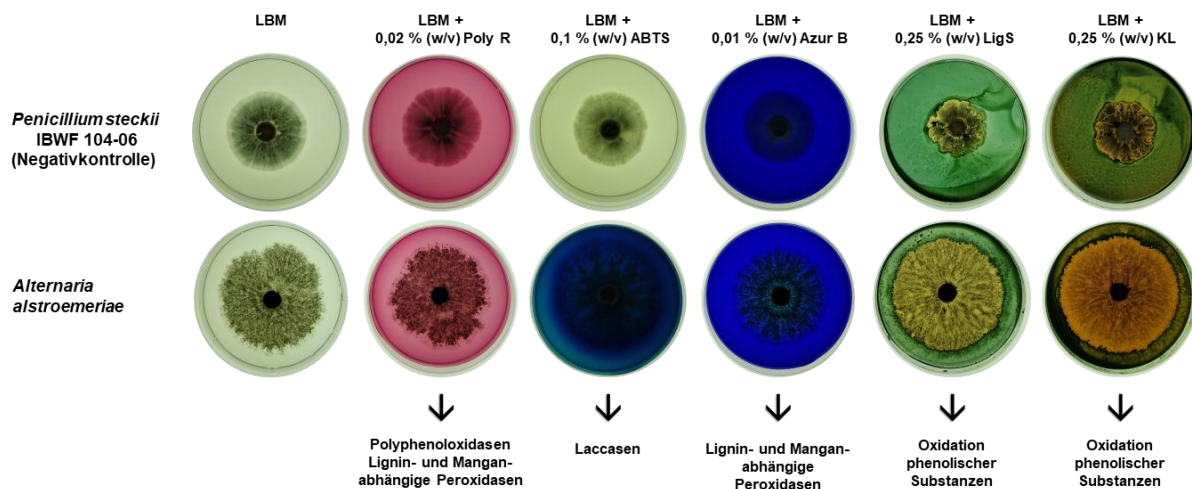


Abbildung 32: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Alternaria alstroemeriae*. *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen Substraten versetzt und mit *A. alstroemeriae* inokuliert, um extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme nachzuweisen. Die Entfärbung von Poly R weist Polyphenoloxidasen und Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen nach. Die Verfärbung von ABTS weist Laccasen nach und die von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen. Zum Nachweis der Oxidation phenolischer Komponenten wurden Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) verwendet. Als Wachstumskontrolle wurde eine LBM-Platte ohne Zusätze inokuliert und als Negativkontrolle wurde *Penicillium steckii* IBWF 104-06 mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über 10 Tage bei RT. Angesetzt in Triplikaten.

3.2.4 Biologische Charakterisierung der Substanz X1

Zur biologischen Charakterisierung der von *Alternaria alstroemeriae* während der Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat produzierten Substanz Detetrahydroconidindrin (X1) wurde diese gegenüber verschiedenen Organismen, wie z.B. Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Humanzellen, getestet. Dazu wurde zunächst ein Agardiffusionstest (2.5.1) durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte ein Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest (2.5.2) am Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF), ein Biofilm-Assay (2.5.4) durchgeführt von der AG Heermann am IMP der Johannes Gutenberg-Universität Mainz sowie ein Toxizitäts-Assay (2.5.3) gegenüber Humanzellen am IBWF.

3.2.4.1 Agardiffusionstest gegenüber Bakterien und Pilzen

Zum Nachweis möglicher antibiotischer bzw. antimykotischer Aktivität wurde Detetrahydroconidindrin zunächst gegenüber den Organismen *Bacillus brevis*, *Enterobacter dissolvens*, *Micrococcus luteus*, *Mucor miehi*, *Nematospora coryli*, *Penicillium notatum* und *Paecilomyces variotii* auf eine Wachstumsinhibition dieser getestet. Dazu wurde X1 in MeOH *p.a.* gelöst, auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und auf die Filterrondelle, welche zuvor auf den verschiedenen Testplatten platziert wurden, aufgetragen (2.5.1). Nach einer Inkubation von 24 – 48 h bei dem entsprechenden Temperaturoptimum des jeweiligen Organismus (2.2.2) erfolgte die Auswertung. Dabei konnte eine Aktivität gegenüber *Bacillus brevis* mit einer Menge von 100 µg (Ø 0,6 cm) und 50 µg (Ø 0,2 cm) beobachtet werden. Eine Wiederholung am IBWF konnte das Ergebnis nicht bestätigen.

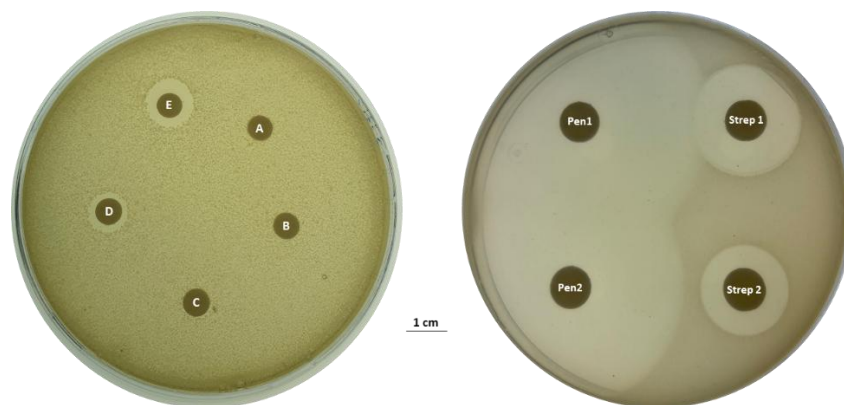


Abbildung 33: Fotografische Dokumentation des Agardiffusionstest der Substanz Detetrahydroconidindrin (X1) (links) gegenüber *Bacillus brevis* im Vergleich zu den Kontrollen (rechts). Folgende Mengen von Detetrahydroconidindrin wurden aufgetragen: 1 µg (A), 10 µg (B), 25 µg (C), 50 µg (D) und 100 µg (E). Als Positivkontrolle wurde 20 µg (Pen2) und 100 µg (Pen1) Penicillin sowie 20 µg (Strep2) und 100 µg (Strep1) Streptomycinsulfat mitgeführt. Angesetzt in Triplikaten.

3.2.4.2 Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest gegenüber Pilzen, Oomyceten und Pflanzen

Zur Testung möglicher keimungs- und wachstumsinhibierender Wirkung der Substanz X1 gegenüber den Organismen *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Phytophthora infestans* sowie *Setaria italica* und *Lepidium sativum* wurde diese zunächst in MeOH *p.a.* oder EtOH *p.a.* rückgelöst, auf die jeweilige Konzentration eingestellt und dann in die Vertiefungen der Well-Platten vorgelegt (2.5.2). Nach Evaporation des Lösungsmittels wurden die entsprechenden Sporen- bzw. Konidiensuspension (Tab. 13) oder die jeweiligen Pflanzensamen hinzugefügt und anschließend bis zur Auswertung bei dem jeweiligen Temperaturoptimum inkubiert (2.2.2). Es konnte keine Aktivität gegenüber den oben genannten Testorganismen beobachtet werden.

3.2.4.3 Toxizitäts-Assay gegenüber Zellen

Um die Substanz X1 auf eine mögliche toxische Aktivität gegenüber Humanzellen zu testen, wurde diese am IBWF gegenüber HeLa S3 Zellen getestet. X1 wurde in DMSO rückgelöst, auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und zu den Zellen zugegeben (2.5.3). Nach 72-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C erfolgte die Auswertung. Für X1 konnte keine Aktivität festgestellt werden.

3.2.4.4 Wachstums- und Biofilm-Assay

Für den Nachweis einer inhibitorischen Aktivität gegenüber verschiedenen Biofilmen wurde die Reinsubstanz Detetrahydroconidindrin (X1) zunächst in MeOH *p.a.* gelöst und auf Konzentrationen von 10 µM, 1 µM und 100 nM eingestellt. Im Anschluss übernahm die AG Heermann am IMP der Johannes Gutenberg-Universität Mainz die Durchführung des Biofilm-Assays (2.5.4). Für *Pseudomonas aeruginosa* PA 01 DSM 19880 konnte nach Zugabe von X1 trotz des über den gesamten Zeitraum im Vergleich zur Kontrolle (*P. aeruginosa* PA 01 DSM 19880 kultiviert in TSB-Medium) stärkeren Wachstums (6.5.1, Abb. 121) eine Reduktion der Biofilmbildung von ca. 16 % detektiert werden (6.5.1, Abb. 126). Bei *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 DSM 19982 war das Wachstum schwächer im Vergleich zur Kontrolle (6.5.1, Abb. 121), jedoch die Biofilmbildung mit 128 % wurde wiederum gesteigert (6.5.1, Abb. 127). Dennoch ist aufgrund des gemessenen Absorptionswertes von 0,27 (OD₅₇₅), unter Berücksichtigung der in Tabelle 14 (2.5.4) gelisteten Werte, dies als schwache Biofilmbildung einzustufen.

3.3. Fermentation von *Coniolaria hispanica* mit industriellem Ligninabfall

3.3.1 Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat und Isolierung neuer phenolischer Substanzen

Coniolaria hispanica wurde ursprünglich als Endophyt von Blättern des Feld-Mannstreu (*Eryngium campestre*) isoliert (Checa *et al.*, 2008) und gehört zur Familie der *Xylariaceae*, welche dafür bekannt sind auf Holz zu leben und dieses auch abbauen zu können. Da diese Zellulose und Lignin abbauen können, wird dadurch hauptsächlich Weißfäule verursacht (Rogers, 1979).

C. hispanica stammt aus der Stammsammlung der AG Thines und wurde zuvor isoliert und molekularbiologisch sowie morphologisch charakterisiert (6.1). Im Rahmen des Screening-Verfahrens konnte nach zweiwöchiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (MM + LigS) der Abbau des Magnesium-Lignosulfonats sowie neue Substanzen detektiert werden. Vor Extraktion der Submerskultur mit Ethylacetat wurde der pH- und Glukosewert bestimmt sowie die Laccase- und Peroxidase-Aktivität gemessen. Innerhalb der zwei Wochen war die freie Glukose im Medium vollständig verbraucht und der pH-Wert auf 8,35 gestiegen. Eine geringe Laccase-Aktivität von 0,3 U/L konnte gemessen werden, Peroxidase-Aktivität war nicht detektierbar. Nach Abgleich des Chromatogramms des aufbereiteten Rohextrakts (RE) mit dem der Kontrollen (6.2.5, Abb. 94) konnte, wie bereits erwähnt, der Abbau des Magnesium-Lignosulfonats sowie vier neue Signale bei einer Rt von 13,9 min (Substanz L1), 14,4 min (Substanz L2), 15,0 min (Substanz L3) und 16,6 min (Substanz L8) detektiert werden (Abb. 34). Anhand der nachfolgenden HPLC-MS-Messung konnte für die Substanz L1 eine Masse von 352 m/z, für Substanz L2 eine Masse von 175 m/z, für L3 eine Masse von 206 m/z und für Substanz L8 eine Masse von 220 m/z detektiert werden (Abb. 36 – 38). L1 hat mit 352 m/z die gleiche Masse wie X1 von *A. alstroemeriae*. Beim Vergleich beider UV-Spektren fällt ebenfalls auf, dass diese identisch sind (Abb. 35), sodass trotz der Verschiebung der Rt von 14,2 min bei X1 auf 13,9 min bei L1, davon ausgegangen werden kann, dass es sich um die gleiche Substanz handelt. Daher wurde L1 nicht weiter aufgereinigt. Ein Abgleich anhand der Rt, UV- und Massenspektren mit der Datenbank der AG Thines sowie des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF) ergab für die Substanzen L2, L3 und L8 keine Übereinstimmung.

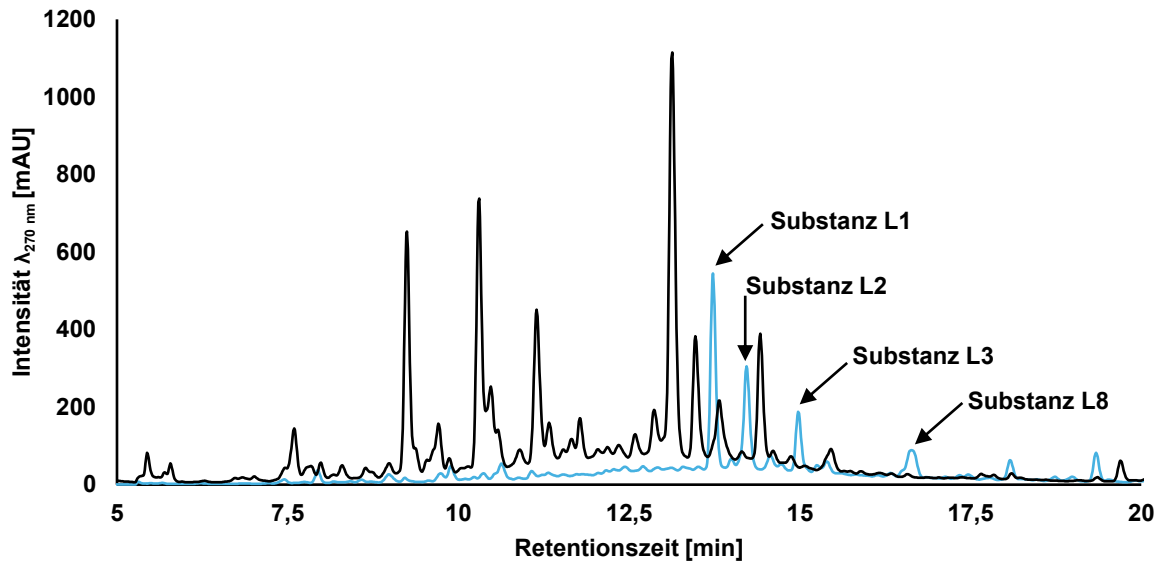
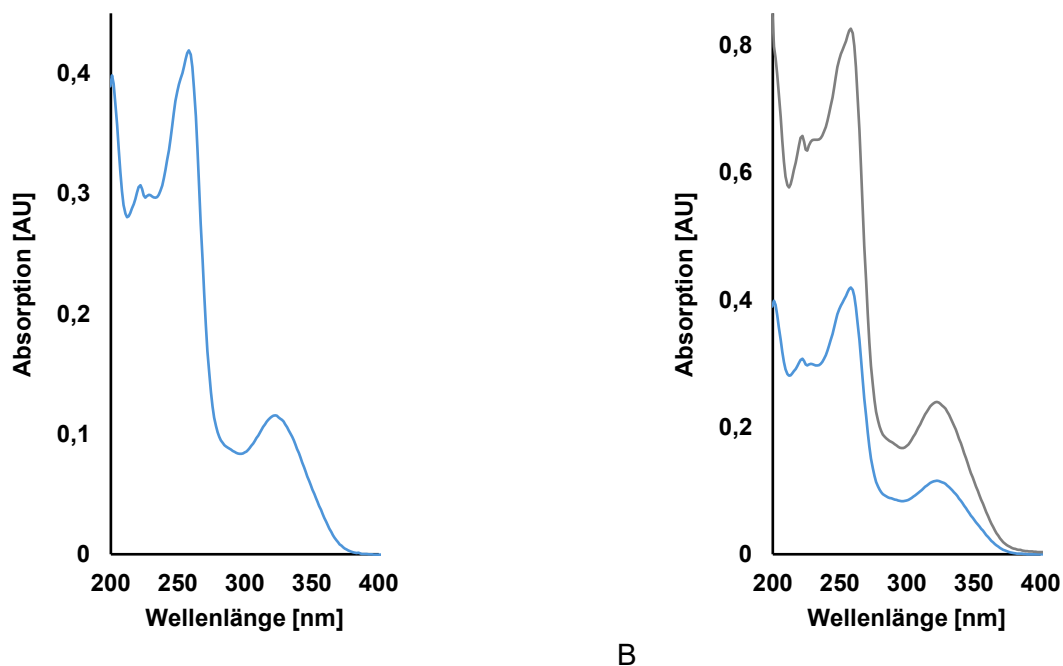


Abbildung 34: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurden die Substanzen L1 mit einer Retentionszeit von 13,9 min, L2 bei 14,4 min, L3 bei 15 min und L8 bei 16,6 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.



A

B

Abbildung 35: UV-Spektren der Substanz L1 aus dem Rohextrakt von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (A) im Vergleich zur Substanz X1 von *Alternaria alstroemeriae* (B). Die Spektren wurden mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) an der HPLC-MS aufgenommen.

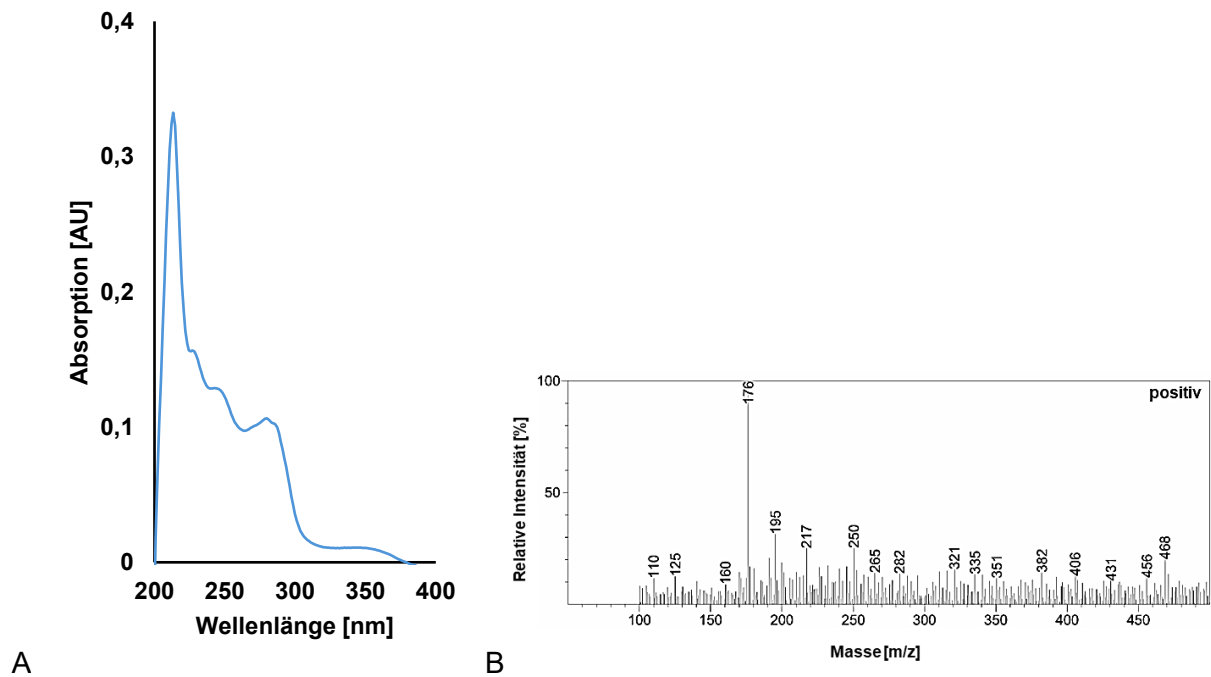


Abbildung 36: UV- (A) und Massenspektrum (B) von Substanz L2 aus dem Rohextrakt von *Coniolaria hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat. Für Substanz L2 konnte eine Masse von 175 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

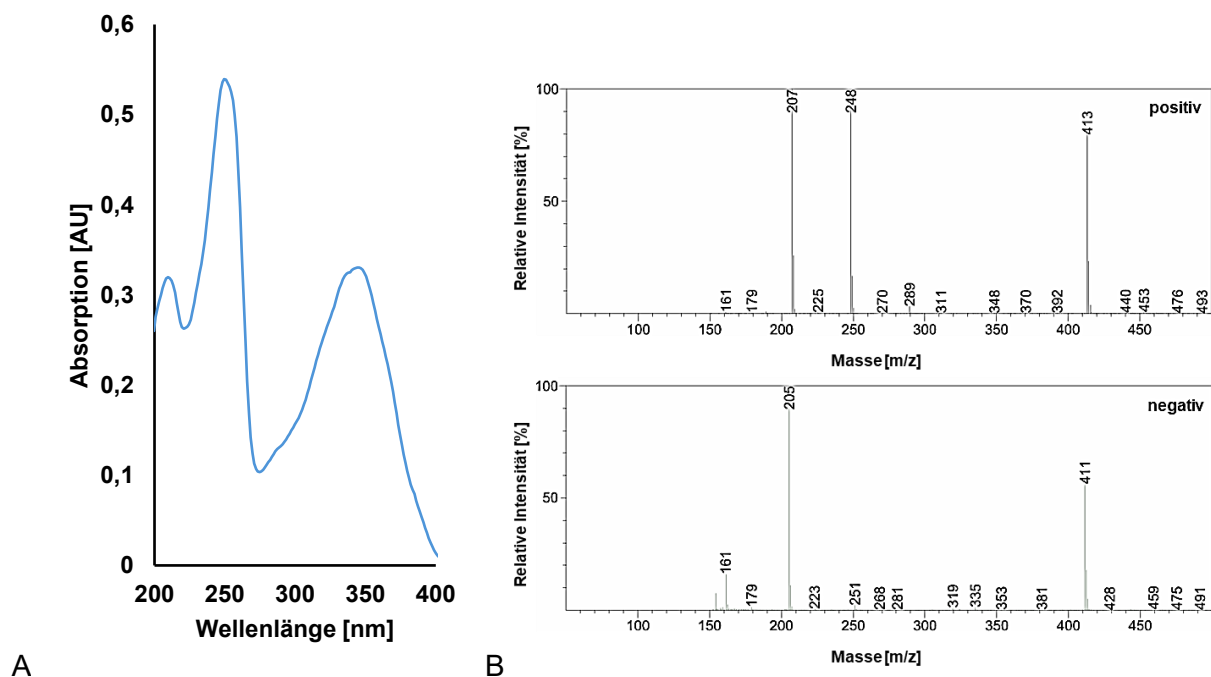


Abbildung 37: UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz L3 aus dem Rohextrakt von *Coniolaria hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat. Für Substanz L3 konnte eine Masse von 206 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

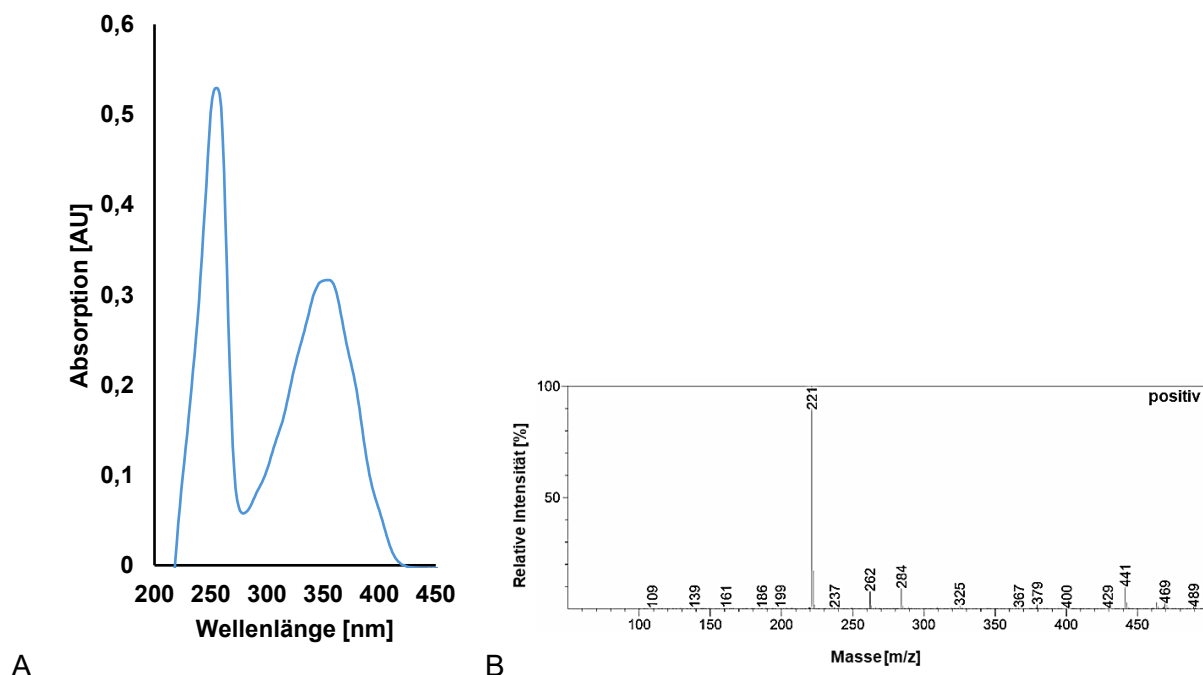


Abbildung 38: UV-(A) und Massenspektrum (B) von Substanz L8 aus dem Rohextrakt von *Coniolaria hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat. Für Substanz L8 konnte eine Masse von 220 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

Zur Aufreinigung der Substanzen L2, L3 und L8 wurde nachfolgend eine 20 L Fermentation angesetzt (2.3.1.2). Nach 14-tägiger Fermentation wurde die gesamte Kultur mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat extrahiert (2.3.2) und der daraus gewonnene RE zunächst mittels Kieselgelchromatographie (2.3.2.1) weiter aufgereinigt. L2 und L3 waren danach in Fraktion 4, wohingegen L8 in Fraktion 5 detektierbar war. Die Fraktionen 4 und 5 wurden mittels präparativer HPLC weiter aufgereinigt (2.3.3.2), wobei am Ende alle Substanzen isoliert wurden. Anhand der nachfolgenden Messungen an der HPLC-MS konnten die bereits zuvor analysierten Massen von 175 m/z für L2, 206 m/z für L3 sowie 220 m/z für L8 wiederum bestätigt werden. Für die anschließende NMR-spektroskopischen Analysen wurden die Proben an den Fachbereich Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz übergeben (6.4.3, Abb. 110 - 111 & 114 - 115). Für die Substanz L2 konnte eine Summenformel von $C_{10}H_9NO_2$ analysiert und diese als Methylindol-3-Carboxylat identifiziert werden (Abb. 39). L8 konnte als 8,9-Dehydroxylaron ($C_{13}H_{17}O_3$) identifiziert werden (Abb. 39). Für Substanz L3 konnte aufgrund der zu geringfügigen Menge keine Strukturaufklärung erfolgen.



Abbildung 39: Chemische Struktur von Methylindol-3-Carboxylat (L2) und 8,9-Dehydroxylaron (L8) aus der Fermentation von *Coniolarrella hispanica* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.

Bei einer erneuten Kultivierung von *C. hispanica* in MM + LigS, etwa 5 Monate nach der ersten, konnten die zuvor detektierten Substanzen L1 – L3 und L8 nicht mehr detektiert werden. Dafür konnte eine neue Substanz (L7) bei einer Rt von 13,8 min beobachtet werden (Abb. 40; 6.2.6, Abb. 96). Da auch in der Kontrolle, MM +LigS, bei Rt 13,8 min ein Signal zu sehen ist, wurde zunächst das UV-Spektrum der Substanz L7 mit dem UV-Spektrum des Signals der Kontrolle verglichen (Abb. 41). Anhand des Abgleichs wurde festgestellt, dass es sich bei L7 um eine neue unbekannte Substanz handelt. Aufgrund dessen, dass L7 das einzige und stärkste Signal war, wurde auch dieses zur genaueren Charakterisierung aufgereinigt.

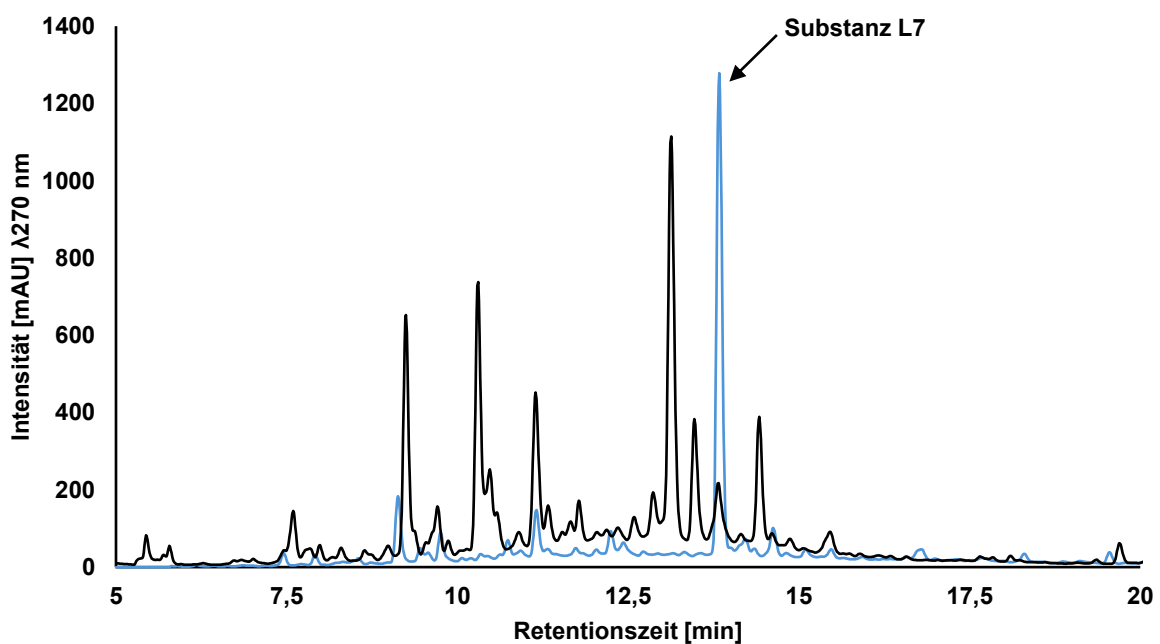


Abbildung 40: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurde die Substanz L7 mit einer Retentionszeit von 13,8 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

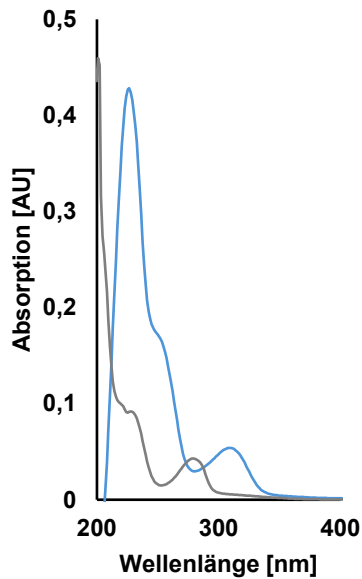


Abbildung 41: UV-Spektrum von Substanz L7 aus dem Rohextrakt von *Coniolaria hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu dem Signal bei Retentionszeit 13,8 Minuten aus der Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (grau). Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

Dazu wurde eine 20 L Fermentation angesetzt und bereits nach 8 Tagen, aufgrund der hohen Konzentration an L7 beendet. Wie in Abbildung 103 (6.3) zu sehen stieg der pH-Wert von anfänglich 6,56 auf ein Maximum von 7,16 an Tag 5 an und sank im Anschluss wieder auf 6,93 an Tag 8. Die freie Glukose im Medium war mit Erreichen von Tag 8 auf 0,5 g/L gesunken. Eine Laccase- oder Peroxidase-Aktivität konnte nicht analysiert werden. Bereits nach 24 h konnte L7 mit einer Konzentration von 2,3 mg/L detektiert werden. Im Anschluss sank die Konzentration bis Tag 3 wieder auf 0,6 mg/L ab, um in Anschluss an Tag 5 ein Maximum von 3,9 mg/L zu erreichen. In den restlichen drei Tagen sank die Konzentration von L7 auf 3 mg/L ab. Da der RE bis auf das Signal von Substanz L7 bei Rt 13,8 min keine weiteren signifikanten Signale enthielt, wurde dieses direkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt (2.3.3.2). Im Anschluss wurde von der aufgereinigten Substanz eine HPLC-MS Analyse zur Bestimmung der Masse durchgeführt (2.3.3.1). Dabei konnte eine Masse von 222 m/z analysiert werden (Abb. 42). Ein Abgleich mit der Datenbank des IBWF und der AG Thines ergab keine Übereinstimmung, sodass die Substanz an den Fachbereich Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Strukturaufklärung übergeben wurde (6.4.3, Abb. 112 & 113). Nach erfolgreicher NMR-Analyse wurde festgestellt, dass es sich bei L7 um zwei Substanzen handelt (L7-1 & L7-2), wobei nur eine aufgeklärt werden konnte. Für L7-1 konnte eine Summenformel von $C_{11}H_{10}O_5$ analysiert und die Substanz als 5-Carboxymellein identifiziert werden (Abb. 43).

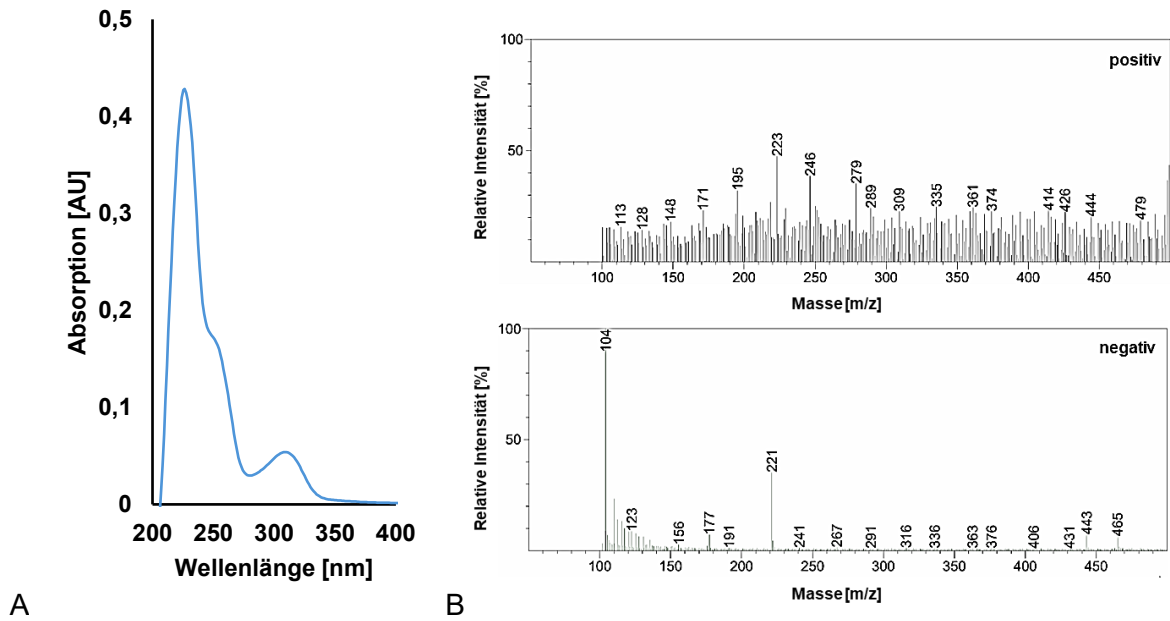


Abbildung 42: UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz L7-1 aus dem Rohextrakt von *Coniolaria hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat. Für Substanz L7-1 konnte eine Masse von 222 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

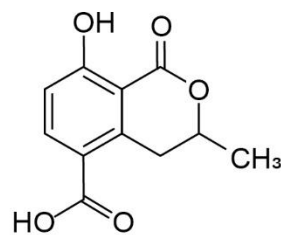


Abbildung 43: Chemische Struktur von 5-Carboxymellein (L7-1) aus der Fermentation von *Coniolaria hispanica* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.

3.3.2 Fermentation mit Kraftlignin

C. hispanica wurde ebenfalls in Minimalmedium mit Kraftlignin (MM + KL) kultiviert. Nach 14-tägiger Kultivierung wurde der RE mittels HPLC analysiert und das Chromatogramm, mit dem der Kontrollen verglichen (6.2.5, Abb. 95). Dabei konnte der teilweise Abbau des Kraftlignins beobachtet werden. Die signifikanten Signale bei Rt 11,1 min und 15 min sind nahezu abgebaut, wodurch die Signale des Mediums bei Rt 11,2 min, 12,6 min und 15,4 min stärker sichtbar wurden (Abb. 44). Ein neues Signal konnte nicht detektiert werden.

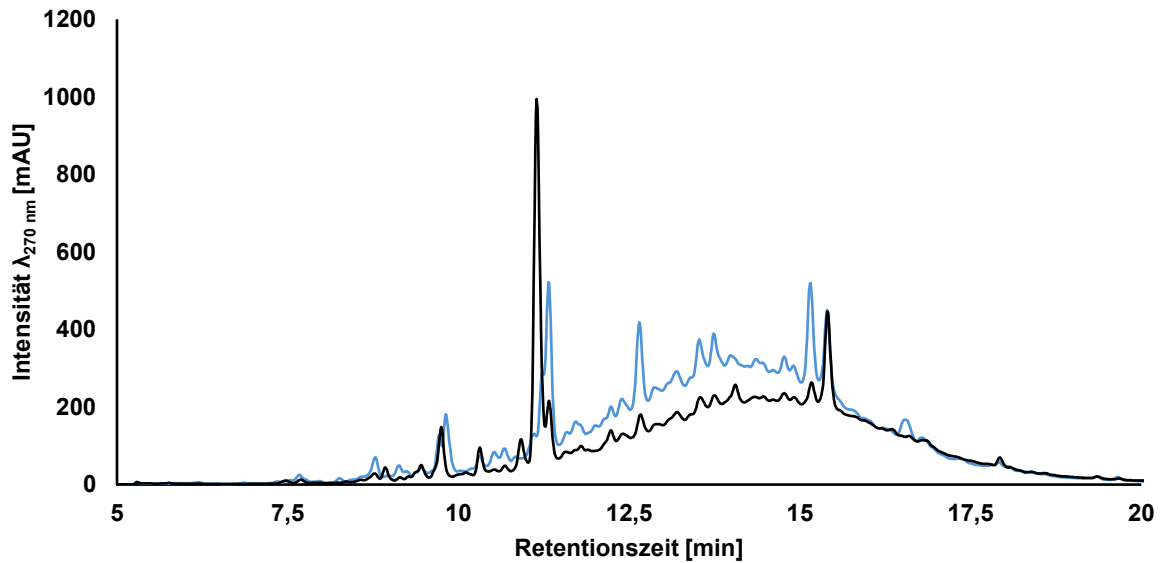


Abbildung 44: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolarrella hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz). Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

3.3.3. Fermentations-Monitoring mit quanti- und qualitativem Enzymtest

Zur weiteren Charakterisierung der Substanzen L2, L3 und L8 wurde eine 2,5 L Fermentation durchgeführt. Im Zuge dieser 14-tägigen Kultivierung wurden täglich Proben genommen und der pH- und Glukosewert sowie die Laccase- und Peroxidase-Aktivität des Kulturfiltrates bestimmt. Anhand der Abbildung 45 ist zu sehen, dass der pH-Wert kontinuierlich von zu Beginn 6,1 auf 8,52 am Ende anstieg. Die freie Glukose war mit Erreichen von Tag 5 verbraucht. Die Laccase-Aktivität war gering und stieg bis zu einem Maximum von 43,5 mU/L an Tag 12 kontinuierlich an. Zum Ende der Fermentation fiel diese wieder auf 25 mU/L ab. Peroxidase-Aktivität konnte nicht gemessen werden. Während des Fermentationsverlaufs wurden L3 und L8 nicht produziert, sodass nur die Konzentration von L2 analysiert werden konnte. Diese stieg zunächst bis Tag 3 auf 0,3 mg/L, um kurzzeitig an Tag 4 auf 0,2 mg/L abzufallen. Im Anschluss stieg die Substanzmenge von L2 auf 0,9 mg/L an Tag 9 an. Diese fiel dann auf ein Minimum von 0,02 mg/L an Tag 12, bevor an Tag 14 das Maximum von 2,3 mg/L erreicht war.

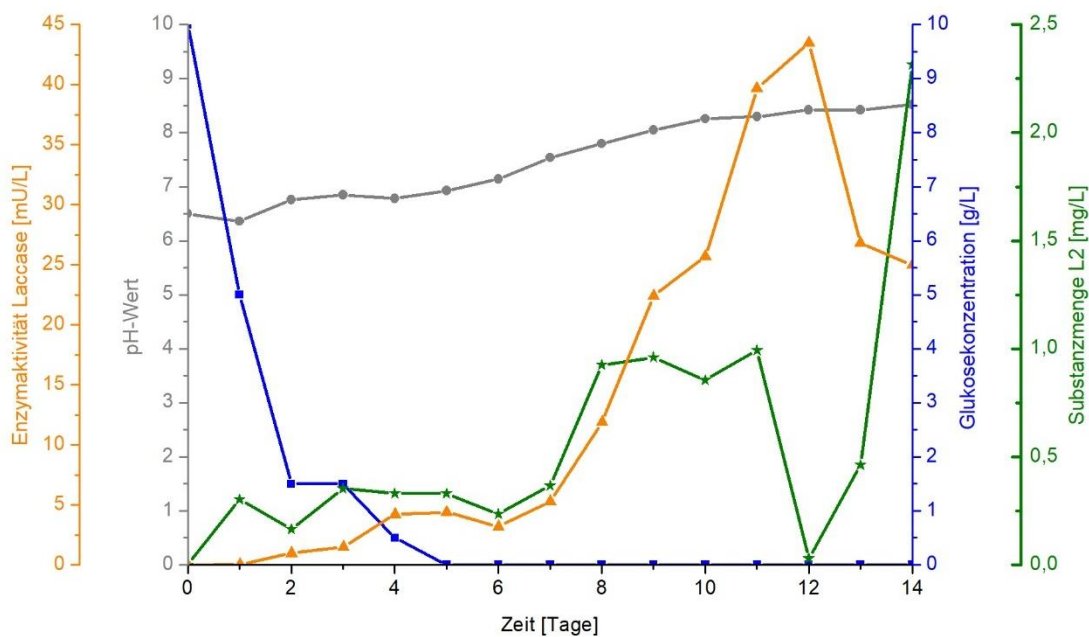


Abbildung 45: Fermentationsverlauf von *Coniolarrella hispanica* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab. Abgebildet sind die pH-Werte (grau), die Glukosekonzentration in g/L (blau), die Substanzmenge von L2 (grün) in mg/L sowie die Laccase-Aktivität (orange) in mU/L. Erstellt mit Origin 7.5.

3.3.3.1 Qualitativer Nachweis extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme

Um die Aktivität noch anderer am extrazellulären Ligninabbau beteiligten Enzyme, wie z.B. die Polyphenoloxidasen oder die Lignin- bzw. Manganabhängigen Peroxidasen, nachweisen zu können, wurde ein qualitativer Enzymtest auf Agarplatten nach Pointing (1999) durchgeführt. Das dafür verwendete *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen, für die jeweiligen Enzyme charakteristischen Substraten, versetzt (2.1.7). Die Entfärbung von Poly R impliziert die Anwesenheit von Polyphenoloxidasen, Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Die Verfärbung von ABTS weist die Aktivität von Laccasen nach und die Verfärbung von Azur B Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Für den Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen wurden LBM-Platten mit Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) versetzt. Alle Platten wurden mit gleichgroßen Stücken von *Coniolarrella hispanica* inokuliert und anschließend für 10 Tage bei RT inkubiert (2.4.1). Nach der Inkubationszeit konnte wie in Abbildung 46 zu sehen im Vergleich zur Negativkontrolle, *Penicillium steckii* IBWF 104-06, eine starke blaue Verfärbung der LBM-ABTS-Platte beobachtet werden, was auf eine Laccase-Aktivität hinweist. Bei den Platten mit Poly R und Azur B hingegen konnte keine Entfärbung beobachtet werden. Wiederum sehr stark verfärbt waren die Platten mit LigS und KL zum Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen.

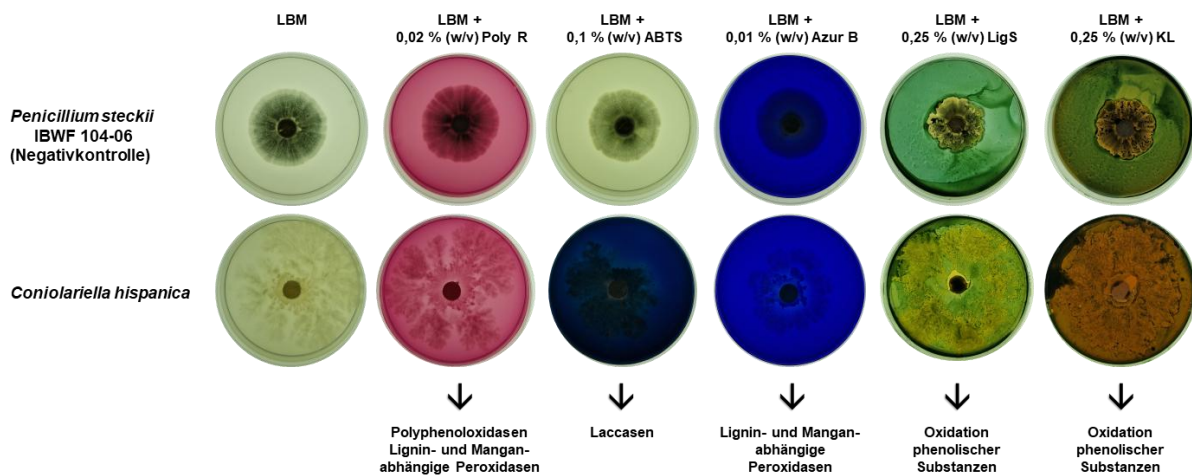


Abbildung 46: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Coniolarrella hispanica*. *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen Substraten versetzt und mit *C. hispanica* inokuliert, um extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme nachzuweisen. Die Entfärbung von Poly R weist Polyphenoloxidasen und Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen nach. Die Verfärbung von ABTS weist Laccasen nach und die von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen. Zum Nachweis der Oxidation phenolischer Komponenten wurden Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) verwendet. Als Wachstumskontrolle wurde eine LBM-Platte ohne Zusätze inokuliert und als Negativkontrolle wurde *Penicillium steckii* IBWF 104-06 mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über 10 Tage bei RT. Angesetzt in Triplikaten.

3.3.4 Biologische Charakterisierung der Substanzen L2, L3, L7-1 und L8

Zur biologischen Charakterisierung der von *Coniolarrella hispanica* während der Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat produzierten Substanzen Methylindol-3-Carboxylat (L2), L3, 5-Carboxymellein (L7-1) und 8,9-Dehydroxylaron (L8) wurden diese gegenüber verschiedenen Organismen, wie z.B. Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Humanzellen, getestet. Dazu wurde zunächst ein Agardiffusionstest (2.5.1) durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte ein Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest (2.5.2) am Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF), ein Biofilm-Assay (2.5.4) durchgeführt von der AG Heermann am IMP der Johannes Gutenberg-Universität Mainz sowie ein Toxizitäts-Assay (2.5.3) gegenüber Humanzellen (IBWF).

3.3.4.1 Agardiffusionstest gegenüber Bakterien und Pilzen

Zum Nachweis möglicher antibiotischer bzw. antimykotischer Aktivität wurden Methylindol-3-Carboxylat (L2), L3, 5-Carboxymellein (L7-1) und 8,9-Dehydroxylaron (L8) zunächst gegenüber den Organismen *Bacillus brevis*, *Enterobacter dissolvens*, *Micrococcus luteus*, *Mucor miehi*, *Nematospora coryli*, *Penicillium notatum* und *Paecilomyces variotii* auf eine Wachstumsinhibition dieser getestet. Dazu wurden L2, L3, L7-1 und L8 in MeOH *p.a.* gelöst, auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und auf die Filterrondelle, welche zuvor auf den verschiedenen Testplatten platziert wurden, aufgetragen (2.5.1). Nach einer Inkubation von 24 – 48 h bei dem entsprechenden Temperaturoptimum des jeweiligen Organismus (2.2.2) erfolgte die Auswertung. Dabei konnte keine Aktivität gegenüber den oben genannten Testorganismen beobachtet werden.

3.3.4.2 Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest gegenüber Pilzen, Oomyceten und Pflanzen

Zur Testung möglicher keimungs- und wachstumsinhibierender Wirkung der Substanzen Methylindol-3-Carboxylat (L2), L3 und 5-Carboxymellein (L7-1) gegenüber den Organismen *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Phytophthora infestans* sowie *Setaria italica* und *Lepidium sativum* wurden diese zunächst in MeOH *p.a.* oder EtOH *p.a.* rückgelöst, auf die jeweilige Konzentration eingestellt und dann in die Vertiefungen der Well-Platten vorgelegt (2.5.2). Nach Evaporation des Lösungsmittels wurden die entsprechenden Sporen- bzw. Konidien suspensionen (Tab. 13) oder die jeweiligen Pflanzensamen hinzugefügt und anschließend bis zur Auswertung bei dem jeweiligen Temperaturoptimum inkubiert (2.2.2). Es konnte keine Aktivität gegenüber den oben genannten Testorganismen beobachtet werden. Substanz L8 konnte aufgrund der geringen Menge nicht mitgeführt werden.

3.3.4.3 Toxizitäts-Assay gegenüber Zellen

Um die Substanzen Methylindol-3-Carboxylat (L2), L3 und 5-Carboxymellein (L7-1) auf eine mögliche toxische Aktivität gegenüber Humanzellen zu testen, wurde diese am IBWF gegenüber HeLa S3 Zellen getestet. L2, L3 und L7-1 wurden in DMSO rückgelöst, auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und zu den Zellen zugegeben (2.5.3). Nach 72-stündiger Inkubation bei RT erfolgte die Auswertung. Es konnte keine Aktivität festgestellt werden. Substanz L8 konnte aufgrund der geringen Menge nicht mitgeführt werden.

3.3.4.4 Wachstums- und Biofilm-Assay

Für den Nachweis einer inhibitorischen Aktivität gegenüber verschiedenen Biofilmen wurden die Reinsubstanzen Methylindol-3-Carboxylat (L2), 5-Carboxymellein (L7-1) und 8,9-Dehydroxylaron (L8) zunächst in MeOH *p.a.* gelöst und auf Konzentrationen von 1 µg, 10 µg und 100 µg eingestellt. L3 konnte nicht getestet werden, da nicht genug Reinsubstanz vorlag. Im Anschluss übernahm die AG Heermann am IMP der Johannes Gutenberg-Universität Mainz die Durchführung des Biofilm-Assays (2.5.4).

Durch die Zugabe von Methylindol-3-Carboxylat konnte trotz des im Vergleich zur Kontrolle (*P. aeruginosa* PA 01 DSM 19880 kultiviert in TSB-Medium) überwiegend stärkeren Wachstums von *Pseudomonas aeruginosa* PA 01 DSM 19880 eine Reduktion der Biofilmbildung von ca. 16 % detektiert werden (6.5.1, Abb. 126). Bei *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 konnte ebenfalls eine Reduktion von ca. 14 % detektiert werden (6.5.1, Abb. 127), wobei das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle geringer war (6.5.1, Abb. 122).

Für 5-Carboxymellein konnte sowohl bei *P. aeruginosa* PA 01 DSM 19880 mit 143 %, wie auch bei *P. aeruginosa* PA 01 DSM 19880 mit 220 % eine Zunahme der Biofilmbildung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle detektiert werden (6.5.2. Abb. 126 & 127). Wobei die Biofilmbildung anhand der gemessenen Absorptionswerte von 0,84 (OD₅₇₅) und 0,47 (OD₅₇₅), auf Grundlage der in Tabelle 14 (2.5.4) gelisteten Werte, als schwache Biofilmbildung einzustufen ist. Bei beiden *P. aeruginosa* Stämmen konnte trotz Zugabe von L7-1 ein ähnliches Wachstumsverhalten im Vergleich zu den Kontrollen detektiert werden (6.5.1, Abb. 124).

Bei *Pseudomonas aeruginosa* PA 01 DSM 19880 konnte durch die Zugabe von 8,9-Dehydroxylaron mit 105 % nahezu keine Zunahme im Vergleich zur Kontrolle (*P. aeruginosa* PA 01 DSM 19880 kultiviert in TSB-Medium) detektiert werden (6.5.2, Abb. 126). Bei *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 DSM 19982 wurde mit 142 % eine Zunahme Biofilms detektiert (6.5.2, Abb. 127), wobei dies aufgrund des gemessenen Absorptionswertes von 0,3 (OD₅₇₅), im Vergleich zu den in Tabelle 14 (2.5.4) gelisteten Werten, als schwache Biofilmbildung einzustufen ist. Das Wachstumsverhalten beider *P. aeruginosa* Stämme war trotz Zugabe von L8 ähnlich zu dem der Kontrollen (6.5.1, Abb. 125).

3.4. Fermentation von *Chaetomium leptoderma* mit industriellem Ligninabfall

3.4.1 Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat und Isolierung neuer phenolischer Substanzen

Chaetomium leptoderma ist ein Ascomycet, welcher zu den Schimmelpilzen gehört. Die Gattung *Chaetomium* wird besonders häufig im Boden, auf zellulosereichem Material oder Dung gefunden und ist dafür bekannt Zellulose abbauen zu können (Yadav und Bagool, 2015; Ahmed et al., 2016). *Chaetomium leptoderma* wurde eigenständig isoliert und mittels ITS-Sequenzierung identifiziert (6.1).

C. leptoderma wurde für 14 Tage in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (MM + LigS) kultiviert, wobei am Ende der pH- und Glukosewert sowie die Laccase- und Peroxidase-Aktivität im Kulturfiltrat (KF) mittels ABTS-Test bestimmt wurde (2.4.2). Im Anschluss an die Kultivierung wurde die gesamte Kultur mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat extrahiert (2.3.2) und anschließend der aufbereitete Rohextrakt (RE) mittels HPLC analysiert (2.3.3.1). Innerhalb der zweiwöchigen Kultivierung war die freie Glukose im Medium vollständig verbraucht und der pH-Wert stieg auf 8,92 an. Eine geringe Laccase-Aktivität von 20 mU/L konnte ebenfalls detektiert werden. Anhand des Vergleichs des Chromatogramms des RE von *C. leptoderma* kultiviert in MM + LigS mit dem der Kontrollen (MM, MM + LigS sowie *C. leptoderma* kultiviert in MM (6.2.6, Abb. 97) konnte der Abbau des Magnesium-Lignosulfonats sowie zwei neue Signale bei einer Rt von 16,4 min (Substanz L4) und Rt 18,4 min (Substanz L5) detektiert werden (Abb. 47). Durch eine anschließende HPLC-MS-Messung des RE konnte für L4 eine Masse von 314 m/z und für L5 eine Masse von 298 m/z bestimmt werden (Abb. 48 & 49). Die dazugehörigen UV-Spektren sind in den Abbildungen 48 und 49 zu sehen. Ein Abgleich mit der Datenbank der AG Thines sowie des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF) ergab keine Übereinstimmung.

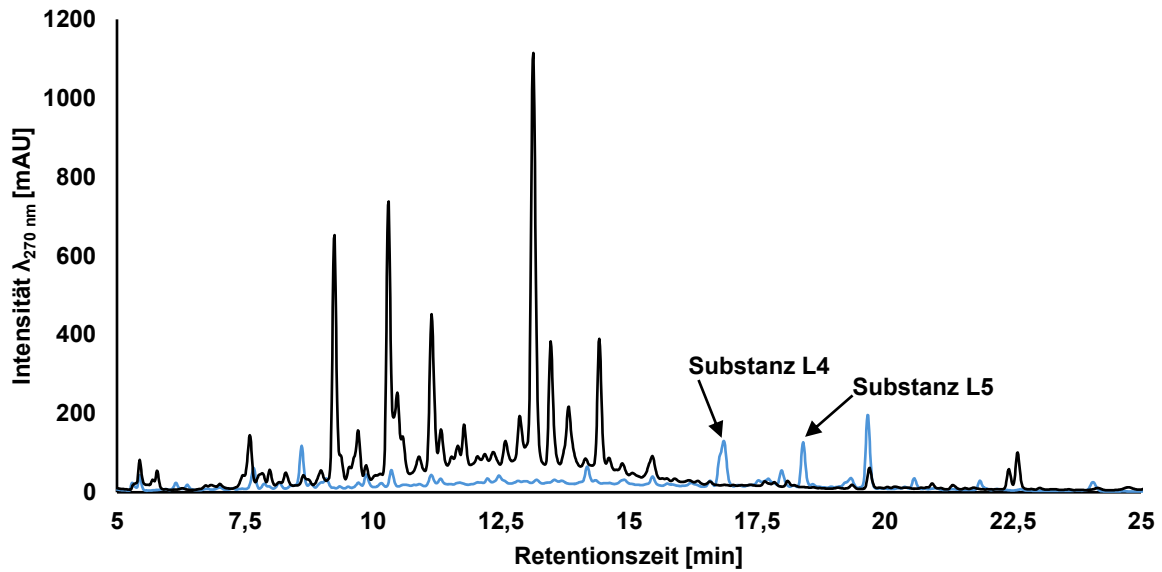


Abbildung 47: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurden die Substanzen L4 mit einer Retentionszeit von 16,8 Minuten und L5 bei 18,4 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

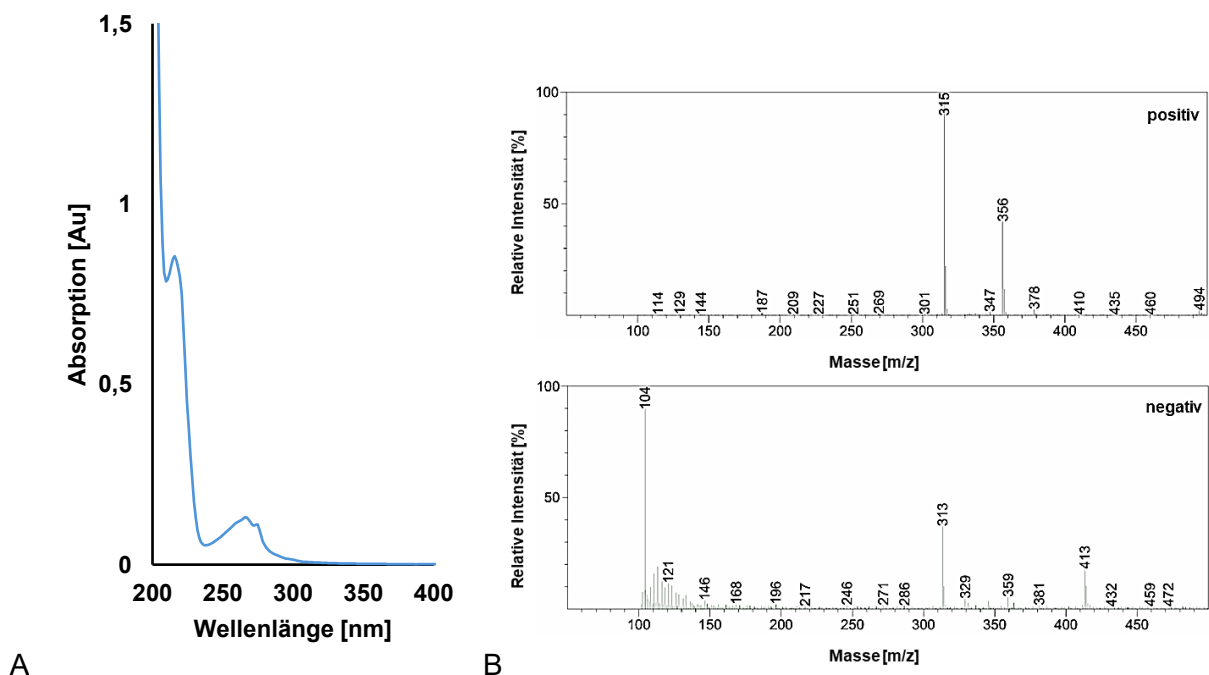


Abbildung 48: UV- (A) und Massenspektren (B) von Substanz L4 aus dem Rohextrakt von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat. Für Substanz L4 konnte eine Masse von 314 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) an der HPLC-MS aufgenommen.

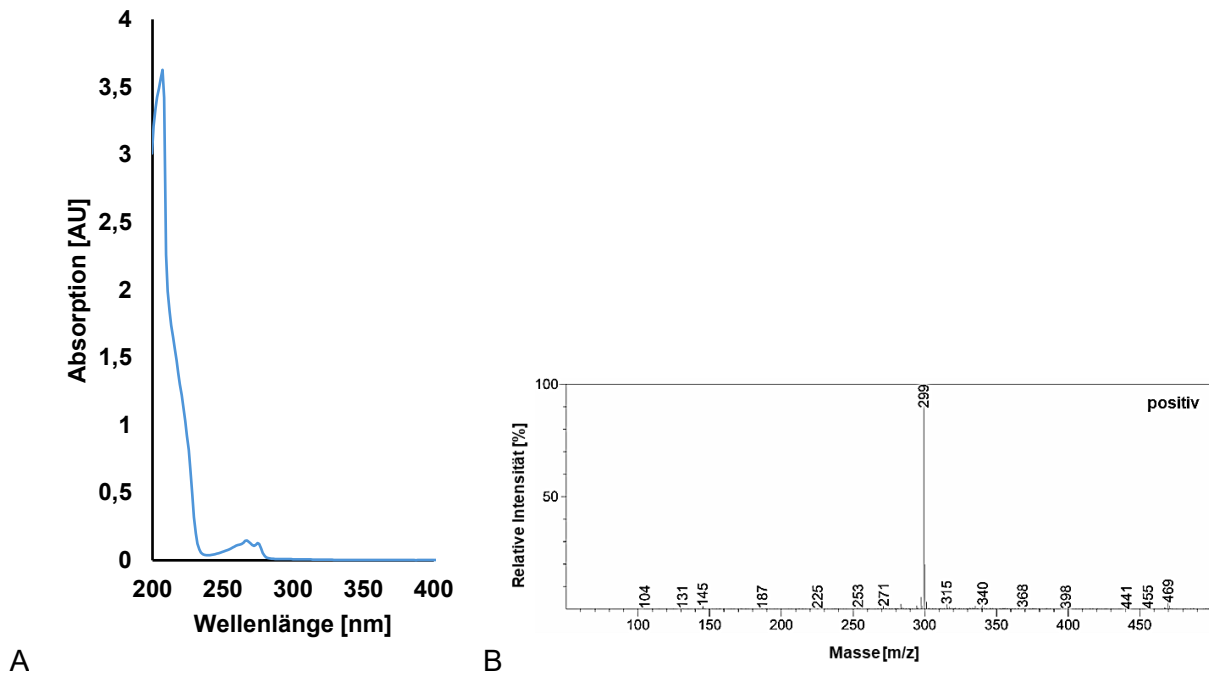


Abbildung 49: UV- (A) und Massenspektrum (B) von Substanz L5 aus dem Rohextrakt von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat. Für Substanz L5 konnte eine Masse von 298 m/z detektiert werden. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

Für die Aufreinigung der Substanzen L4 und L5 wurde der RE einer nachfolgenden 20 L Fermentation verwendet (2.3.1.2). Nach zweiwöchiger Fermentation wurde die gesamte Kultur mit Ethylacetat Flüssig-Flüssig extrahiert (2.3.2) und der RE im Anschluss mittels Kieselgelchromatographie (2.3.2.1) aufgereinigt. L4 befand sich in Fraktion 3, wohingegen L5 in Fraktion 4 detektierbar war. Die Fraktionen 3 und 4 wurden mittels präparativer HPLC weiter aufgereinigt (2.3.3.2), wobei am Ende alle Substanzen isoliert vorlagen. Anhand der nachfolgenden Messung an der HPLC-MS konnten die bereits zuvor analysierten Massen von 314 m/z für L4 und 298 m/z für L5 wiederum bestätigt werden. Die Substanzen wurden dann zur vollständigen Strukturaufklärung an den Fachbereich Chemie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz übergeben (6.4.4, Abb. 116 & 117). Diese konnten für die Substanz L4 eine Summenformel von $C_{20}H_{26}O_3$ analysieren und sie als 7-oxo-Dehydroabietinsäure identifizieren (Abb. 50). Für Substanz L5 konnte aufgrund zu geringfügiger Menge keine Strukturaufklärung erfolgen.

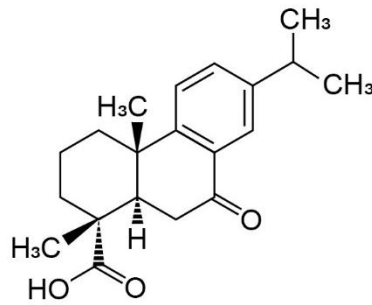


Abbildung 50: Chemische Struktur von 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) aus der Fermentation von *Chaetomium leptoderma* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat.

3.4.2. Fermentation mit Kraftlignin

Chaetomium leptoderma wurde ebenso für 14 Tage in Minimalmedium mit Kraftlignin (MM + KL) kultiviert. Dabei wurden keine Fermentationsparameter analysiert. Nach Extraktion der gesamten Kultur mit Ethylacetat wurde der RE mittels HPLC analysiert. Anhand des Abgleichs des Chromatogramms des aufbereiteten RE mit dem der Kontroll-Chromatogramme (MM, MM + KL, *C. leptoderma* kultiviert in MM, (6.2.6, Abb. 98) kann festgestellt werden, dass die signifikanten Signale des Kraftlignins bei Rt 11,1 min und 15,4 min abgebaut wurden und ein neues Signal bei Rt 16,8 min entstand (Abb. 51). Aufgrund des zuvor in der Kultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat detektierten Signals bei Rt 16,8 min (Substanz L4) (Abb. 47), wurde vermutet, dass es sich um das gleiche Signal handelt. Der Abgleich der UV-Spektren (Abb. 52), sowie die Massen-Analyse mittels HPLC-MS bestätigten dies (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf eine weitere Aufreinigung und Isolierung der Substanz verzichtet.

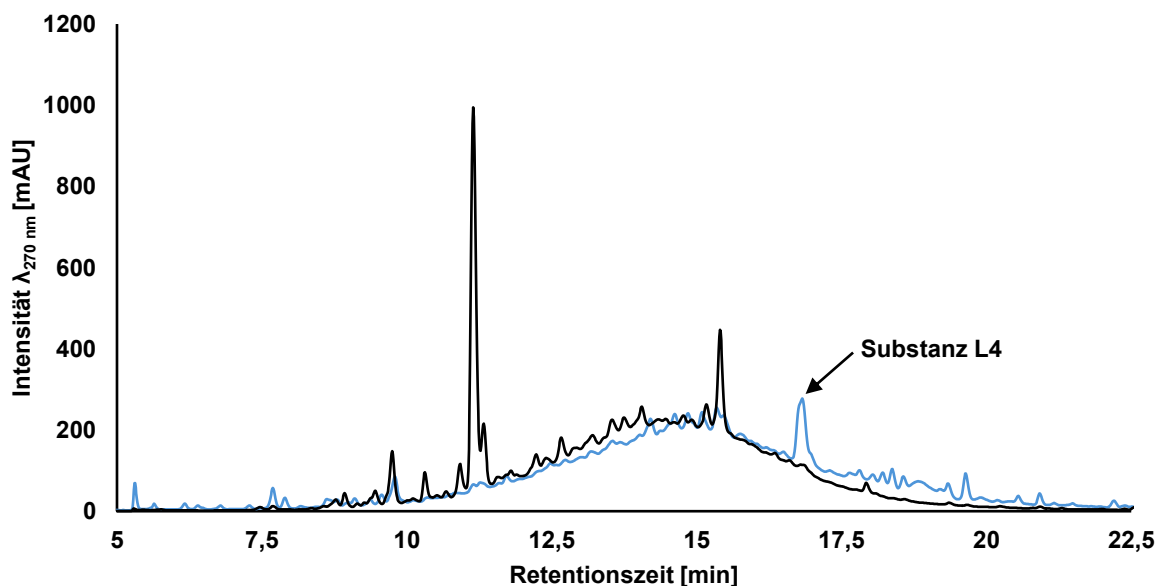


Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz). Detektiert wurde Substanz L4 mit einer Retentionszeit von 16,8 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

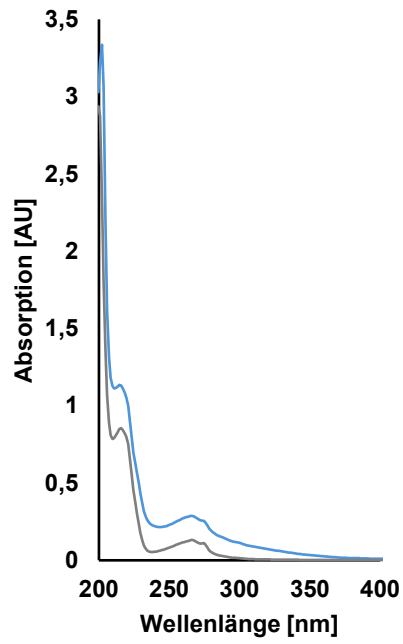


Abbildung 52: UV-Spektren der Substanz L4 aus dem Rohextrakt von *Chaetomium leptoderma* nach zweiwöchiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) und Minimalmedium mit Lignosulfonat (grau) im Vergleich. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

3.4.3 Fermentations-Monitoring mit quanti- und qualitativem Enzymtest

Anhand des Fermentations-Monitorings, welches über 14 Tage in 5 L-Kolben durchgeführt wurde, wurden täglich der pH- und Glukosewert, die Enzymaktivität der Laccasen und Peroxidasen im KF mittels ABTS-Test sowie die Menge an L4 und L5 analysiert (Abb. 53). Dazu wurden täglich 150 mL Probe entnommen, alle Parameter bestimmt, eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat durchgeführt und der RE mittels HPLC analysiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die freie Glukose im Medium nach 72 h vollständig verbraucht war. Der pH-Wert stieg mit zunehmender Kultivierungszeit von 6,62 zu Beginn auf 8,92 am Ende kontinuierlich im alkalischen Bereich an. Die Substanzen L4 und L5 konnten bereits nach 24 h mit 4,4 mg/L (L4) und 3,4 mg/L (L5) detektiert werden. In den nachfolgenden Tagen ist die Substanzmenge bei Konzentrationen zwischen 2,2 mg/L und 3,5 mg/L geschwankt. An Tag 6 konnte das erste Minimum mit jeweils 1,3 mg/L für L4 und L5 beobachtet werden. Danach stieg die Substanzmenge wieder kurzzeitig an, bis an Tag 9 ein zweites Minimum mit 1 mg/L für L4 und 1,2 mg/L für L5 verzeichnet wurde. An den restlichen Tagen konnte immer wieder eine Zu- und Abnahme beobachtet werden, bis schließlich an Tag 14 ein Maximum von 4,9 mg/L für L4 und 5,5 mg/L für L5 verzeichnet wurde. Zu Beginn konnte zunächst eine zunehmende Peroxidase-Aktivität beobachtet werden, welche an Tag 5 ihr Maximum von 29 mU/L erreichte. An Tag 6 sank die Peroxidase-Aktivität auf 4 mU/L. Ab Tag 7 konnte über den restlichen Kultivierungszeitraum hinweg nur Laccase-Aktivität gemessen werden. Diese stieg bis zu ihrem Maximum von 17 mU/L an Tag 10 an, um dann bis Tag 13 (2 mU/L) kontinuierlich abzunehmen. Am letzten Tag stieg die Laccase-Aktivität nochmals auf 9 mU/L an.

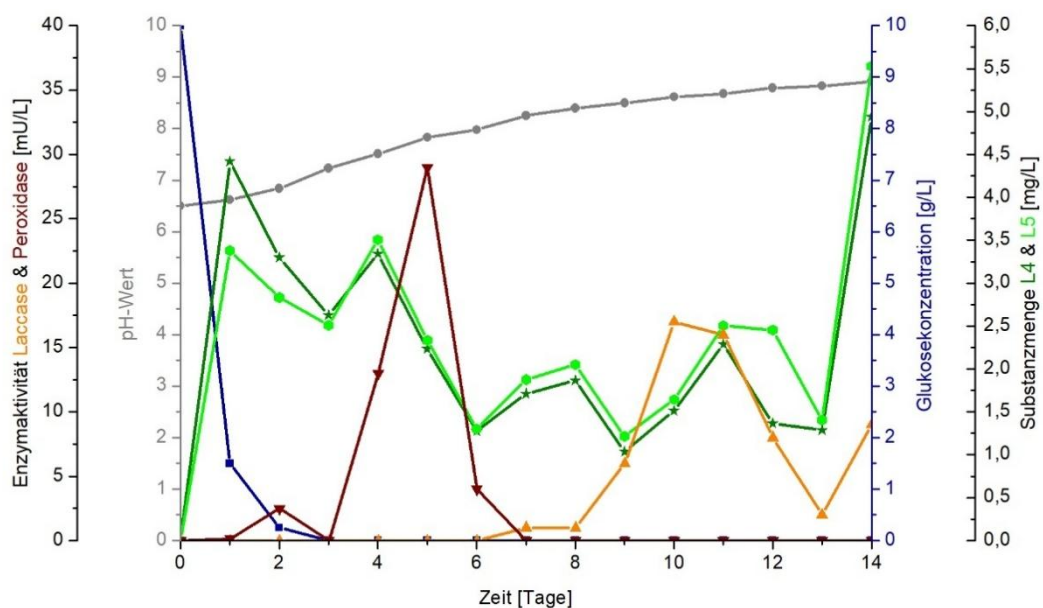


Abbildung 53: Fermentationsverlauf von *Chaetomium leptoderma* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab. Abgebildet sind die pH-Werte (grau), die Glukosekonzentration in g/L (blau), die Substanzmenge von L4 (dunkelgrün) und L5 (hellgrün) in mg/L sowie die Laccase- (orange) und Peroxidase-Aktivität (dunkelrot) in mU/L. Erstellt mit Origin 7.5.

3.4.3.1 Qualitativer Nachweis extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme

Um die Aktivität noch anderer am extrazellulären Ligninabbau beteiligten Enzyme, wie z.B. die Polyphenoloxidasen oder die Lignin- bzw. Manganabhängigen Peroxidasen, nachweisen zu können, wurde ein qualitativer Enzymtest auf Agarplatten nach Pointing (1999) durchgeführt. Das dafür verwendete *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen, für die jeweiligen Enzyme charakteristischen Substraten, versetzt (2.1.7). Die Entfärbung von Poly R impliziert die Anwesenheit von Polyphenoloxidasen, Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Die Verfärbung von ABTS weist die Aktivität von Laccasen nach und die Verfärbung von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängigen Peroxidasen. Für den Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen wurden LBM-Platten mit Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) versetzt. Alle Platten wurden mit gleichgroßen Stücken von *Chaetomium leptoderma* inokuliert und anschließend für 10 Tage bei RT inkubiert (2.4.1). Nach der Inkubationszeit konnte wie in Abbildung 54 zu sehen im Vergleich zur Negativkontrolle, *Penicillium steckii* IBWF 104-06, eine starke blaue Verfärbung der LBM-ABTS-Platte beobachtet werden, was auf eine Laccase-Aktivität hinweist. Bei den Platten mit Poly R konnte keine Entfärbung beobachtet werden, jedoch auf der Platte mit Azur B. Ebenfalls stark verfärbt waren die Platten mit LigS und KL zum Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen.

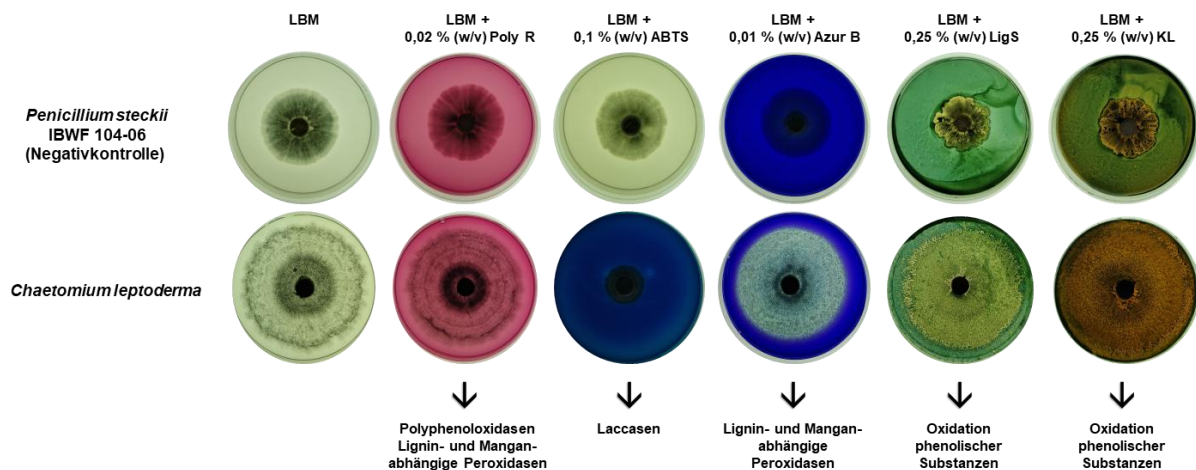


Abbildung 54: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Chaetomium leptoderma*. *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen Substraten versetzt und mit *C. leptoderma* inokuliert, um extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme nachzuweisen. Die Entfärbung von Poly R weist Polyphenoloxidasen und Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen nach. Die Verfärbung von ABTS weist Laccasen nach und die von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen. Zum Nachweis der Oxidation phenolischer Komponenten wurden Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) verwendet. Als Wachstumskontrolle wurde eine LBM-Platte ohne Zusätze inokuliert und als Negativkontrolle wurde *Penicillium steckii* IBWF 104-06 mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über 10 Tage bei RT. Angesetzt in Triplikaten.

3.4.4 Biologische Charakterisierung der Substanzen L4 und L5

Zur näheren biologischen Charakterisierung der von *Cheatomium leptoderma* während der Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat produzierten Substanzen 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) und L5 wurden diese gegenüber verschiedenen Organismen, wie z.B. Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Zellen, getestet. Dazu wurde zunächst ein Agardiffusionstest (2.5.1) durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte ein Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest (2.5.2) am Institut für Biotechnologie und Wirkstoffforschung (IBWF), ein Biofilm-Assay (2.5.4) durchgeführt von der AG Heermann am IMP an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz sowie ein Toxizitäts-Assay (2.5.3) gegenüber Humanzellen am IBWF.

3.4.4.1 Agardiffusionstest gegenüber Bakterien und Pilzen

Zum Nachweis möglicher antibiotischer bzw. antimykotischer Aktivität wurden 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) und L5 zunächst gegenüber den Organismen *Bacillus brevis*, *Enterobacter dissolvens*, *Micrococcus luteus*, *Mucor miehi*, *Nematospora coryli*, *Penicillium notatum* und *Paecilomyces variotii* auf eine Wachstumsinhibition dieser getestet. Dazu wurden L4 und L5 in MeOH *p.a.* gelöst, auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und auf die Filterrondelle, welche zuvor auf den verschiedenen Testplatten platziert wurden, aufgetragen (2.5.1). Nach einer Inkubation von 24 – 48 h bei dem entsprechenden Temperaturoptimum des jeweiligen Organismus (2.2.2) erfolgte die Auswertung. Dabei konnte für L4 eine Aktivität gegenüber *Bacillus brevis* mit einer Menge von 100 µg (Ø 0,3 cm) und 50 µg (Ø 0,2 cm) beobachtet werden. Eine Wiederholung am IBWF konnte das Ergebnis nicht bestätigen.

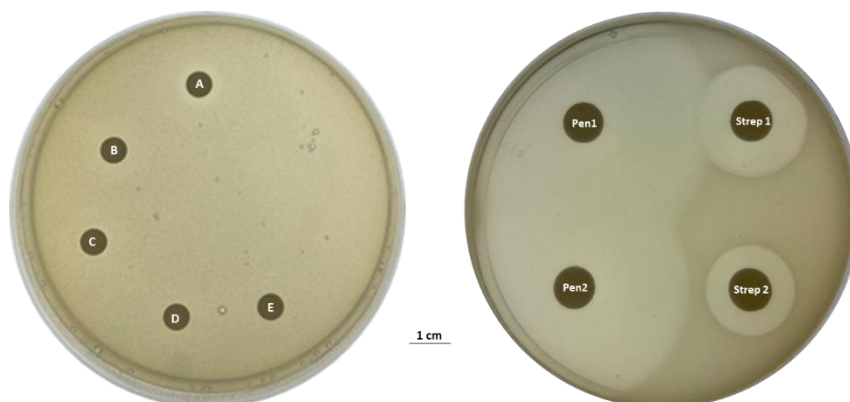


Abbildung 55: Fotografische Dokumentation des Agardiffusionstest der Substanz 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) (links) gegenüber *Bacillus brevis* im Vergleich zu den Kontrollen (rechts). Folgende Mengen von 7-Oxodehydroabietinsäure (L4) wurden aufgetragen: 1 µg (E), 10 µg (D), 25 µg (C), 50 µg (B) und 100 µg (A). Als Positivkontrolle diente 20 µg (Pen2) und 100 µg (Pen1) Penicillin sowie 20 µg (Strep2) und 100 µg (Strep1) Streptomycinsulfat. Angesetzt in Triplikaten.

3.4.4.2 Keimungs- und Wachstumsinhibitionstest gegenüber Pilzen, Oomyceten und Pflanzen

Zur Testung möglicher keimungs- und wachstumsinhibierender Wirkung der Substanzen 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) und L5 gegenüber den Organismen *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Phytophthora infestans* sowie *Setaria italica* und *Lepidium sativum* wurden diese zunächst in MeOH *p.a.* oder EtOH *p.a.* rückgelöst, auf die jeweilige Konzentration eingestellt und dann in die Well-Platten vorgelegt (2.5.2). Nach Evaporation des Lösungsmittels wurden die entsprechenden Sporen- bzw. Konidiensuspensionen (Tab. 13) oder die jeweiligen Pflanzensamen hinzugefügt und anschließend bis zur Auswertung bei dem jeweiligen Temperaturoptimum inkubiert (2.2.2). Es konnte keine Aktivität gegenüber den oben genannten Testorganismen beobachtet werden.

3.4.4.3 Toxizitäts-Assay gegenüber Zellen

Um die Substanzen 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) und L5 auf eine mögliche Aktivität gegenüber Humanzellen zu testen, wurde diese am IBWF gegenüber HeLa S3 Zellen getestet. L4 und L5 wurden in DMSO rückgelöst, auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und zu den Zellen zugegeben (2.5.3). Nach 72-stündiger Inkubation bei RT erfolgte die Auswertung. Es konnte keine Aktivität festgestellt werden.

3.4.4.4 Wachstums- und Biofilm-Assay

Für den Nachweis einer inhibitorischen Aktivität gegenüber verschiedenen Biofilmen wurde die Reinsubstanz L5 zunächst in MeOH *p.a.* gelöst und auf Konzentrationen von 1 µg, 10 µg und 100 µg eingestellt. 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) konnte nicht getestet werden, da nicht genug Reinsubstanz vorlag. Im Anschluss übernahm die AG Heermann am IMP der Johannes Gutenberg-Universität Mainz die Durchführung des Biofilm-Assays (2.5.4). Dabei konnte mit 34 % die stärkste Biofilm-Reduktion aller getesteten Substanzen gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* PA 01 DSM 19880 im Vergleich zur Kontrolle (*P. aeruginosa* PA 01 DSM 19880 kultiviert in TSB-Medium) beobachtet werden (6.5.2, Abb. 126). Für *Pseudomonas aeruginosa* PA 14 DSM 19982 hingegen konnte mit 154 % eine Zunahme der Biofilmbildung beobachtet werden (6.5.2, Abb. 127). Anhand des gemessenen Absorptionswertes von 0,33 (OD₅₇₅) ist dies jedoch, unter Berücksichtigung der in Tabelle 14 (2.5.4) gelisteten Werte, als schwache Biofilmbildung einzustufen. Insgesamt war das Wachstumsverhalten beider *P. aeruginosa* Stämme trotz Zugabe von L5 ähnlich zu dem der Kontrollen (6.5.1, Abb. 123).

3.5 Fermentation von *Pleurotus pulmonarius* mit industriellem Ligninabfall

3.5.1 Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat

Pleurotus pulmonarius, auch Lugen-Seitling genannt, wurde eigenständig isoliert und molekularbiologisch sowie morphologisch charakterisiert (6.1). Er gehört zu den drei weltweit am meisten kultivierten essbaren Pilzen. *P. pulmonarius* ist ein saprophytischer Basidiomycet, der für seine Holzabbauenden-Fähigkeiten und die Produktion von lignolytischen Enzymen bekannt ist (dos Santos Bazanella *et al.*, 2013; Wood und Smith, 1987).

Nach 14-tägiger Kultivierung in MM + LigS wurde der pH- und Glukosewert sowie die Laccase- und Peroxidase-Aktivität im KF mittels ABTS-Test bestimmt (2.4.2). Im Anschluss daran wurde die gesamte Kultur mit Ethylacetat vollständig extrahiert (2.3.2). Innerhalb der zweiwöchigen Kultivierung hat sich der pH-Wert mit 6,0 am Ende nicht wesentlich verändert zu dem Ausgangswert von 6,5. Freie Glukose war ebenfalls noch vorhanden (1,5 g/L), zudem konnte eine Laccase-Aktivität von 0,76 U/L gemessen werden. Der aufbereitete RE wurde mittels HPLC analysiert (2.3.3.1), wobei der Abbau des Magnesium-Lignosulfonats anhand des Abgleichs der Chromatogramme der Kontrollen, MM + LigS, MM und *P. pulmonarius* kultiviert in MM, mit dem des aufbereiteten RE (*P. pulmonarius* kultiviert in MM + LigS) detektiert werden konnte (6.2.7, Abb. 99). Des Weiteren wurde im RE ein im Vergleich zu den Kontrollen neues Signal bei Rt 14,5 min beobachtet. Da das dazugehörige UV-Spektrum aussah wie das der Substanzen P1 und P2 (Abb. 57) und diese ebenfalls eine Rt von 14,5 min hatten, wurde nachfolgend eine Massenbestimmung mittels HPLC-MS-Analyse durchgeführt. Anhand dieser konnte für das neue Signal bei Rt 14,5 min eine Masse von 330 m/z detektiert werden (Daten nicht gezeigt), die ebenfalls mit der Masse der Substanzen P1 und P2 übereinstimmt. Nach abschließendem Abgleich der Daten konnte eindeutig festgestellt werden, dass es sich bei dem Signal bei Rt 14,5 min um die Substanzen P1 und P2 handelt. *P. pulmonarius* kann aus Magnesium-Lignosulfonat, ebenso wie *Agrocybe pediades*, P1 und P2 produzieren. Auf eine weitere Aufreinigung sowie Isolierung der Substanzen wurde daher verzichtet.

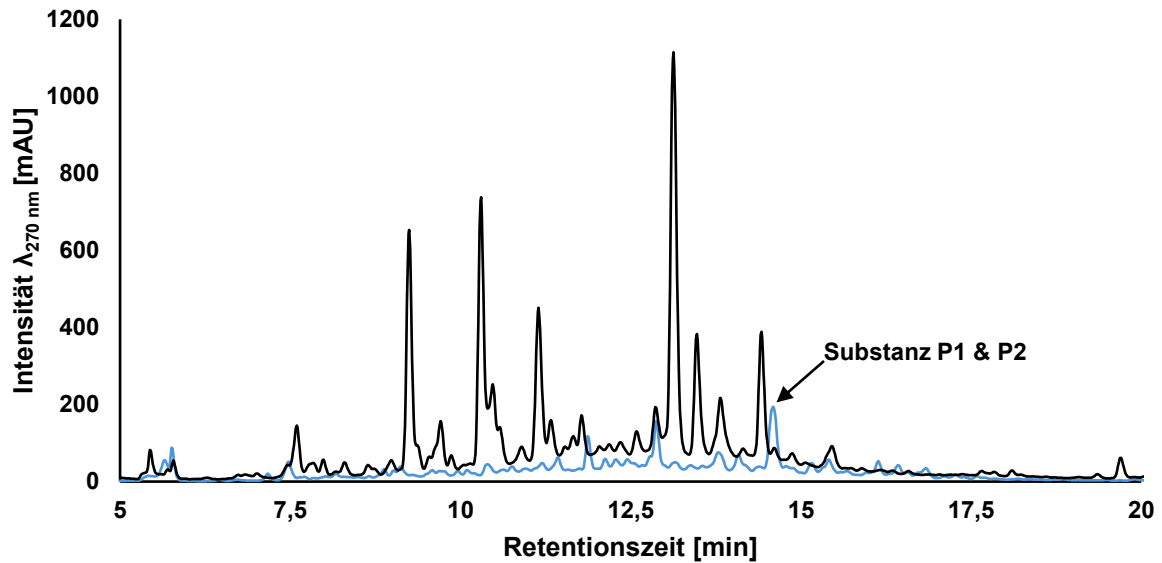


Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pleurotus pulmonarius* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

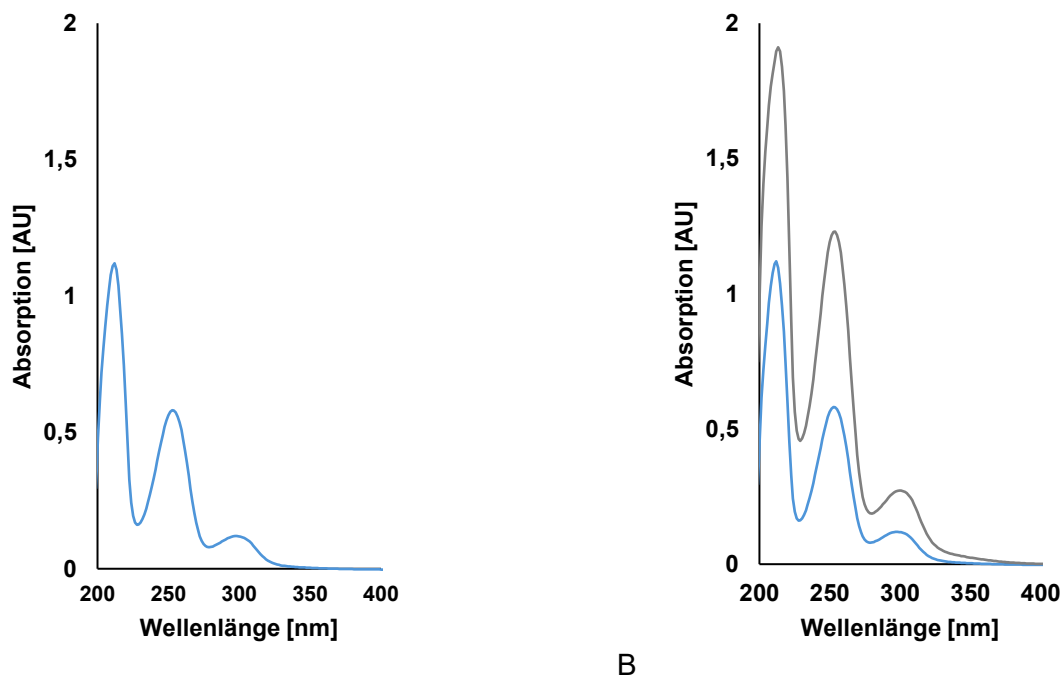


Abbildung 57: UV-Spektren des Signals bei Retentionszeit 14,5 Minuten aus dem Rohextrakt von *Pleurotus pulmonarius* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (A) im Vergleich zu der Substanz P1 und P2 von *Agroclybe pediades* (B). Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

3.5.2 Fermentation mit Kraftlignin und Isolierung einer neuen phenolischen Substanz

Eine Kultivierung in MM + KL wurde ebenfalls durchgeführt. Nach 14 Tagen wurde der pH- und Glukosewert sowie die Laccase- und Peroxidase-Aktivität mittels ABTS-Test bestimmt (2.4.2). Dabei sank der pH-Wert von dem zuvor eingestellten Wert 6,5 auf 5,93. Die Glukose war mit Erreichen des Fermentationsende noch nicht gänzlich verbraucht (0,5 g/L). Mit 1,9 U/L wurde eine höhere Laccase-Aktivität gemessen als bei der Kultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat (0,7 U/L). Die Kultur wurde im Anschluss mit Ethylacetat vollständig extrahiert (2.3.2) und der RE an der analytischen HPLC analysiert (2.3.3.1). Durch den Abgleich des RE-Chromatogramms mit dem der Kontroll-Chromatogramme (MM, MM + KL, *P. pulmonarius* kultiviert in MM (6.2.7, Abb. 100) konnte ein fast vollständiger Abbau des Kraftlignins sowie zwei neu entstandene Signale bei RT 14,1 min und 14,6 min beobachtet werden (Abb. 58). Aufgrund des zuvor in der Kultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat detektierten Signals bei Rt 14,5 min, wurde vermutet, dass es sich bei dem Signal bei Rt 14,6 min wiederum um die Substanzen P1 und P2 handelt. Der Abgleich des UV-Spektrums (Abb. 59), sowie die Massen-Analyse (Daten nicht gezeigt) mittels HPLC-MS bestätigten dies. Das zweite Signal bei Rt 14,1 min (Substanz A1) hingegen wurde zuvor noch nicht beobachtet, weder in der Kultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat noch bei einem anderen Pilzisolat. Eine eindeutige HPLC-MS-Messung zur Bestimmung der Masse war anhand des RE nicht möglich, sodass zunächst im 20 L-Maßstab fermentiert wurde (2.3.1.2). Im Anschluss wurde die Substanz A1 mittels präparativer HPLC (2.3.3.2) aufgereinigt. Eine erneute Messung an der HPLC-MS ergab daraufhin eine Masse von 177 m/z (Abb. 60). Da ein Abgleich mit der Datenbank der AG Thines sowie des IBWF keine Übereinstimmung ergab, übernahm der Fachbereich Chemie (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) die NMR-spektroskopische Analyse (6.4.5, Abb. 118 & 119). Diese bestätigten die Masse von 177 m/z und konnten die Struktur vollständig aufklären (Abb. 61). Substanz A1 ist Anisaldehyd. Anisaldehyd hat in reiner Form eine Masse von 136 m/z. Die zusätzlichen 41 m/z stammen von dem Acetonitril-Addukt, welches durch die zuvor durchgeführte Aufreinigung entstanden ist.

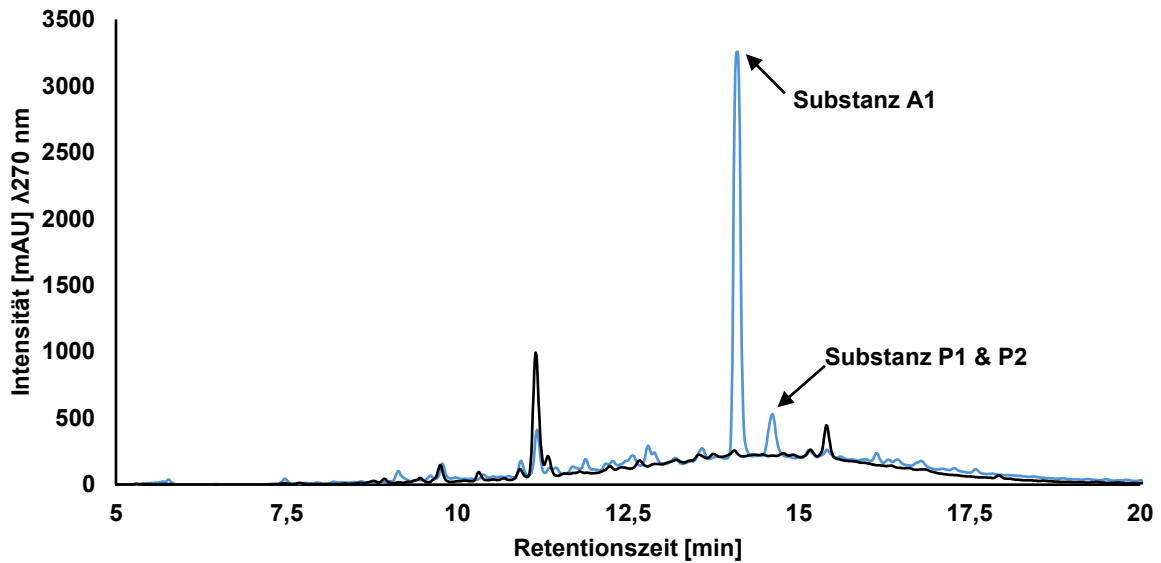


Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pleurotus pulmonarius* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz). Detektiert wurden die Substanz A1 bei einer Retentionszeit von 14,1 min und die Substanzen P1 und P2 bei einer Retentionszeit von 14,6 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

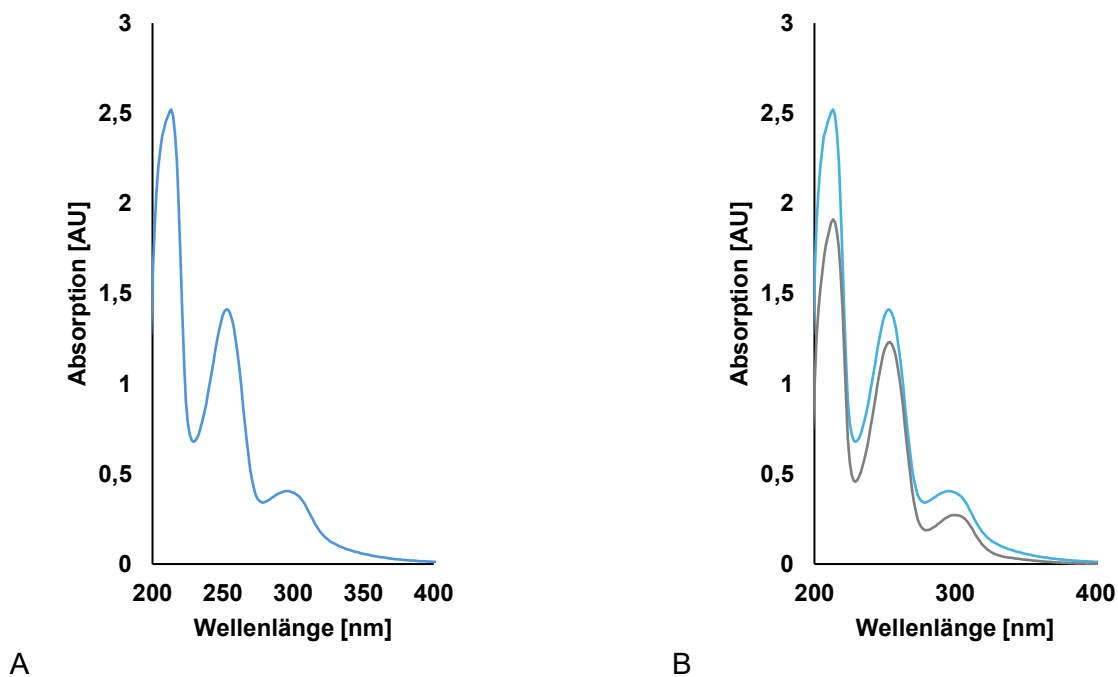


Abbildung 59: UV-Spektren von Substanz P1 und P2 aus dem Rohextrakt von *Pleurotus pulmonarius* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (A) im Vergleich zu der Substanz P1 und P2 von *Agrocybe pediades* (B). Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

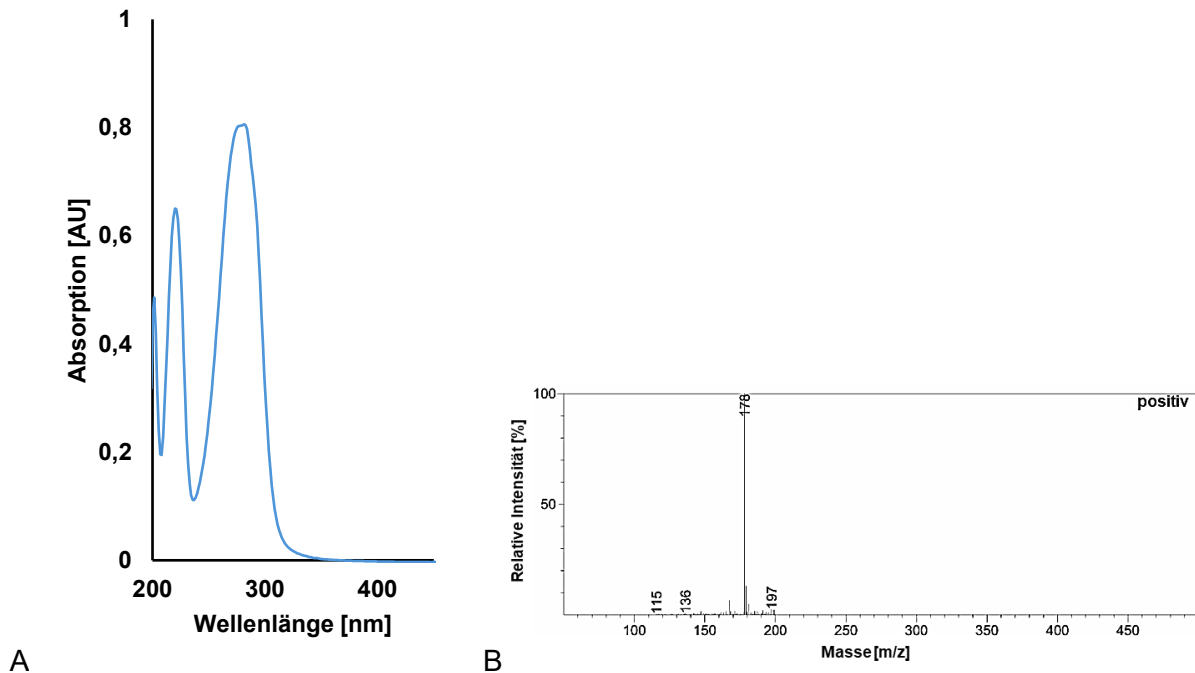


Abbildung 60: UV- (A) und Massenspektrum (B) von Substanz A1 aus dem Rohextrakt von *Pleurotus pulmonarius* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

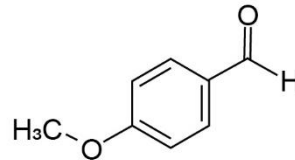


Abbildung 61: Chemische Struktur von Anisaldehyd (Substanz A1) aus der Fermentation von *Pleurotus pulmonarius* in Minimalmedium mit Kraftlignin.

3.5.3 Fermentations-Monitoring mit quanti- und qualitativem Enzymtest

Während des 14-tägigen Fermentations-Monitoring, welches in einem 5 L-Kolben durchgeführt wurde, wurden der pH- und Glukosewert, die Enzymaktivität der Laccasen und Peroxidasen im KF mittels ABTS-Test (2.4.2) sowie die produzierte Menge an A1 analysiert (Abb. 63). Alle zwei Tage wurde dazu eine 150 mL Probe entnommen und nach dem Bestimmen aller Parameter mit Ethylacetat Flüssig-Flüssig extrahiert (2.3.2) und im Anschluss der RE mittels HPLC analysiert (2.3.3.1). Der pH-Wert nahm über die Kultivierungszeit hinweg von zu Beginn 6,76 kontinuierlich ab und erreichte ein Minimum an Tag 12 mit 5,69. Am letzten Tag stieg er nochmals auf 5,76 an. Die freie Glukose wurde innerhalb der 14-tägigen Kultivierung nicht vollständig aufgebraucht und betrug am Ende noch 5 g/L. Bereits nach 48 h konnte A1 mittels HPLC mit einem Wert von 0,01 mg/L detektiert werden.

Die Menge an A1 nahm mit fortschreitendem Fermentationsverlauf zu und erreichte ein Maximum mit 3,9 mg/L an Tag 10. Im Anschluss daran sank die Menge auf 1,6 mg/L an Tag 12 bzw. 1,5 mg/L an Tag 14 ab. Ähnlich war dies auch bei der Laccase-Aktivität zu beobachten. Diese nahm zu Beginn stetig zu und erreichte ein Maximum an Tag 6 mit 20,3 U/L. Im Anschluss sank diese auf 0,06 U/L an Tag 10 auf ein Minimum ab, um dann wieder leicht anzusteigen auf 1,6 U/L an Tag 12 und 1,5 U/L an Tag 14. Peroxidase-Aktivität konnte nicht detektiert werden.

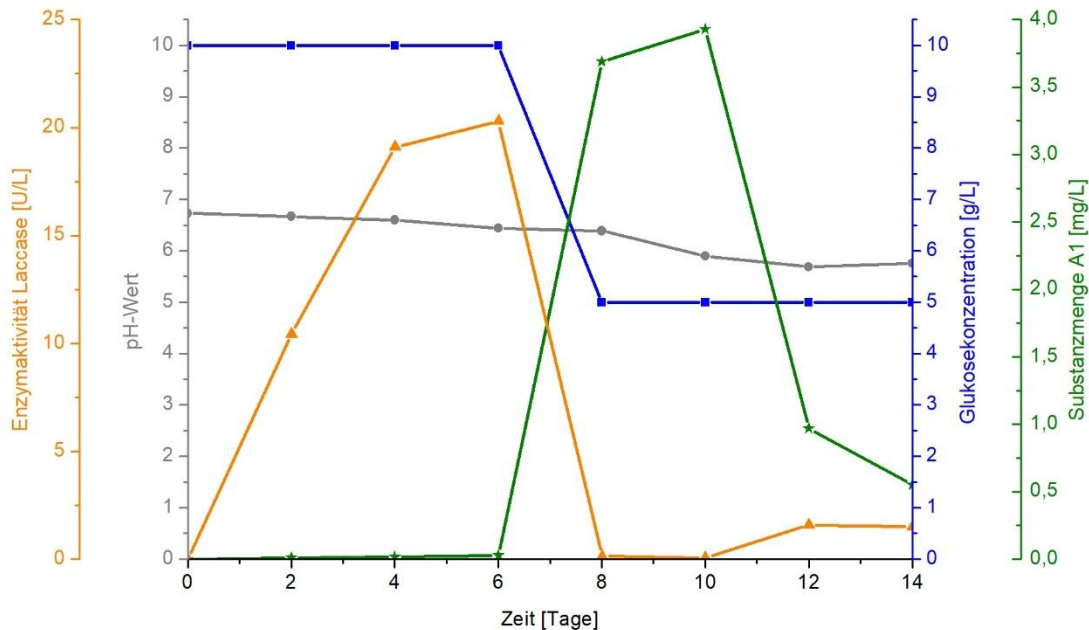


Abbildung 62: Fermentationsverlauf von *Pleurotus pulmonarius* in Minimalmedium mit Kraftlignin über einen Zeitraum von 14 Tagen im 2,5 L-Maßstab. Abgebildet sind die pH-Werte (grau), die Glukosekonzentration in g/L (blau), die Substanzmenge von Anisaldehyd (A1) in mg/L (grün) sowie die Laccase-Aktivität (orange) in U/L. Erstellt mit Origin 7.5.

3.5.3.1 Qualitativer Nachweis extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme

Um die Aktivität noch anderer am extrazellulären Ligninabbau beteiligten Enzyme, wie z.B. die Polyphenoloxidasen oder die Lignin- bzw. Manganabhängigen Peroxidasen, nachweisen zu können, wurde ein qualitativer Enzymtest auf Agarplatten nach Pointing (1999) durchgeführt. Das dafür verwendete *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen, für die jeweiligen Enzyme charakteristischen Substraten, versetzt (2.1.7). Die Entfärbung von Poly R impliziert die Anwesenheit von Polyphenoloxidasen, Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Die Verfärbung von ABTS weist die Aktivität von Laccasen nach und die Entfärbung des Azur B Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Für den Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen wurden LBM-Platten mit Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) versetzt.

Alle Platten wurden mit gleichgroßen Stücken von *Pleurotus pulmonarius* inokuliert und anschließend für 10 Tage bei RT inkubiert (2.4.1). Nach der Inkubationszeit konnte wie in Abbildung 63 zu sehen im Vergleich zur Negativkontrolle, *Penicillium steckii* IBWF 104-06, eine starke blaue Verfärbung der LBM-ABTS-Platte beobachtet werden, was auf eine Laccase-Aktivität hinweist. Bei den Platten mit Azur B konnte keine Entfärbung beobachtet werden, jedoch auf der Platte mit Poly R. Ebenfalls stark verfärbt waren die Platten mit LigS und KL zum Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen.

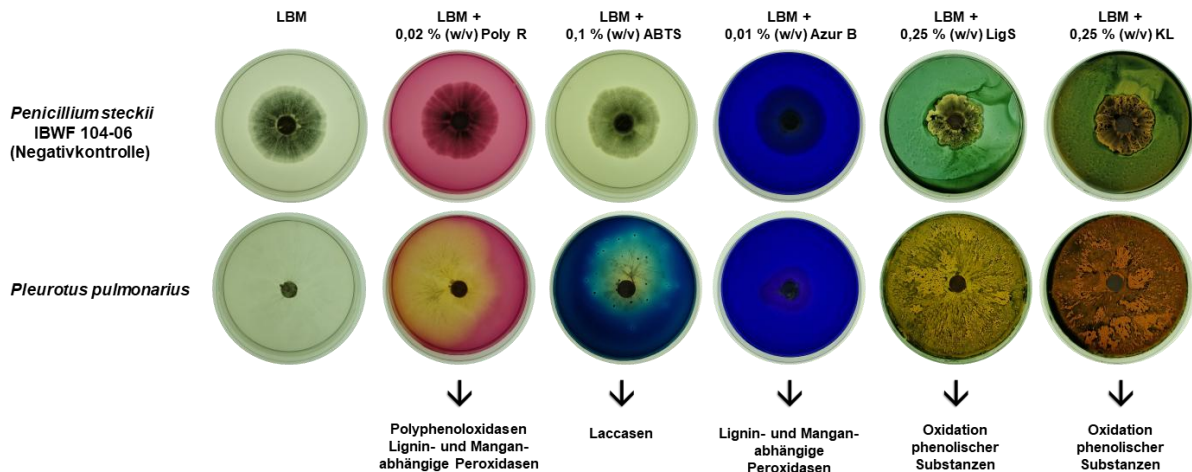


Abbildung 63: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Pleurotus pulmonarius*. Lignin modifying enzyme basal medium (LBM) wurde mit verschiedenen Substraten versetzt und mit *P. pulmonarius* inokuliert, um extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme nachzuweisen. Die Entfärbung von Poly R weist Polyphenoloxidasen und Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen nach. Die Verfärbung von ABTS weist Laccasen nach und die von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen. Zum Nachweis der Oxidation phenolischer Komponenten wurden Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) verwendet. Als Wachstumskontrolle wurde eine LBM-Platte ohne Zusätze inokuliert und als Negativkontrolle wurde *Penicillium steckii* IBWF 104-06 mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über 10 Tage bei RT. Angesetzt in Triplikaten.

3.5.4 Biologische Charakterisierung der Substanz A1

Pleurotus pulmonarius produzierte ebenfalls, wie *Agrocybe pediades*, die Substanzen P1 und P2, sodass auf eine erneute biologische Charakterisierung verzichtet wurde. Die produzierte Substanz (A1), Anisaldehyd, ist allgemein bekannt und in der Literatur beschrieben, daher wurde auf eine biologische Charakterisierung dieser verzichtet.

3.6 Fermentation von *Pleurotus ostreatus* mit industriellem Ligninabfall

3.6.1 Fermentation mit Magnesium-Lignosulfonat

Der Austern-Seitling (*Pleurotus ostreatus*) stammt aus der Stammsammlung der AG Thines und wurde zuvor isoliert und morphologisch sowie molekularbiologisch identifiziert (6.1). Er gehört ebenso wie *Pleurotus pulmonarius* zu den weltweit am häufigsten kultivierten Speisepilzen. In der Natur wird er oft auf verrottetem Holz gefunden, was durch seine Lignin-abbauenden Enzyme begünstigt wird (Sánchez, 2010; Hadar *et al.*, 1993).

Pleurotus ostreatus wurde für 14 Tage in MM + LigS kultiviert. Anschließend wurde der pH- und Glukosewert sowie die Laccase- und Peroxidase-Aktivität im KF anhand des ABTS-Test bestimmt (2.4.2). Dabei konnte eine Abnahme des pH-Wertes auf 5,82 beobachtet werden. Freie Glukose war auch nach 14-tägiger Kultivierung noch ausreichend vorhanden (5 g/L). Mit 0,8 mU/L konnte nur eine geringe Laccase-Aktivität gemessen werden. Nach Abschluss aller Messungen wurde die gesamte Kultur mit Ethylacetat vollständig extrahiert (2.3.2). Der daraus resultierende RE wurde im Anschluss mittels HPLC analysiert (2.3.3.1), dabei konnte nach Abgleich des RE-Chromatogramms mit den Kontroll-Chromatogrammen der Abbau des Magnesium-Lignosulfonats sowie zwei neue Signale bei einer Rt von 14,1 min und 14,5 min detektiert werden (6.2.8, Abb. 101). Da diese Signale die gleiche Rt hatten, wie die bereits in *P. pulmonarius* detektierten Signale, wurde zunächst das UV-Spektrum miteinander verglichen. Das UV-Spektrum des Signals bei Rt 14,1 min ist identisch zu dem des Signals bei Rt 14,1 min von *P. pulmonarius* aus der Kultivierung mit Kraftlignin (Abb. 65). Außerdem waren auch die UV-Spektren der Signale bei Rt 14,5 min identisch zueinander (Abb. 66). Eine abschließende HPLC-MS-Analyse zur Bestimmung der Masse, bestätigte dies ebenfalls. Das Signal bei Rt 14,1 min hatte eine Masse von 177 m/z und das Signal bei Rt 14,5 min von 330 m/z. Es handelt sich somit um die gleichen Substanzen, Substanz A1 (Rt 14,1 min) und die Substanzen P1 und P2 (RT 14,5 min), wie bei *Pleurotus pulmonarius*. Auf eine weitere Aufreinigung und anschließende Strukturaufklärung wurde daher verzichtet.

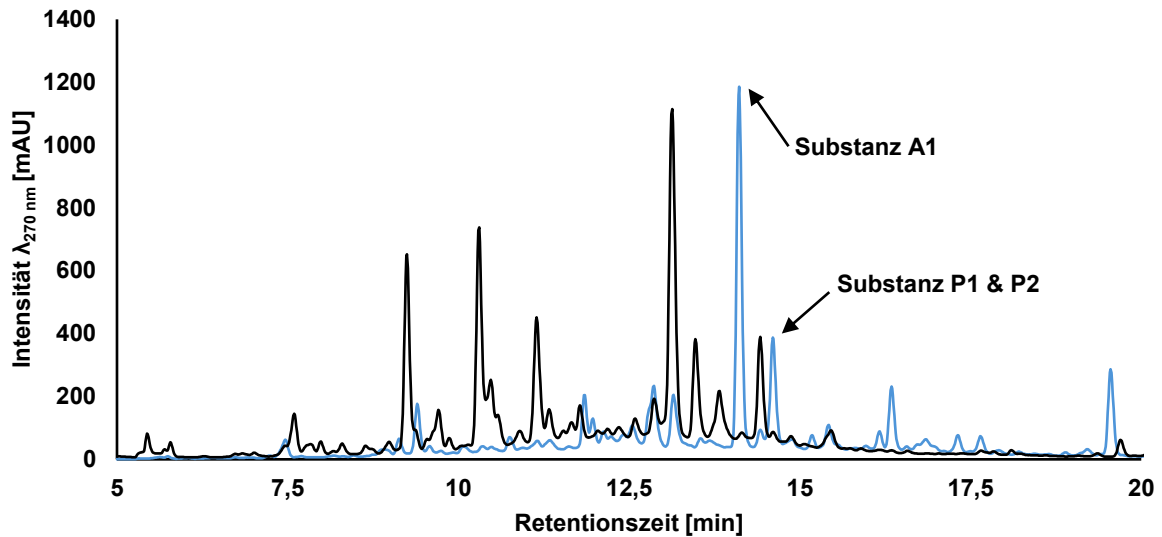


Abbildung 64: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pleurotus ostreatus* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Lignosulfonat (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Lignosulfonat (schwarz). Detektiert wurden die Substanzen A1 mit einer Retentionszeit von 14,1 min sowie P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

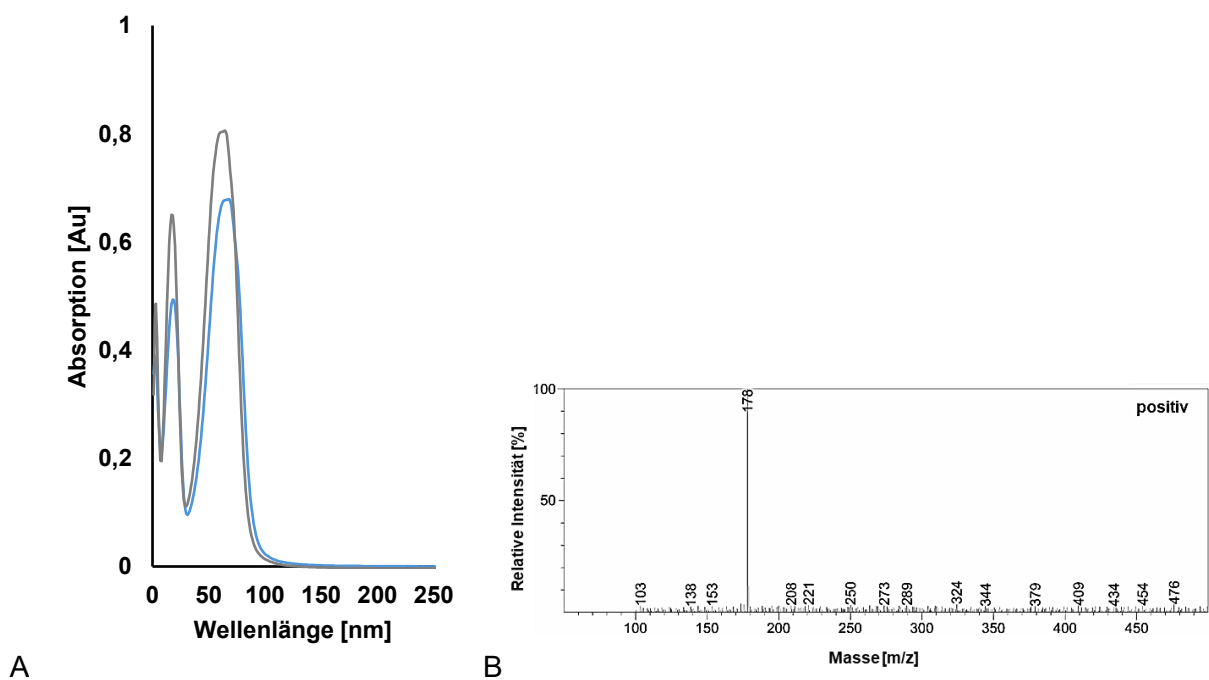


Abbildung 65: UV-(A) und Massenspektrum (B) der Substanz A1 aus dem Rohextrakt von *Pleurotus ostreatus* (blau) nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Lignosulfonat. Das UV-Spektrum ist im Vergleich zur Substanz A1 von *Pleurotus pulmonarius* (grau) abgebildet. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

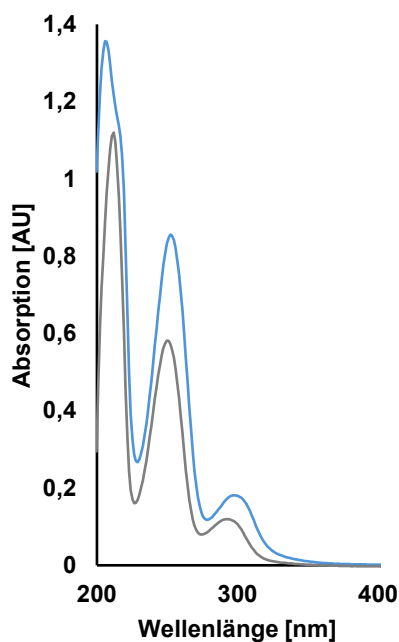


Abbildung 66: UV-Spektren der Substanz P1 und P2 aus dem Rohextrakt von *Pleurotus ostreatus* (blau) und *Pleurotus pulmonarius* (grau) nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat im Vergleich. Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

3.6.2 Fermentation mit Kraftlignin

Nach 14-tägiger Kultivierung in MM+KL, konnte ein pH-Wert von 5,93 gemessen werden. Die freie Glukose war, wie zuvor bei der Kultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat, nicht vollständig verbraucht (5 g/L). Die abschließende ABTS-Messung (2.4.2) des KF ergab eine geringe Laccase-Aktivität von 0,8 mU/L. Nach erfolgreicher Extraktion der gesamten Kultur mittels Ethylacetat (2.3.2) wurde das daraus resultierende RE mittels HPLC analysiert (2.3.3.1). Durch den Abgleich des aufgenommenen Chromatogramms mit den Kontroll-Chromatogrammen (MM, MM + Ligs, *P. ostreatus* kultiviert in MM (6.2.8, Abb. 102) konnte festgestellt werden, dass das Kraftlignin fast vollständig abgebaut wurde. Des Weiteren wurden ebenfalls Signale bei einer RT von 14,1 min und 14,6 min detektiert (Abb. 67). Nach Abgleich der UV- und Massenspektren mit den Spektren aus der Kultivierung mit Magnesium-Lignosulfonat stellte sich raus, dass es sich ebenfalls um die Substanzen A1 sowie P1 und P2 handelt (Abb. 68). Auf eine Strukturaufklärung wurde daher verzichtet.

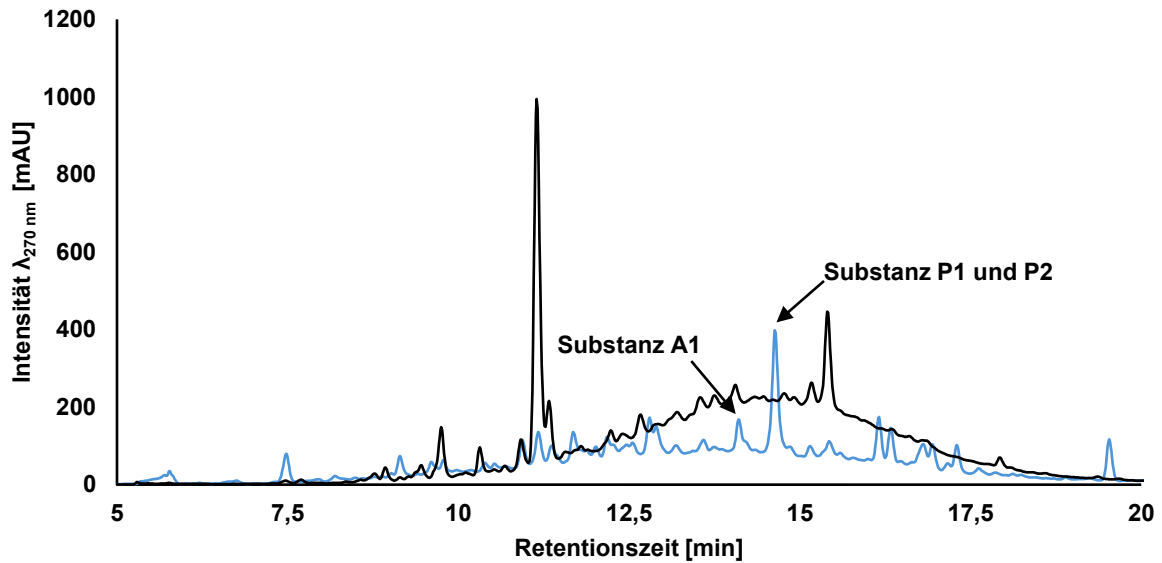


Abbildung 67: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pleurotus ostreatus* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz). Detektiert wurden die Substanzen A1 mit einer Retentionszeit von 14,1 min sowie P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

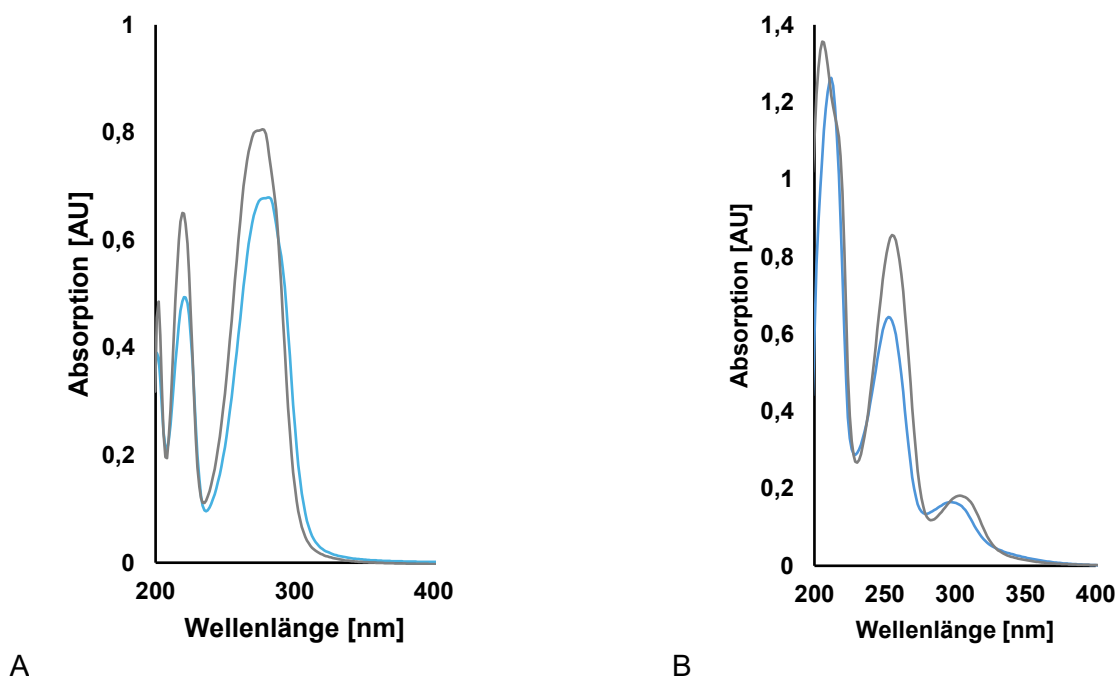


Abbildung 68: UV-Spektren der Substanz A1 (A) und der Substanz P1 und P2 (B) aus dem Rohextrakt von *Pleurotus ostreatus* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) sowie Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (grau). Die Spektren wurden mittels ESI an der HPLC-MS aufgenommen.

3.6.3 Fermentations-Monitoring mit quanti- und qualitativem Enzymtest

Aufgrund dessen, dass während der Kultivierung von *Pleurotus ostreatus*, ebenso wie bei *Pleurotus pulmonarius*, die Substanzen A1 sowie P1 und P2 detektiert werden konnten, wurde auf ein Fermentations-Monitoring verzichtet.

3.6.3.1 Qualitativer Nachweis extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme

Um die Aktivität noch anderer am extrazellulären Ligninabbau beteiligten Enzyme, wie z.B. die Polyphenoloxidasen oder die Lignin- bzw. Manganabhängigen Peroxidasen, nachweisen zu können, wurde ein qualitativer Enzymtest auf Agarplatten nach Pointing (1999) durchgeführt. Das dafür verwendete *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen, für die jeweiligen Enzyme charakteristischen Substraten, versetzt (2.1.7). Die Entfärbung von Poly R impliziert die Anwesenheit von Polyphenoloxidasen, Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Die Verfärbung von ABTS weist die Aktivität von Laccasen nach und die Entfärbung des Azur B Lignin- und Manganabhängigen Peroxidasen. Für den Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen wurden LBM-Platten mit Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) versetzt. Alle Platten wurden mit gleichgroßen Stücken von *Pleurotus ostreatus* inokuliert und anschließend für 10 Tage bei RT inkubiert (2.4.1). Nach der Inkubationszeit konnte wie in Abbildung 69 zu sehen im Vergleich zur Negativkontrolle, *Penicillium steckii* IBWF 104-06, eine starke blaue Verfärbung der LBM-ABTS-Platte beobachtet werden, was auf eine Laccase-Aktivität hinweist. Bei den Platten mit Poly R konnte ebenfalls eine leichte Entfärbung rund um das Pilzwachstum beobachtet werden. Die Platte mit Azur B wies keine Verfärbung auf. Ebenfalls stark verfärbt waren die Platten mit LigS und KL zum Nachweis der Oxidation phenolischer Substanzen.

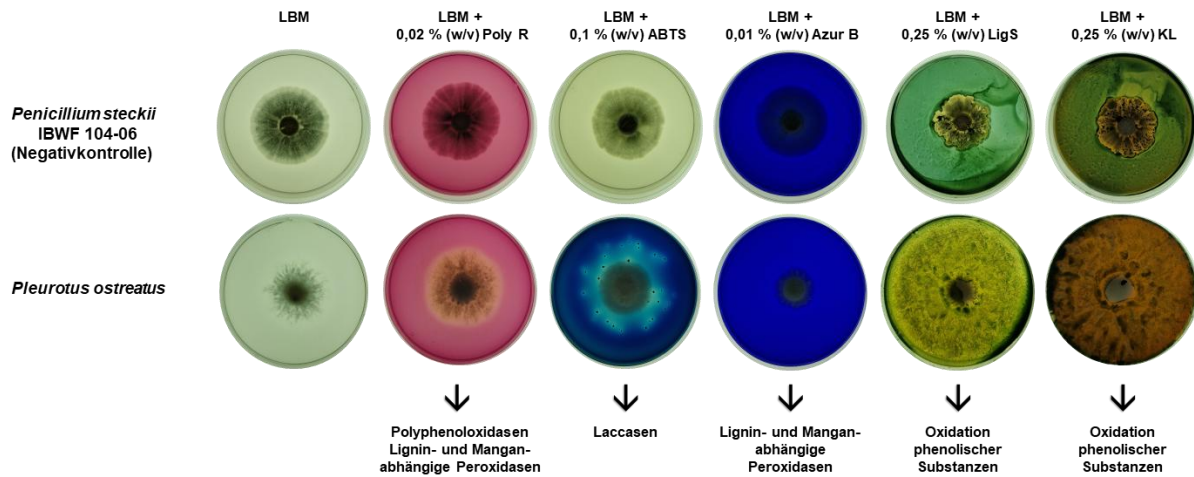


Abbildung 69: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Pleurotus ostreatus*. *Lignin modifying enzyme basal medium* (LBM) wurde mit verschiedenen Substraten versetzt und mit *P. ostreatus* inokuliert, um extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme nachzuweisen. Die Entfärbung von Poly R weist Polyphenoloxidasen und Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen nach. Die Verfärbung von ABTS weist Laccasen nach und die von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen. Zum Nachweis der Oxidation phenolischer Komponenten wurden Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) verwendet. Als Wachstumskontrolle wurde eine LBM-Platte ohne Zusätze inokuliert und als Negativkontrolle wurde *Penicillium steckii* IBWF 104-06 mitgeführt. Die Inkubation erfolgte über 10 Tage bei RT. Angesetzt in Triplikaten.

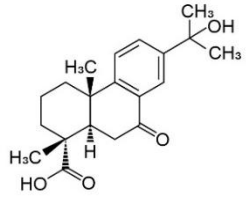
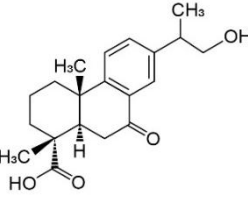
3.6.4 Biologische Charakterisierung der Substanzen

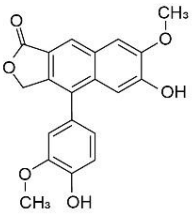
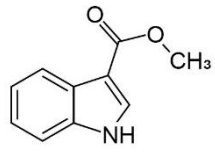
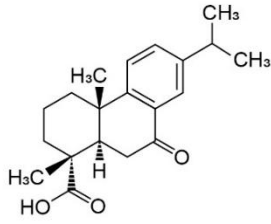
Pleurotus ostreatus produzierte ebenfalls, wie auch *Pleurotus pulmonarius* und *Agrocybe pediades*, die Substanzen P1 und P2, sodass auf eine erneute biologische Charakterisierung verzichtet wurde. Die produzierte Substanz (A1), Anisaldehyd, ist zudem allgemein bekannt und in der Literatur beschrieben, daher wurde auf eine biologische Charakterisierung dieser verzichtet.

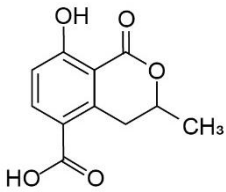
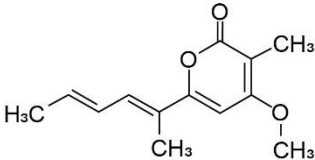
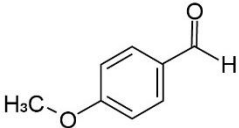
3.7 Übersicht der Ergebnisse

In der nachfolgenden Tabelle 17 sind alle Substanzen gelistet, die im Rahmen dieser Arbeit nach der Kultivierung der verschiedenen Pilzstämmen in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat bzw. Kraftlignin detektiert werden konnten. Angegeben sind die chemische Struktur, die Masse, die Retentionszeit der analytischen HPLC-Messung sowie die biologische Aktivität, falls vorhanden.

Tabelle 17: Isolierte Substanzen verschiedener Pilzstämmen nach Kultivierung dieser in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat bzw. Kraftlignin. Angegeben ist die chemische Struktur, Masse im Verhältnis Masse zu Ladung [m/z], die Retentionszeit in Minuten [min], die produzierenden Organismen sowie die biologische Aktivität, falls vorhanden. X = nicht aufgeklärt.

Identifizierte Substanz	Chemische Struktur	Masse [m/z] (NMR-Analyse)	Retentionszeit [min] (PDA-Detektor)	Organismen	Biologische Aktivität
15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1)		330	14,5	<i>Agrocybe pediades</i> <i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Keine
16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2)		330	14,5	<i>Agrocybe pediades</i> <i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Keine

Identifizierte Substanz	Chemische Struktur	Masse [m/z] (NMR-Analyse)	Retentionszeit [min] (PDA-Detektor)	Organismen	Biologische Aktivität
Detetrahydroconidendrin (X1 / L1)		352	14,2 / 13,9	<i>Alternaria alstroemeriae</i> <i>Coniolaria hispanica</i>	<i>Bacillus brevis</i>
Methylindol-3-Carboxylat (L2)		175	14,4	<i>Coniolaria hispanica</i>	Keine
Unbekannt (L3)	X	206	15,0	<i>Coniolaria hispanica</i>	Keine
7-Oxodehydroabietinsäure (L4)		314	16,4	<i>Chaetomium leptoderma</i>	<i>Bacillus brevis</i>
Unbekannt (L5)	X	298	18,4	<i>Chaetomium leptoderma</i>	Keine

Identifizierte Substanz	Chemische Struktur	Masse [m/z] (NMR-Analyse)	Retentionszeit [min] (PDA-Detektor)	Organismen	Biologische Aktivität
5-Carboxymellein (L7-1)		222	13,8	<i>Coniolaria hispanica</i>	Keine
8,9-Dehydroxylaron (L8)		220	16,6	<i>Coniolaria hispanica</i>	Keine
Anisaldehyd (A1)		177	14,1	<i>Pleurotus pulmonarius</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	Nicht getestet

4. Diskussion und Ausblick

Eines der größten Umweltprobleme unserer Zeit ist der fortschreitende Klimawandel, welcher drastische Auswirkungen auf verschiedene Bereiche unseres Lebens hat. Die Erderwärmung, der Verlust der Biodiversität oder aber auch gesundheitliche Auswirkungen auf den Menschen sind nur ein Teil der Folgen des Klimawandels (Parums, 2024; Momoh-Salami *et al.*, 2023). Die Verwendung von überwiegend erdölbasierten Rohstoffen zur Herstellung alltäglicher Materialien, wie Kunststoffen, Textilien oder medizinischen Produkten, fördert den Anstieg der CO₂-Emission und trägt somit erheblich zum Klimawandel bei (Bajwa *et al.*, 2019; IPCC, 2021; Murray und King, 2012). Zudem steht nur eine begrenzte Menge an Erdöl zur Verfügung und bereits jetzt wird angenommen, dass das Fördermaximum erreicht ist, was die Verfügbarkeit des konventionellen Erdöls verringert und die Preise weiter steigen lässt (IEA, 2023; Murray und King, 2012). Um langfristig den CO₂-Fußabdruck zu reduzieren und eine nachhaltigere Zukunft zu gestalten, die das Leben auf der Erde noch viele Jahrtausende möglich macht, ist es von großem Interesse Alternativen für die erdölbasierten Materialien zu finden.

Im Fokus stehen dabei vor allem natürliche Ressourcen, die noch weitestgehend ungenutzt sind, wie z.B. Lignin, welches die weltweit am häufigsten vorkommende, erneuerbare, aromatische, aus der Natur stammende Verbindung ist (Bajwa *et al.*, 2019). Aufgrund der vielseitigen Eigenschaften und der großen Verfügbarkeit, kann Lignin für weitaus mehr verwendet werden als Brennmaterial und einige bisher aus Erdöl bestehende Materialien ersetzen. Die Schwierigkeit besteht jedoch darin, das hochkomplexe Lignin, welches nur schwer abbaubar ist, so zu verändern, dass neue Produkte daraus entstehen.

Um das Lignin nutzen zu können muss es aus der Lignozellulosebiomasse (Abb. 2) herausgelöst und somit von der Zellulose und Hemizellulose abgetrennt werden. Dies findet bereits im großen Maßstab in der Papier- und Zellstoffindustrie statt (Berlin und Balakshin, 2014; Gosselink *et al.*, 2004). Das dabei abgetrennte Lignin (technisches Lignin), fällt als industrieller Abfall in großen Mengen an und wird bereits z.B. als Verbundwerkstoff, Elektrodenmaterial oder aber auch als Alternative zu Kohlenstofffasern verwendet (Tanase-Opedal *et al.*, 2019; Gosselink *et al.*, 2004; Upton und Kasko, 2016). Auch elektrochemische Verfahren erzielten bereits Erfolge bei der Verwertung lignolytischer Industrieabfälle. So konnten Zirbes *et al.* 2020 durch elektrochemische Aufschließung von Kraftlignin ca. 4 Gew.-% Vanillin gewinnen. Da die Nutzung und Verwertung von Abfallprodukten, so auch lignolytischem Abfall, zunehmend an Bedeutung gewinnt, um erdölbasierte Rohstoffe langfristig ersetzen zu können, ist es von Interesse umweltfreundliche, biologische Abbau- bzw. Umwandlungsprozesse zu untersuchen (Vigh, 2023). Filamentöse Pilze, darunter vor allem die Basidiomyceten, sind in der Lage mit einem einzigartigen Enzym-Pool die komplexe Struktur des Lignins aufzuspalten und Nährstoffe daraus zu gewinnen (Kirk und Farrell, 1987).

4.1 Identifizierung und Charakterisierung phenolischer Substanzen nach Fermentation filamentöser Pilze mit industriellem Ligninabfall

4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Harzsäure-Derivate

Da bis heute zumeist chemische bzw. industrielle Anwendungsmöglichkeiten von industriellem Lignin vorhanden sind, ist es von besonderem Interesse potenzielle biologische Abbauprozesse zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene filamentöse Pilze dahingehend analysiert, ob diese während der Kultivierung industriellen Ligninabfall abbauen und gleichzeitig neue phenolische Substanzen entstehen, die zukünftig Anwendung finden könnten. Dazu wurden verschiedene Pilzstämme zunächst in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (LigS) sowie in Minimalmedium mit Kraftlignin (KL) für 14 Tage (d) fermentiert, um zu untersuchen, ob die industriellen Ligninabfälle über die Kultivierungszeit hinweg abgebaut werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass *Agrocybe pediades*, auch Raustieliger Ackerling genannt, zugehörig zu den Basidiomyceten sowohl das LigS als auch das KL abbauen kann (3.1.1 & 3.1.2). Bei beiden Kultivierungsansätzen entstand ein neues Signal bei einer Retentionszeit (Rt) von 14,5 min während der Kultivierung mit LigS und bei Rt 14,6 min im Ansatz mit KL. Nach anschließender HPLC-MS-Messung konnte bestätigt werden, dass es sich in beiden Ansätzen, um die gleiche Substanz (Substanz P) handelt. Zur Isolierung und Aufreinigung dieser wurde zunächst eine 20 L Fermentation durchgeführt, wobei im Anschluss eine Kieselgelchromatographie mit anschließender präparativer HPLC-MS-Analyse erfolgte. Dabei konnte eine Masse von 330 m/z detektiert werden (3.1.1). Zur vollständigen Analyse der Substanz P wurde diese NMR-spektroskopisch untersucht (6.4.1, Abb. 104 - 107), wobei die Substanz P als zwei Substanzen P1 und P2 differenziert und als 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) identifiziert werden konnte (3.1.1). Der Unterschied zwischen P1 und P2 liegt darin, dass sich die Hydroxygruppe bei P1 an der Position C₁₅ und bei P2 an C₁₆ befindet (Abb. 70 & 71). Aufgrund dieser Ähnlichkeit verfügen diese über die gleichen polaren Eigenschaften und sind daher bei den zuvor durchgeführten HPLC- und HPLC-MS-Messungen immer nur als eine Substanz wahrgenommen worden.

P1 und P2 sind Derivate der Dehydroabietinsäure (DHAA). DHAA gehört zusammen mit der Abietinsäure (AA) zu den Harzsäuren und kommt natürlicherweise in Koniferen vor, wie z.B. Kiefern, Fichten oder Tannen (Dethlefs und Stan, 1996). Oftmals macht DHAA den Hauptanteil der Harzsäuren in Koniferen aus. Da diese, aufgrund des hohen Zelluloseanteils, ebenfalls in der Papier- und Zellstoffindustrie verwendet werden (Volkman *et al.*, 1993), konnten DHAA und AA im Zuge dieser Arbeit anhand des Abgleichs der HPLC-Chromatogramme der Reinsubstanzen, AA und DHAA, mit den Chromatogrammen der Kontrollen detektiert werden (3.1.1, Abb. 11 & 13; 6.2.2, Abb. 88 - 90).

Bei der Verarbeitung in der Papier- und Zellstoffindustrie, werden die Harzsäuren teilweise aus dem Holz freigesetzt und gelangen vor allem ins Abwasser wie Leach und Thakore 1973 beschrieben. Je nach Aufschlussverfahren variiert die Menge an toxischen Substanzen im Abwasser, welches zumeist eine Mischung aus Lignin, Kohlenhydraten und Extrakten ist, wodurch das Recycling dessen erschwert ist (Lehr *et al.*, 2021). Da Harzsäuren sehr resistent gegenüber dem chemischen Abbau sind (Dethlefs und Stan, 1996), könnten möglicherweise auch Derivate dieser in lignolytischen Abfallprodukten, wie z.B. LigS oder KL, verbleiben und gefunden werden. Die Papier- und Zellstoffindustrie zählt mitunter zu den umweltschädlichsten Industrien weltweit (Ince *et al.*, 2011; Pokhrel und Viraraghavan, 2004). Aufgrund dessen, dass *Agrocybe pediades* bereits im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich in Submerskulturen mit lignolytischem Abfall kultiviert werden konnte, sollte überprüft werden, ob dieser ein geeigneter Kandidat wäre, um die in den Abwässer der Papier- und Zellstoffindustrie enthaltenen toxischen Harzsäuren über Mykoremediation zu entfernen, so wie es Costa *et al.* bereits 2017 für die Pilze *Phanerochaete chrysosporium* und *Bjerkandera adusta* zeigten.

Dass DHAA und AA mögliche Vorstufen von P1 und P2 sind, konnte durch die Supplementierung dieser bestätigt werden (3.1.1.1). Im Zuge dieses Experiments wurde DHAA und AA in Minimalmedium dazugegeben und *Agrocybe pediades* darin für 14 d kultiviert. Bereits nach 72 h konnten die Substanzen P1 und P2 im Ansatz mit DHAA detektiert werden. Nach 7 d auch im Ansatz mit AA. Insgesamt wurde mehr P1 und P2 im Ansatz mit DHAA produziert (3.1.1.1, Abb. 15).

Des Weiteren konnten im Rahmen dieser Arbeit neben *Agrocybe pediades* noch zwei weitere Pilzstämme analysiert werden, wobei ebenfalls nach der Kultivierung mit LigS und KL, die zwei DHAA-Derivate 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) mittels HPLC-MS-Analyse detektiert werden konnten (3.5.1 & 3.5.2; 3.6.1 & 3.6.2). Hierbei handelt es sich ebenfalls um Basidiomyceten, *Pleurotus pulmonarius* und *Pleurotus ostreatus*. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese über einen ähnlichen Enzym-Pool zur Degradation von lignolytischen Industrieabfällen bzw. zur Metabolisierung von Harzsäuren verfügen. Abietinsäure als auch Dehydroabietinsäure können von Mikroorganismen degradiert werden, wie bereits 1981 Kutney *et al.* mit dem Zygomycet *Mortierella isabellina* zeigte, welcher heute zur Gattung der *Umbelopsis* (*Umbelopsis isabellina*) zählt (Meyer und Gams, 2003). Dieser detoxifizierte die im Abwasser der Zellstoffindustrie enthaltene DHAA zu verschiedenen Methylestern. Außerdem zeigte ein anschließender Toxizitätstest, dass die, durch die Degradation entstandenen Metabolite weniger toxisch sind als die im Abwasser enthaltene DHAA.

1988 konnte Kutney *et al.* außerdem zeigen, dass *M. isabellina* während der Fermentation mit Polyurethanschaum die Reinsubstanz DHAA am C₁₅- bzw. C₁₆-Atom hydroxylierte, sodass 15- bzw. 16-hydroxy-Dehydroabietinsäure entstand, welche sehr ähnlich zu den Substanzen P1 und P2 sind (Abb. 70), die im Rahmen dieser Arbeit detektiert werden konnten.

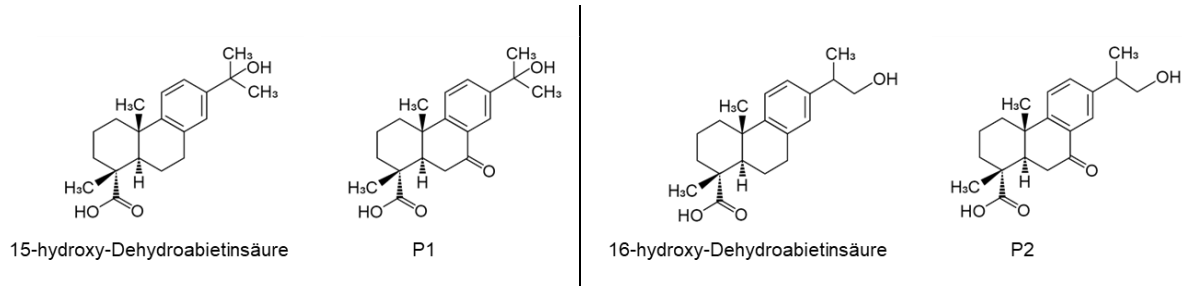


Abbildung 70: Chemische Struktur von 15-hydroxy-Dehydroabietinsäure im Vergleich zu 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) sowie 16-hydroxy-Dehydroabietinsäure im Vergleich zu 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2).

2014 machte diese Beobachtung auch Choudhary *et al.* nach der Fermentation der filamentösen Pilze *Cunninghamella elegans*, *Rhizopus stolonifer*, *Gibberella fujikuroi* und *Cephalosporium aphidicola* mit DHAA. Diese metabolisierten DHAA ebenfalls, wie *M. isabellina*, zu 15-hydroxy- und 16-hydroxy-Dehydroabietinsäure. Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen, *A. pediades*, *P. pulmonarius* und *P. ostreatus* hydroxylierten ebenfalls DHAA am C₁₅- bzw. C₁₆-Atom und oxidierten es zugleich noch am C₇-Atom jedoch ausgehend von den industriellen Abfallprodukten LigS bzw. KL anstelle der Reinsubstanzen. Somit könnten zukünftig alle drei Pilzstämme zur Verwertung von LigS und KL verwendet werden. Dahingehend wären in zukünftigen Experimenten die Parameter für ein *Upscaling* zu definieren, sodass weitaus mehr als 10 g/L LigS oder KL eingesetzt und somit effektiv verwertet werden können.

A. pediades, *P. pulmonarius* und *P. ostreatus* metabolisieren, die im industriellen Ligninabfall enthaltenen Harzsäuren, DHAA und AA, möglicherweise zum Selbstschutz, so wie es auch Kutney *et al.* 1981 beschrieben. Da Harzsäuren toxisch für Mikroorganismen sind (Savluchinske Feio *et al.*, 1999), ist dies vermutlich ein Abwehrmechanismus gegenüber den toxischen Substanzen. Dorado *et al.* konnten 2000 bereits zeigen, dass die Behandlung von Holzspänen mit den Basidiomyceten *Bjerkandera* sp., *Stereum hirsutum* und *Trametes versicolor* die Toxizität der resultierenden Extrakte verringerte. Die während dieser Arbeit produzierten Substanzen P1 und P2 sind ebenfalls weniger toxisch als die Vorstufen DHAA und AA, was anhand der durchgeführten Bioaktivitätstests bewiesen wurde. Es konnte sowohl für P1 als auch für P2 keine keimungs- bzw. wachstumshemmende Wirkung gegenüber den getesteten Mikroorganismen sowie Pflanzen beobachtet werden (3.1.4.1 & 3.1.4.2).

Der Zytotoxizitätstest zeigte außerdem, dass P1 und P2 weniger toxisch gegenüber den Zelllinien RPE-1, HepG2 und VH10tert sind, als DHAA, welches am stärksten toxisch wirkte, bzw. AA oder das Gemisch bestehend aus P1 und P2. Ebenfalls keine Wirkung erzielten P1 und P2 gegenüber HeLa S3 Zellen (3.1.4.3). Somit wären die Substanzen aufgrund der reduzierten Toxizität auch potenziell in Anwendungsfeldern wie z.B. der biokompatiblen Materialentwicklung oder Kosmetika anwendbar. Wo sie z.B. als Additive in Beschichtungen von Wundverbänden, als Bestandteil des Polymergerüsts beim *Tissue Engineering* oder in antioxidativen Cremes oder Salben eingesetzt werden könnten. Weiterführende Toxizitätstest sowie Langzeitstudien müssten dafür jedoch die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Ergebnisse bestätigen.

Ein weiteres Derivat der DHAA konnte bei der Fermentation des Ascomyceten *Chaetomium leptoderma* mit LigS sowie mit KL detektiert werden (3.4.1 & 3.4.2). Bei der dabei detektierten Substanz handelt es sich um 7-oxo-Dehydroabietinsäure (Substanz L4). Diese Substanz ist ähnlich zu den zuvor beschriebenen Substanzen P1 und P2, welche ebenfalls am C₇-Atom eine Carbonylgruppe haben. L4 hat im Vergleich dazu jedoch keine zusätzliche Hydroxygruppe am C₁₅- bzw. C₁₆-Atom (Abb. 71).

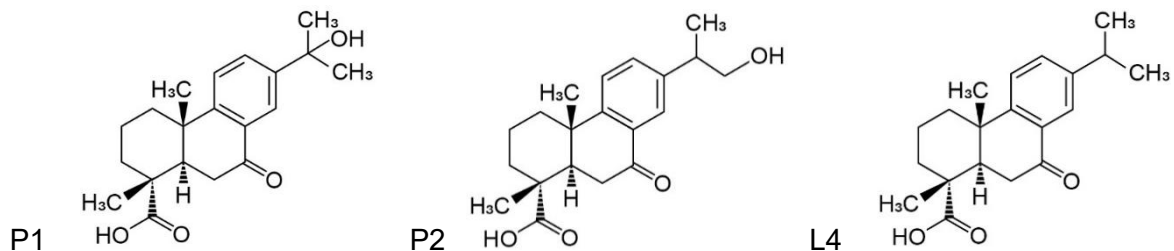


Abbildung 71: Chemische Struktur von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1), 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) und 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4).

Bereits 1994 wurde anhand von *Chaetomium cochlioides* von Yano *et al.* nachgewiesen, dass die Gattung *Chaetomium* DHAA metabolisieren kann (van Beek *et al.*, 2007). Dieser metabolisierte DHAA zu 7 β ,16-dihydroxy-Dehydroabietinsäure, wobei keine Carbonylgruppe im Molekül vorhanden ist, sondern zwei Hydroxylgruppen. Dabei könnte es sich um eine mögliche Vorstufe für P1 und P2 handeln, da Sierra-Alvarez *et al.* (2000) in ihren Studien zeigten, dass durch eine weitere Oxidierung der Hydroxygruppe eine Carbonylgruppe entstehen kann. Sie konnten damals durch die Fermentation von *Phlebiopsis gigantea* und *Trametes versicolor* neue Metabolite mit Hydroxylierungen am C₁-, C₇-, C₁₅- und C₁₇-Atom beobachten, wobei C₇ vermutlich weiter oxidiert wurde, sodass eine Carbonylgruppe entstand. Luchnikova *et al.* (2019) analysierten zudem, dass Pilze die zur Verfügung stehenden Harzsäuren in der Regel in Hydroxyderivate umwandeln und nicht als Kohlenstoffquelle nutzen.

In der Arbeit von Luchnikova *et al.* (2019) wurde über eine Vielzahl an Derivaten berichtet, die über unterschiedliche Bioaktivitäten verfügen. So konnten antibakterielle, fungizide, entzündungshemmende, antivirale oder aber auch antitumorale Aktivitäten detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies gegenüber den getesteten Organismen, Pflanzen und Zellen für P1 und P2 nicht nachgewiesen werden. Lediglich 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) wies eine geringe Aktivität bei der Durchführung des Agardiffusionstest gegenüber dem grampositiven Bakterium *Bacillus brevis* auf, wobei bei einer Konzentration von 100 µg eine Wachstumsinhibition von Ø 0,3 cm beobachtet werden konnte (3.4.4.1, Abb. 55). Die Bioaktivitätstests sollten zukünftig hinsichtlich der getesteten Organismen, Pflanzen und Zellen ausgeweitet werden, denn möglicherweise sind diese gegenüber anderen aktiv, so wie es für andere Derivate, wie z.B. 1β-Hydroxy-, 2α-hydroxy-, oder 7β-hydroxy-Dehydroabietinsäure, in der Arbeit von Luchnikova *et al.* (2019) bereits beschrieben wurde. Bei der Kultivierung von *C. leptoderma* in Magnesium-Lignosulfonat konnte noch eine zweite Substanz (L5) detektiert werden, welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert werden konnte. Auch die durchgeführten Bioaktivitätstests erwiesen keine Inhibition.

Harzsäuren, wie z.B. AA und DHAA, finden bereits in vielen ökonomischen Bereichen Anwendung. Unter anderem als Additiv bei der Polymerherstellung sowie bei Epoxidharzen und Silikonkautschuk, um deren Eigenschaften, wie z.B. Flexibilität, Zugfestigkeit oder UV-Stabilität zu verbessern (Vevere *et al.*, 2020). Des Weiteren werden diese auch als Polymer-Additive oder zur Synthese von Pharmazeutika verwendet (Hao *et al.*, 2022). Umso spannender ist es, dass durch die Kultivierung der filamentösen Pilze *A. pediades*, *P. pleurotus*, *P. ostreatus* und *C. leptoderma* in Minimalmedium mit LigS, wie auch mit KL, direkt modifizierte Derivate der Dehydroabietinsäure isoliert werden konnten, die nachweislich weniger toxisch sind als die Vorstufen DHAA und AA. Aufgrund der vielseitigen Einsatzbarkeit der Ausgangsprodukte, AA und DHAA, können möglicherweise auch die entstandenen Derivate, 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure, 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure und 7-oxo-Dehydroabietinsäure, zukünftig potenziell in der Industrie Anwendung finden. Bei P1 und P2 handelt es sich jeweils um ein bifunktionelles Molekül, welche im Vergleich zur AA und DHAA über zwei funktionelle Gruppen, eine Hydroxygruppe (OH) am C₁₅- (P1) bzw. C₁₆-Atom (P2) sowie eine Carbonylgruppe am C₇-Atom, verfügen (Abb. 70 & 71). Somit haben beide zwei mögliche Angriffspunkte, um weiter modifiziert werden zu können. Durch die OH-Gruppe haben P1 und P2 außerdem eine bessere Löslichkeit in wässrigem Milieu, was durch den einfachen Aufschluss mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion sowie der früheren Retentionszeit von 14,5 min im Vergleich zu den Reinsubstanzen Abietinsäure (Rt 24,8 min) und Dehydroabietinsäure (Rt 22,4 min) gestützt wird (3.1.1, Abb. 8, 11 & 13).

Ebenso könnten intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden, die in der Industrie zur Veränderung von Materialeigenschaften, wie z.B. Thermostabilität oder Festigkeit, genutzt werden können (Kuo, 2018; Wan und Thompson, 2024). Auch die Carbonylgruppe, welche auch bei L4 vorhanden ist, verfügt über großes Potenzial, da sie eine wesentliche funktionelle Gruppe vieler chemischer Verbindungen in der Industrie ist und ebenfalls Materialeigenschaften beeinflussen kann (Eriksson *et al.*, 2022).

Die Basidiomyceten *Agrocye pediades*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus* und der Ascomycet *Chaetomium leptoderma* haben die im industriellen Ligninabfall vorkommende DHAA bzw. AA zu 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) bzw. 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4) metabolisiert. Entscheidend ist hierbei, dass dies zum ersten Mal durch die Kultivierung filamentöser Pilze mit lignolytischem Industrieabfall anstelle von Reinsubstanzen oder dem Abwasser aus der Papier- und Zellstoffindustrie beobachtet werden konnte. Außerdem wurde die Substanz 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben.

4.1.2 Identifizierung und Charakterisierung des isolierten Lignan-Derivates

Bei der Kultivierung von *Alternaria alstroemeriae* konnte im Kultivierungsansatz mit LigS ein neues Signal (Substanz X1) bei einer Rt von 14,2 min detektiert werden. Nach Fermentation im 20 L Maßstab und anschließender Aufreinigung und Strukturaufklärung konnte die Substanz X1 mit einer Masse von 352 m/z als Detetrahydroconidendrin identifiziert werden (3.2.1). Detetrahydroconidendrin gehört zu den Lignanen und wurde 1982 erstmals aus *Juniperus formosana*, dem Formosa-Wacholder, der ebenfalls zu den Koniferen gehört, isoliert (Kuo *et al.*, 1982). Da wie bereits erwähnt auch Koniferen in der Papier- und Zellstoffindustrie verwendet werden, wurde überprüft, ob die Substanz möglicherweise schon zuvor im LigS vorhanden war. Durch den Abgleich der Chromatogramme von *A. alstroemeriae* mit dem der Kontrolle (Minimalmedium mit LigS) konnte dies jedoch ausgeschlossen werden (3.2.1, Abb. 24; 6.2.3, Abb. 91). Gleichzeitig fiel auf, dass das in der Kontrolle vorhandene Signal bei Rt 12,8 min nach der Kultivierung mit *A. alstroemeriae* nicht mehr detektierbar ist (3.2.1, Abb. 24). Aufgrund der Annahme das dies möglicherweise eine Vorstufe sein könnte, ähnlich wie bei den Substanzen P1 und P2, wurde diese Substanz ebenfalls aufgereinigt und mit einer Masse von 356 m/z als Conidendrin identifiziert (3.2.1, Abb. 27 & 28). Laut experimentellen Beobachtungen ist Conidendrin eine mögliche Vorstufe von Detetrahydroconidendrin (Kuo *et al.*, 1990). Doch konnte dies durch mehrmaliges Wiederholen des Supplementierungsversuches im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden (3.2.1.1).

Durch die Aufreinigung und Isolierung des Conidendrins aus dem LigS sind die übrigen Bestandteile des ursprünglichen Substrates nicht mehr vorhanden. Möglicherweise sind diese jedoch essenzielle Signalstoffe für die Induktion der Produktion und Sekretion der modifizierenden Enzyme von *A. alstroemeriae*, sodass die Dehydrogenierung des Conidendrins während der Kultivierung mit der Reinsubstanz ausblieb. Dass die Biosynthese, der für die Metabolisierung notwendigen Enzyme durch fehlende Signalstoffe runterreguliert oder inaktiviert werden kann, konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Horta *et al.*, 2019; Mózsik *et al.*, 2022). Um zu bestätigen, dass dies der Fall ist, könnte in einem zukünftigen Experiment *A. alstroemeriae* zunächst zusammen mit dem LigS kultiviert werden, bis kurz vor der Detektion des Detetrahydroconidendrins, um dann nur mit dem Kulturfiltrat (KF) und den darin sekretierten Enzymen weiterzuarbeiten. Wichtig ist hierbei jedoch, dass das Detetrahydroconidendrin noch nicht im KF nachweisbar ist und das LigS ebenfalls von dem KF abgetrennt werden kann, was sich im Zuge der Arbeit als schwierig erwies. Sollte dann durch die Kultivierung des „aufgereinigten“ KFs mit LigS oder der Reinsubstanz Conidendrin, Detetrahydroconidendrin detektierbar sein, würde dies beweisen, dass durch die vorherige Kultivierung mit LigS die Enzymproduktion und Sekretion aktiviert wurde und somit Bestandteile des Substrates als Signalstoffe dienen. Des Weiteren könnte man im Zuge dieses Experiments das Conidendrin oder, wenn möglich, das LigS mit ^{13}C -Isotopen markieren und dadurch später mittels NMR-Analyse nachweisen, dass Detetrahydroconidendrin ausgehend von dem LigS bzw. Conidendrin von *A. alstroemeriae* metabolisiert wurde.

Detetrahydroconidendrin hat im Vergleich zu Conidendrin vier Wasserstoffatome weniger und dadurch drei anstatt zwei aromatische Ringe in seiner Molekülstruktur (Abb. 72). Es bietet somit vielfältige Anwendungs- und Modifizierungsmöglichkeiten, denn Aromaten sind aufgrund ihrer Eigenschaften, wie z.B. Hitze- und UV-Beständigkeit, vielfältig einsetzbar und bilden die Grundlage vieler in der Industrie hergestellten Pharmazeutika, Polymere, Farb- oder Duftstoffe (Braga und Faria, 2022; Qiang *et al.*, 2023).

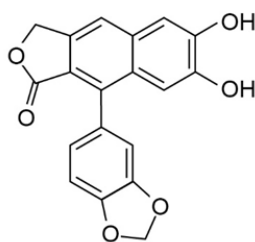


Abbildung 72: Chemische Struktur von Detetrahydroconidendrin (X1) und Conidendrin im Vergleich.

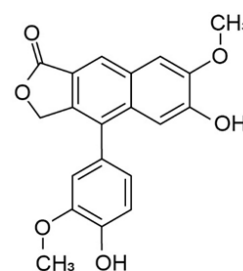
Detetrahydroconidendrin gehört zu den Arylnaphthalin-Lignan, die in verschiedenen Heilpflanzen gefunden werden können (Kuo *et al.*, 1990). Diese bestehen aus einem tetrazyklischen Grundgerüst, indem ein Benzofuran-Ring enthalten ist und verfügen potenziell über mehr als fünf verschiedene Substituenten, wodurch diese eine hohe strukturelle Vielfalt aufweisen. Detetrahydroconidendrin gehört zum Typ II der Arylnaphthalin-Lignane. Bisher können Arylnaphthalin-Lignane nur aus pflanzlichen Quellen isoliert oder über mehrstufige chemische Synthesewege hergestellt werden (Park *et al.*, 2021; Fang und Hu, 2018). Aufgrund des vielversprechenden breiten Bioaktivität-Spektrums besteht ein großes industrielles Interesse an den Lignan (Nedelcheva *et al.*, 2024).

Umso spannender ist es, dass durch die Kultivierung von *Alternaria alstroemeriae* mit lignolytischem Industrieabfall, wobei eine Endkonzentration von 10 g/L vorlag, ein solches Lignan direkt isoliert werden konnte. Nach 14-tägiger Fermentation betrug die Menge an Detetrahydroconidendrin 3,6 mg/L (3.2.3, Abb. 31). Durch Optimierung der Fermentationsbedingungen, wie die Menge an Nährstoffen bzw. Substrat, der pH-Wert oder die Temperatur, könnte die Ausbeute weiter maximiert werden. Somit könnte zukünftig anstelle von Pflanzenextrakten, die je nach Pflanze und Kultivierungsmethode ca. 1 % des Trockengewichts an Lignan liefern (Mohagheghzadeh *et al.*, 2002) oder der aufwendigen industriellen Synthese ein alternatives Verfahren angewandt werden, wobei zugleich ein ungenutztes Abfallprodukt recycelt wird.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen bioaktiven Lignan, wie z.B. Justicidin B (Abb. 73), welches antivirale, fungizide, antiprotozoische sowie antitumorale Wirkung hat (Hemmati und Seradj, 2016), liegt die Vermutung nahe, dass auch Detetrahydroconidendrin über bioaktive Eigenschaften verfügt. Im Zuge der in dieser Arbeit durchgeführten Bioaktivitätstests konnte eine Aktivität gegenüber *Bacillus brevis* ab einer Konzentration von 50 µg detektiert werden, wobei im Vergleich zur Substanz 7-oxo-Dehydroabietinsäure eine stärkere Inhibition zu beobachten war (3.2.4.1, Abb. 33). Das Detetrahydroconidendrin aktiv gegenüber grampositiven Bakterien sein kann, zeigte bereits 2001 Kawazoe *et al.* Sie beobachteten eine Aktivität gegenüber verschiedenen grampositiven Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen (MRSA).



Justicidin B



Detetrahydroconidendrin

Abbildung 73: Chemische Struktur von Justicidin B und Detetrahydroconidendrin im Vergleich.

Das im Rahmen dieser Arbeit keine Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* beobachtet werden konnte, liegt möglicherweise daran, dass kein MRSA-Stamm verwendet wurde. Aufgrund dessen, dass bisher keine weitere Bioaktivität für Detetrahydroconidindrin in der Literatur beschrieben ist, wäre es interessant zu untersuchen, ob es möglicherweise noch andere Bioaktivitäten aufweist, wie es für eine Vielzahl an Lignanen beschrieben ist. Dies könnte anhand weiterer Bioaktivitätstests analysiert werden.

4.1.3 Identifizierung und Charakterisierung der isolierten Indol- und Isocumarin-Derivate

Der Ascomycet *Coniolarrella hispanica* produzierte die neu detektierten Substanzen im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungsexperimente nur mit dem industriellen Ligninabfall LigS. Während der Kultivierung mit KL konnten keine neuen Metabolite detektiert werden. Zunächst konnten vier neue Signale, Substanz L1 mit einer Retentionszeit von 13,9 min, L2 bei 14,4 min, L3 bei 15 min und L8 bei 16,6 min, detektiert werden. Es fiel auf, dass das Signal bei Rt 13,9 min (L1) trotz der zeitlichen Verschiebung identisch zu X1 (Rt 14,2 min) von *A. alstroemeriae* ist, was durch den Abgleich der UV- und Massenspektren bestätigt werden konnte (3.3.1, Abb. 35), sodass auf eine weitere Aufreinigung und Analyse von L1 verzichtet wurde. Zur Strukturaufklärung der verbliebenen drei Substanzen, L2, L3 und L8, wurde *C. hispanica* zunächst im 20 L Maßstab fermentiert und L2, L3 und L8 aus dem KF isoliert und aufgereinigt. Dabei konnte für L2 eine Masse von 175 m/z, für L3 eine Masse von 206 m/z und für L8 eine Masse von 220 m/z detektiert werden (3.3.1). Mittels der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten NMR-spektroskopischen Untersuchung konnte die Struktur von Substanz L3 nicht aufgeklärt werden. Für eine erfolgreiche Analyse müsste die Kultivierung in großem Maßstab wiederholt werden, um ausreichend Menge an L3 für die Strukturaufklärung isolieren zu können. Dies setzt jedoch voraus, dass *C. hispanica* konstant L3 produziert, was im Rahmen dieser Arbeit nicht gegeben war. Auch die im Anschluss durchgeführten Bioaktivitätstests erwiesen keine Inhibition (3.3.4).

L2 wurde als Methylindol-3-Carboxylat identifiziert (3.3.1). Dies ist der Methylester der Indol-3-Carbonsäure und gehört somit zu den Indolderivaten. Diese verfügen über ein bityklisches Ringsystem, bestehend aus einem Benzol- und Pyrrolring sowie eine funktionelle Gruppe, beispielsweise eine Carboxy-, Hydroxy- oder Aminogruppe (Kumar und Ritika, 2020; Sundberg, 2012). Hu *et al.* zeigten bereits 2005, dass Methylindol-3-Carboxylat von Bakterien als Sekundärmetabolit produziert wird, wobei sie die Substanz aus dem Ethylacetat-Extrakt des marinen Bakteriums *Streptomyces* sp. isolieren konnten.

2015 konnten Chen und Wang Methylindol-3-Carboxylat als Metabolit des Basidiomyceten *Antrodia albocinnamomea* nachweisen und auch für *Penicillium* sp. HJT-A-6 konnte dies 2024 bestätigt werden (Xiao *et al.*, 2024). Um zu überprüfen, ob *C. hispanica* unabhängig von der Kultivierung in LigS ebenfalls Methylindol-3-Carboxylat als Sekundärmetabolit produziert, sollte dieser zunächst in verschiedenen Komplexmedien fermentiert werden, da während der Kultivierung in Minimalmedium, was im Rahmen dieser Arbeit zur Kontrolle durchgeführt wurde, Methylindol-3-Carboxylat nicht detektiert werden konnte (6.2.5, Abb. 94). Ebenfalls ausgeschlossen werden können PDA, CM und HMG aufgrund bereits durchgeführter Kultivierungen und anschließender HPLC-Analyse (Schön, 2023).

Des Weiteren könnte während der Kultivierung auch mit Isotopenmarkierung gearbeitet werden, indem z.B. ^2H oder ^{13}C supplementiert wird. Kann das Isotop später in dem isolierten Methylindol-3-Carboxylat nachgewiesen werden, wäre dies eine weitere Bestätigung, dass die Substanz als Sekundärmetabolit von *C. hispanica* unabhängig von LigS produziert wird. Im Falle, dass sich dies als negativ erweist, sollte zunächst überprüft werden, ob Methylindol-3-Carboxylat durch die Extraktion und Aufreinigung entstanden ist, denn Lösungsmittel sind für Wechselwirkungen mit Substanzen bekannt (Maltese *et al.*, 2009). Sodass der Methylester möglicherweise am Ende der Extraktion bei der Überführung des Extraktes in das Probengläschen, wobei mit Methanol rückgelöst wurde (2.3.2), entstanden sein könnte. Um dies zu überprüfen, müsste die Kultivierung und Aufreinigung wiederholt und beispielsweise anstelle von Methanol mit Acetonitril, Ethanol oder Isopropanol rückgelöst werden. Nach anschließender Messung an der analytischen HPLC-MS könnte durch den Vergleich mit der ersten Probe, welche mit MeOH rückgelöst wurde, überprüft werden, ob es sich um zwei verschiedene Substanzen handelt oder um Methylindol-3-Carboxylat, was dafürsprechen würde, dass *C. hispanica* die Substanz produziert. Sollte es sich jedoch um zwei verschiedene Substanzen handeln, sollte weitergehend überprüft werden, ob die Substanz, welche mit einem anderen Lösungsmittel als MeOH rückgelöst wurde, möglicherweise Indol-3-Carbonsäure ist.

Denn Indol-3-Carbonsäure kann von Pilzen produziert werden, wie Que *et al.* 2022 anhand des Endophyten *Lasiodiplodia pseudotheobroma* zeigten, und ist eine potenziell Vorstufe von Methylindol-3-Carboxylat. Die anschließende Methylierung, welche möglicherweise durch Methyltransferasen katalysiert wird, wurde jedoch bisher nicht detailliert beschrieben. Um dies zu überprüfen, könnte *C. hispanica* sequenziert und das Genom nach Genen für Methyltransferasen untersucht werden. Sollte dabei ein Gen detektiert werden, könnte man dieses durch homologe Rekombination durch einen Marker, z.B. das grün fluoreszierende Protein (GFP), ersetzen und somit inaktivieren.

Gleichzeitig könnte das Reporter-gen GFP genutzt werden, um die Mutanten in erster Linie visuell von den nicht transformierten Kandidaten zu unterscheiden. Des Weiteren könnte auch mit einem Resistenzmarker, wie z.B. HPT gearbeitet werden. HPT codiert für die Hygromycin B Phosphotransferase, welche den erfolgreich transformierten Organismen ermöglicht auf Selektionsplatten mit Hygromycin B zu wachsen. Dennoch sollte im Anschluss molekularbiologisch überprüft werden, ob der Marker tatsächlich an der gewünschten Stelle integriert und das Gen der Methyltransferase inaktiviert wurde. Ist dies erfolgt, kann die Transformante in Minimalmedium mit LigS kultiviert werden, wobei, im Vergleich zum nicht transformierten Stamm, kein Methylindol-3-Carboxylat detektiert werden sollte.

Für Methylindol-3-Carboxylat konnte anhand der durchgeführten Bioaktivitätstests keine Aktivität detektiert werden (3.3.4). Literaturrecherchen ergaben jedoch, dass Methylindol-3-Carboxylat, isoliert aus *Streptomyces* sp., eine Aktivität gegenüber der humanen Leukämie-Zelllinie K526 erwies, wobei es mit einer Konzentration von 14 µg/mL das Wachstum der Zelllinie inhibierte (Hu *et al.*, 2005). Ebenso berichteten 2014 Jansen *et al.*, dass Methylindol-3-Carboxylat, isoliert aus *Sorangium cellulosum*, ein gramnegatives Myxobakterium, aktiv gegenüber dem grampositiven Bakterium *Nocardia* sp. ist. Somit sollten die Bioaktivitätstests wiederholt und dabei der Fokus vor allem auf zytotoxische und antimikrobielle Assays gelegt werden. Die strukturellen Eigenschaften von Methylindol-3-Carboxylat, machen es zu einem vielseitig nutzbaren Baustein in der Forschung. So dient es bereits als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Ethyl-5-hydroxy-2-(mesitylthiomethyl)-1-methyl-1H-indol-3-carboxylat, welches ein 5-Lipoxygenase-Inhibitor ist (Peduto *et al.*, 2014). Sowie zur Herstellung verschiedener Indol-3-Carbonsäure-Ester, welche die Prostaglandin-E₂-Synthase-1 hemmen können (Troschütz *et al.*, 2008). Auch Derivate des Strukturisomers Methylindol-2-Carboxylat erwiesen beispielsweise eine antiproliferative Aktivität gegenüber Krebszellen, wie HepG2, A549 oder MCF7 (Ji *et al.*, 2014). Sollte die Veresterung tatsächlich aufgrund des experimentellen Vorgehens passiert sein, gäbe es auch Anwendungsmöglichkeiten für Indol-3-Carbonsäure, die dann vermutlich anstelle von Methylindol-3-Carboxylat im KF vorliegen würde. Indol-3-Carbonsäure, isoliert aus dem Kulturfiltrat des Endophyten *Lasioidiploida pseudotheobroma* LPS-1, erwies sich als Synergist der Jasmonsäure und verstärkt somit den Antagonismus gegenüber dem Weizenmehltau (Que *et al.*, 2022).

Die Substanz L8 wurde anhand der NMR-Analyse als 8,9-Dehydroxylaron identifiziert (3.3.1). 8,9-Dehydroxylaron gehört zu den α -Pyronen und wurde erstmals 2007 von Schüffler *et al.* beschrieben. Diese isolierten 8,9-Dehydroxylaron nach der Kultivierung von *Xylaria hypoxylon* als Sekundärmetabolit dessen. Da es sich bei *C. hispanica* ebenso um einen Ascomyceten handelt, wie bei *X. hypoxylon*, könnte potenziell auch *C. hispanica* unabhängig vom LigS in einem vollwertigen Komplexmedium 8,9-Dehydroxylaron produzieren.

Zu überprüfen ginge dies im Rahmen von Kultivierungen in verschiedenen Komplexmedien und anschließender HPLC-Analyse des KFs. Die Medien PDA, CM und HMG können bereits aufgrund durchgeführter Kultivierungen sowie anschließender HPLC-Analyse ausgeschlossen werden (Schön, 2023). Sollte *C. hispanica* auch ohne LigS 8,9-Dehydroxylaron produzieren können, sollte überprüft werden, ob die Ausbeute ohne LigS höher oder niedriger ist und diese durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen, wie z.B. Temperatur, Nährstoff- und Substratversorgung, verbessert werden.

α -Pyrone verfügen ebenfalls, wie die Harzsäure-Derivate, über eine Carbonylgruppe sowie konjugierte Doppelbindungen, wodurch diese gute Ausgangsstoffe für die organische Synthese sind. Die Verbindungen bieten vielfältige industrielle Anwendbarkeit, wie z.B. bei der Herstellung von Pharmazeutika aufgrund deren chemotherapeutischen Wirkung sowie Aktivität gegenüber Entzündungen oder mikrobiellen Infektionen (Bhat *et al.*, 2017). Als Duft- und Aromastoffe in der Parfüm- und Lebensmittelindustrie sowie der Materialherstellung kommen sie ebenfalls zum Einsatz (Souza Ramos *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2020). Somit wäre zu überprüfen, ob auch 8,9-Dehydroxylaron, wozu bisher nichts bekannt ist, sich für den industriellen Einsatz anbietet.

Zahlreiche α -Pyron-Derivate sowie synthetisierte Analoga verfügen über verschiedene biologische Aktivitäten. Pu *et al.* berichteten 2021 über antiinflammatorische Aktivitäten sowie eine reduzierte Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase, welche bei Immunaktivierungen und Entzündungen relevant ist. Des Weiteren konnten auch Aktivitäten gegenüber Biofilmen, Mikroorganismen sowie *Biofiling* beobachtet werden (Khan *et al.*, 2021). Auch Schüffler *et al.* konnten 2007 im Zuge ihrer Arbeit eine Aktivität gegenüber *Micrococcus luteus* detektieren, welche im Zuge dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden konnte. Insgesamt konnte keine Bioaktivität innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen werden (3.3.4). Dennoch sollten die Bioaktivitätstests wiederholt und ausgeweitet werden.

Etwa ein halbes Jahr nachdem L1, L2, L3 und L8 detektiert und bis auf L3 auch aufgereinigt werden konnten, war dies nicht mehr möglich. Im Zuge der ab dann durchgeführten Kultivierungen wurde eine neue Substanz (L7) mit einer Retentionszeit von 13,8 min und einer Masse von 222 m/z detektiert (3.3.1). Durch die anschließende Aufreinigung und NMR-Analyse konnte L7 ebenfalls, wie die Substanz P, als zwei Substanzen L7-1 und L7-2 differenziert werden, wobei nur L7-1 strukturell aufgeklärt und als 5-Carboxymellein identifiziert werden konnte (3.3.1). Schon 1983 berichteten Anderson *et al.*, dass sie 5-Carboxymellein nach Kultivierung von *Numularia discreta*, *Hypoxylon illitium* und *H. mammatum*, zugehörig zur Familie der *Xylariaceae*, isolieren konnten. Da es sich bei *C. hispanica* ebenfalls um einen Pilz aus der Familie der *Xylariaceae* handelt, liegt es nahe, dass auch dieser 5-Carboxymellein produzieren kann.

1986, isolierten Okuno *et al.* aus dem Kulturfiltrat von *Valsa ceratosperma*, einem Apfelpflanzen-Pathogen, ebenfalls 5-Carboxymellein und identifizierten es als Sekundärmetaboliten sowie dessen phytotoxische Eigenschaften, die sich vor allem in der Braunfärbung von Apfelzweigen zeigte. Die phytotoxischen Eigenschaften konnten anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Assays gegenüber *Setaria italica* und *Lepidium sativum*, wobei eine Wachstumsinhibition untersucht wurde, nicht bestätigt werden (3.3.4.2). Dies könnte daran liegen, dass es sich bei *S. italica* und *L. sativum* nicht um einen Baum und somit nicht um ein Holzgewächs handelt. Spannend wäre hier zu prüfen, ob 5-Carboxymellein möglicherweise gegenüber anderen Holzgewächsen eine phytotoxische Wirkung hat. Des Weiteren könnte überprüft werden, ob 5-Carboxymellein eine Bioaktivität gegenüber den ausgekeimten Pflanzen *S. italica* und *L. sativum* aufweist und es möglicherweise zur Braunfärbung der Blätter kommt, was für Melleine im Allgemeinen bekannt ist (Venkatasubbaiah *et al.*, 1991). Im Rahmen der durchgeführten Bioaktivitätstests konnten keine weiteren Aktivitäten festgestellt werden (3.3.4). Dennoch sollte dies in zukünftigen Studien weiter untersucht werden, da Mellein, aber auch Sekundärmetabolite im Allgemeinen, bekannt für zahlreiche Aktivitäten sind. 5-Carboxymellein ist ein Derivat von Mellein und verfügt über ein Isocumarin-Skelett sowie eine Carboxylgruppe (3.3.1, Abb. 43), wodurch es ebenso wie 8,9-Dehydroxylaron zu den Isocumarin-Derivaten gehört. Für weiterführende Anwendungen könnte die Carboxylgruppe von Bedeutung sein. Anhand derer könnten beispielsweise Amidierungen oder Veresterungen durchgeführt und die Substanz somit modifiziert werden.

4.1.4 Identifizierung und Charakterisierung von Anisaldehyd

Nach Kultivierung von *Pleurotus pulmonarius* in Minimalmedium mit KL konnte ein neues Signal (Substanz A1) bei einer Retentionszeit von 14,1 min detektiert werden. Ebenso wurde Substanz A1 auch im Kultivierungsansatz mit *Pleurotus ostreatus* entdeckt, wobei im Vergleich zu *P. pulmonarius* A1 in beiden Ansätzen, d.h. sowohl mit LigS als auch mit KL, detektiert werden konnte. Nach Fermentation im 20 L Maßstab und anschließender Aufreinigung und NMR-spektroskopischer Untersuchung konnte die Substanz A1 mit einer Masse von 177 m/z als Anisaldehyd identifiziert werden (3.5.2). Normalerweise hat Anisaldehyd als Reinsubstanz eine Masse von 136 m/z (Brunvoll *et al.*, 1985). Der Unterschied von 41 m/z, liegt daran, dass bei der Aufreinigung an der präparativen HPLC mit dem Lösungsmittel Acetonitril gearbeitet wurde. Dabei ist es nicht ungewöhnlich, dass das Lösungsmittel sich als Solvatrest anlagert oder aber sogar das Molekül kristallisiert, wobei dann von Kristallsolvaten gesprochen wird (Wang *et al.*, 2014; Reimers und Hall, 1999). Durch weiterführende Trocknung unter Vakuum könnte das Acetonitril-Addukt entfernt werden (Armarego, 2017).

Bereits Gutiérrez *et al.* zeigten 1994 in ihrer Arbeit, dass Anisaldehyd von *Pleurotus pulmonarius* und *Pleurotus ostreatus* nach Kultivierung in Submerskulturen mit Lignin, Stroh oder Glukose produziert wird. Sie zeigten damit, dass die Gattung *Pleurotus* Lignin degradieren und gleichzeitig die aromatische Verbindung Anisaldehyd produzieren kann. Dass Anisaldehyd aber nicht nur durch den oxidativen Abbau von Ligninkomponenten entstehen kann, sondern auch ausgehend von Aminosäuren, wie z.B. Tyrosin, zeigte Okamoto *et al.* (2000) für *P. ostreatus*.

Anisaldehyd zählt zu den wichtigsten aromatischen Verbindungen, die industriell genutzt werden. Es eignet sich vor allem als Geschmacksstoff in Lebensmitteln oder aber auch als Duftstoff in Parfüms, wodurch die Nachfrage stetig steigt. 2022 wurde der Weltmarkt bereits auf 627 Mio. USD geschätzt (D'Arrigo *et al.*, 2024). Da in der heutigen Zeit mehr denn je darauf geachtet wird, dass die Produkte natürlichen Ursprungs sind und auch die Herstellung umweltfreundlicher abläuft, ist das Interesse groß immer wieder neue Verfahren zu etablieren, die dies berücksichtigen. Durch die Kultivierung von *P. ostreatus* und *P. pulmonarius* in lignolytischen Industrieabfällen, wird nicht nur dieser verwertet, sondern gleichzeitig Anisaldehyd synthetisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Kultivierung von *P. pulmonarius* ein Maximum von 3,9 mg/L Anisaldehyd an Tag 10 erzielt (3.5.3, Abb. 62). Dies kann jedoch durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen, wie z.B. konstanter pH-Wert oder die stetige Zugabe von Nährstoffen oder dem Substrat weiter optimiert und dadurch erhöht werden. Gleichzeitig könnte dies auch für *P. ostreatus* durchgeführt werden und somit ein Beitrag zu der Menge sein, die synthetisch hergestellt wird und auch stetig in der Nahrungsmittelindustrie oder als Zwischenstufe in der Industrie benötigt wird.

Doch Anisaldehyd hat nicht nur einen industriellen Nutzen, sondern weist auch verschiedene Bioaktivitäten auf. 2001 konnten Okamoto *et al.* bereits eine Aktivität gegenüber *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger* und *Fusarium oxysporum* detektieren. 2019 berichteten Che *et al.* über die Aktivität gegenüber *Penicillium digitatum* und *Penicillium italicum*, den pathogenen Erregern von Zitrusfrüchten. Die antimykotische Wirkung liegt bei einer Konzentration von 2 µl/mL und stört die Zellwandintegrität der Pilze. Des Weiteren wurde 2011 in der Arbeit von Shreaz *et al.* von einer Aktivität gegenüber Fluconazol resistenten und sensitiven *Candida* Stämmen berichtet, wobei hierbei die Ergosterol-Biosynthese, aufgrund von zu geringem NADPH, was durch die hochregulierte Arylakohol-Dehydrogenase verbraucht wird, reduziert wird.

4.2 Analyse extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme und die potenzielle Biosynthese der isolierten phenolischen Substanzen

4.2.1 Analyse extrazellulärer Enzymaktivitäten sowie die potenzielle Biosynthese der Harzsäure-Derivate

Pilze produzieren intra- sowie extrazelluläre Enzyme, wobei die intrazellulären Enzyme für die Regulation des zellulären Stoffwechsels sowie die Biosynthese von Primär- und Sekundärmetaboliten zuständig sind. Extrazelluläre Enzyme hingegen sind am Abbau komplexer Substrate aus der Umgebung beteiligt und dienen somit der Nährstoffbereitstellung und Aufnahme. Da Pilze den Standort nicht wechseln können und somit den jeweiligen Umgebungsbedingungen ausgesetzt sind, verfügen diese über eine Vielzahl verschiedener extrazellulärer Enzyme, welche eine Anpassung, an die sich verändernden Bedingungen ermöglichen. Vor allem beim Abbau pflanzlicher Polymere, wie z.B. Zellulose, Pektin oder Lignin sind extrazelluläre Pilzenzyme beteiligt. Neben der ökologischen Bedeutung finden diese auch zahlreiche industriell bedeutsame Einsatzmöglichkeiten, wie z.B. in der Lebensmittel- und Getränketechnologie oder beim *Biobleaching* in der Textilindustrie. Etwa 50 % aller industriell eingesetzten Enzyme sind pilzlichen Ursprungs (El-Gendi *et al.*, 2021; Bahadur *et al.*, 2015; Kohler *et al.*, 2015). Um den biotechnologischen Nutzen weiter voranzutreiben, besteht großer Bedarf weitere neue Enzyme zu finden, welche in großem Maßstab in der Industrie eingesetzt werden können. Aufgrund dessen, wurde im Rahmen dieser Arbeit, während der Kultivierung verschiedener Pilzisolat in lignolytischem Industrieabfall, nicht ausschließlich nach neuen phenolischen Substanzen gesucht, sondern auch die daran beteiligten extrazellulären Enzyme näher analysiert.

Bei der Kultivierung von *Agrocybe pediades* mit Magnesium-Lignosulfonat (LigS) konnten zwei Harzsäure-Derivate, 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2), detektiert werden, wobei zunächst während des Screening-Verfahrens anhand der Durchführung des ABTS-Tests eine hohe Laccase-Aktivität von 33 U/L detektiert wurde (3.1.1). Dies konnte bereits ebenfalls während einer Masterarbeit beobachtet werden (Pfrengle, 2022). Das Laccasen zu den Lignin-degradierenden Enzymen gehören ist bereits bekannt und konnte unter anderem von Youn *et al.* 1995 gezeigt werden. Aber nicht nur Laccasen sind am Ligninabbau beteiligt, sondern ebenso Mangan- und Ligninperoxidasen sowie Polyphenoloxidasen, was schon in mehreren Studien gezeigt werden konnte (Datta *et al.*, 2017; Janusz *et al.*, 2017; Hatakka und Hammel, 2010). Um die, während der Bildung von P1 und P2, beteiligten Enzyme besser analysieren zu können, wurde zunächst ein Fermentationsverlauf über 14 Tage (d) durchgeführt und dabei die Laccase- und Peroxidase-Aktivität analysiert (3.1.3).

Dabei konnte beobachtet werden, dass zu Beginn der Fermentation keine Laccase-Aktivität, sondern Peroxidase-Aktivität detektiert wurde. P1 und P2 waren bereits nach 48 h mittels HPLC-Analyse nachweisbar. Die Konzentration stieg parallel mit der Peroxidase-Aktivität bis Tag 4 an. In den Tagen danach wurde Laccase-Aktivität detektiert, jedoch sank die Menge an P1 und P2. Trotz eines kurzzeitigen Anstiegs der Peroxidase-Aktivität an Tag 7, fiel die Menge an P1 und P2 weiter ab. Im Anschluss, an Tag 11, konnte die höchste Peroxidase-Aktivität mit 25,4 U/L gemessen werden, wobei ein Tag später ein weiteres Mal eine erhöhte Menge an P1 und P2 (4,3 mg/L) mittels HPLC-Analyse detektiert wurde. Laccase-Aktivität konnte ab Tag 10 nicht mehr detektiert werden. Aufgrund des durchgeführten Fermentations-Monitorings und der abwechselnd gemessenen Aktivitäten von Laccase und Peroxidase lag die Vermutung nahe, dass es sich möglicherweise um das Zusammenspiel mehrere Enzyme handelt.

Im Allgemeinen ist bekannt, dass an der Degradation des Lignins zumeist verschiedene Enzyme beteiligt sind, was bereits anhand mehrerer Studien gezeigt wurde (Datta *et al.*, 2017; Janusz *et al.*, 2017; Hatakka und Hammel, 2010). Um dies noch weiter zu analysieren, wurde zunächst ein qualitativer Nachweis für extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme durchgeführt, wobei verschiedene Substrate zum Einsatz kamen (3.1.3.1). Dabei konnte, wie in Abbildung 19 zu sehen, im Vergleich zur Negativkontrolle eine Laccase-Aktivität durch die zu beobachtende Entfärbung der LBM-ABTS-Platte detektiert werden, was die Beobachtung der hohen Laccase-Aktivität während der ersten Kultivierung stützt. Des Weiteren konnte auch eine Aktivität bei der Oxidation phenolischer Substanzen detektiert werden, was den nachgewiesenen Abbau des LigS stärkt und durch die Entfärbung der Agarplatte mit Poly R ebenfalls gestützt wird. Poly R steht ebenso für die Aktivität von Lignin- und Manganperoxidasen, welche ebenfalls während des Fermentationsverlaufs anhand des ABTS-Tests, detektiert werden konnten.

Ruiz-Dueñas *et al.* konnten 2021 anhand durchgeführter Genomanalysen 11 Laccasen für *A. pediades* nachweisen, wovon im gleichen Jahr durch die Untersuchungen von Aza *et al.* (2021) eine spezifische extrazelluläre Laccase nachgewiesen wurde. Sie verglichen das Sekretom des Pilzes unter lignolytischen Bedingungen mit dem unter nicht-lignolytischen Bedingungen und konnten dabei die Laccase ApL identifizieren, welche nur unter lignolytischen Bedingungen sekretiert wurde. Durch den Abgleich des Proteins mit dem Genom von *A. pediades* AH 40210, welches in der Datenbank des *Joint Genome Institute* (JGI) hinterlegt ist, konnten sie der Laccase die JGI-ID 823363 zuordnen. Aza *et al.* konnten außerdem für ApL im Vergleich zu anderen Laccasen, isoliert aus Basidiomyceten, eine verbesserte Aktivität bei neutralen pH-Werten beobachten, was ähnlich zu den in dieser Arbeit angewandten Kultivierungsbedingungen ist. Zu unterscheiden ist jedoch, dass Aza *et al.* die Laccase unter Festphasenbedingungen identifizierte, nachdem der Pilz auf Weizenstroh kultiviert wurde und im Zuge dieser Arbeit die Kultivierung in Submerskulturen stattfand.

Da González-González *et al.* im Jahr 2023 zudem eine Laccase nach Submerskultivierung von *A. pediades* unter nicht-lignolytischen Bedingungen isolieren konnten, welche zudem zu 86 % identisch mit der identifizierten Laccase von Aza *et al.* sein soll, sollte auch im Rahmen dieser Arbeit zunächst die potenzielle Beteiligung sekretierter Laccasen während der Bildung von P1 und P2 untersucht und eine mögliche Übereinstimmung überprüft werden.

Da es nicht möglich war nach Kultivierung in LigS eine Proteinfällung aus dem Kulturfiltrat durchzuführen, um potenzielle Laccasen nachzuweisen, da sich das gelöste LigS nicht abtrennen ließ, wurde zunächst ein Alternativmedium ohne lignolytische Bestandteile gesucht. 2013 zeigten Gao *et al.* anhand von *Trichoderma harzianum*, dass die Zugabe von Sojamehl im Kultivierungsansatz die Produktion von Laccasen steigern kann, sodass *A. pediades* zur Durchführung dieses Experiments in Soja-Medium kultiviert wurde (3.1.3.2). Dabei konnte nach 8 d mit 40 U/L ein Maximum an Laccase-Aktivität im Kulturfiltrat detektiert werden. Das KF wurde sterilfiltriert und im Anschluss daran mit LigS versetzt und für 48 h kultiviert, wobei bereits nach 24 h P1 und P2 nachgewiesen werden konnten (Abb. 20). Diese Beobachtung stützt, die während des Fermentationsverlaufs und qualitativen Enzymtest beobachteten Ergebnisse. Da die mehrfache Wiederholung dieses Versuchs ergebnislos blieb und somit auch eine nachfolgende Proteinfällung nicht durchgeführt werden konnte, wurde versucht die Beteiligung möglicher Peroxidasen zu analysieren. Der dafür durchgeführte Katalase-Assay (2.4.3) führte zu keiner Bestätigung, da trotz der Zugabe der Katalase, welche das für die Peroxidasen notwendige Wasserstoffperoxid spalten und somit zur Inaktivität führen sollte, weiterhin P1 und P2 nachgewiesen werden konnten (3.1.3.3, Abb. 21).

Da zu diesem Zeitpunkt die Struktur von P1 und P2 aufgeklärt wurde und im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen, Abietinsäure (AA) bzw. Dehydroabietinsäure (DHAA), sowohl eine Hydroxylierung am C₁₅- bzw. C₁₆-Atom sowie am C₇-Atom zusätzlich eine Oxidation stattgefunden haben muss, wurde der Fokus auf Per- und Monooxygenasen gelegt. Zunächst wurde untersucht, ob an der Bildung von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2) möglicherweise eine unspezifische Peroxygenase (UPO) beteiligt ist. Denn 2021 zeigten Tonin *et al.* dass die rekombinante unspezifische Peroxygenase rAaeUPO von *Agrocybe aegerita* (UniProt ID: B9W4V6) Ethylbenzol hydroxylieren kann. Durch den Abgleich der Proteinsequenz der unspezifischen Peroxygenase von *A. aegerita* mit dem beim JGI hinterlegten Genom von *A. pediades* AH 40210, konnte ein *Precursor* für eine aromatische Peroxygenase analysiert werden, sodass vermutet wurde, dass auch der in dieser Arbeit verwendete Stamm Peroxygenasen sekretiert und somit möglicherweise AA bzw. DHAA hydroxylieren kann. UPOs katalysieren die Übertragung eines Sauerstoffatoms von dem Co-Substrat Wasserstoffperoxid auf ein Zielsubstrat (Hofrichter und Ullrich, 2006; Hofrichter *et al.*, 2015), wodurch Hydroxylierungen an phenolischen Verbindungen, wie z.B. AA bzw. DHAA entstehen können.

Im Vergleich zur mitgeführten Positivkontrolle, der *Magnaporthe oryzae* Expressionsmutante *Mo::AaeUPO* von Jacob *et al.* (2021), konnte jedoch keine Aktivität anhand des quantitativen Peroxygenase-Assays detektiert werden (3.1.3.4). Da auch P450-Monooxygenasen diese Modifikation katalysieren können und somit potenziell an der Bildung von P1 und P2 beteiligt sein könnten, wurde versucht anhand des Kohlenstoffmonoxid-Assays (2.4.5) die Aktivität dieser zu bestätigen. Doch auch dieses Experiment verlief negativ (3.1.3.5). Da es nicht möglich war, dass für die Bildung von P1 und P2 verantwortliche Enzym zu detektieren und aufzuklären, könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Enzyme handelt oder die 2024 erstmals von Sánchez-Ruiz *et al.* isolierte Manganperoxidase, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht im Detail untersucht wurde, die Bildung von P1 und P2 katalysiert. Um dies zu überprüfen, könnte zunächst das Genom des in dieser Arbeit verwendeten Stamms von *A. pediades* auf das Vorhandensein einer Manganperoxidase untersucht werden. Erweist sich dies als positiv könnte über eine homologe Rekombination versucht werden das für dieses Enzym codierende Gen zu inaktivieren. Ist dies erfolgt kann überprüft werden, ob bei der Kultivierung der Mutante in LigS P1 und P2, wie vermutet, nicht mehr synthetisiert werden. Da sich dies jedoch möglicherweise als schwierig erweisen könnte, da Basidiomyceten nur schwer transformierbar sind, könnte das potenzielle Gen zunächst heterolog in einen anderen, leichter transformierbaren, Organismus, wie z.B. *Magnaporthe oryzae* oder *Penicillium steckii* kloniert werden, um dann wiederum inaktiviert zu werden. Hierbei wäre darauf zu achten, dass ein Organismus gewählt wird, der keine oder nur wenige eigene Lignin-modifizierende Enzyme aufweist.

Des Weiteren könnte eine Sekretomanalyse durchgeführt werden, wobei über mehrere Kultivierungszeitpunkte analysiert wird, welche Proteine zu welchem Zeitpunkt sekretiert werden. Dies könnte im Anschluss mit den im KF vorhanden Substanzen korreliert werden, indem zusätzlich noch eine Metabolomanalyse durchgeführt wird. Somit könnte gezielt untersucht werden, ob die detektierten sekretierten Enzyme im Zusammenhang mit den analysierten Abbauprodukten bzw. neu entstandenen Verbindungen steht. Dadurch konnte beispielsweise für *Aspergillus fumigatus* G-13 gezeigt werden, dass verschiedene Schlüsselenzyme und Stoffwechselwege am Abbau von Lignin-Modellverbindungen beteiligt sind (Zhu *et al.*, 2023), wodurch angenommen werden kann, dass dies auch beim Abbau industrieller Ligninabfälle der Fall ist.

P1 und P2 konnten ebenfalls im Kultivierungsansatz von *Pleurotus pulmonarius* und *Pleurotus ostreatus* detektiert werden (3.5 & 3.6). Anhand des Vergleichs der Aufnahmen des qualitativen Enzymtests dieser mit dem von *Agrocybe pediades* (Abb. 74), fällt auf, dass diese sehr ähnlich zueinander sind. Bei beiden konnte ebenso eine intensive Färbung der LBM-ABTS-Platte detektiert werden sowie eine Entfärbung der Poly R-Platte, was für eine Laccase, sowie Lignin- und Manganabhängige Peroxidase-Aktivität steht.

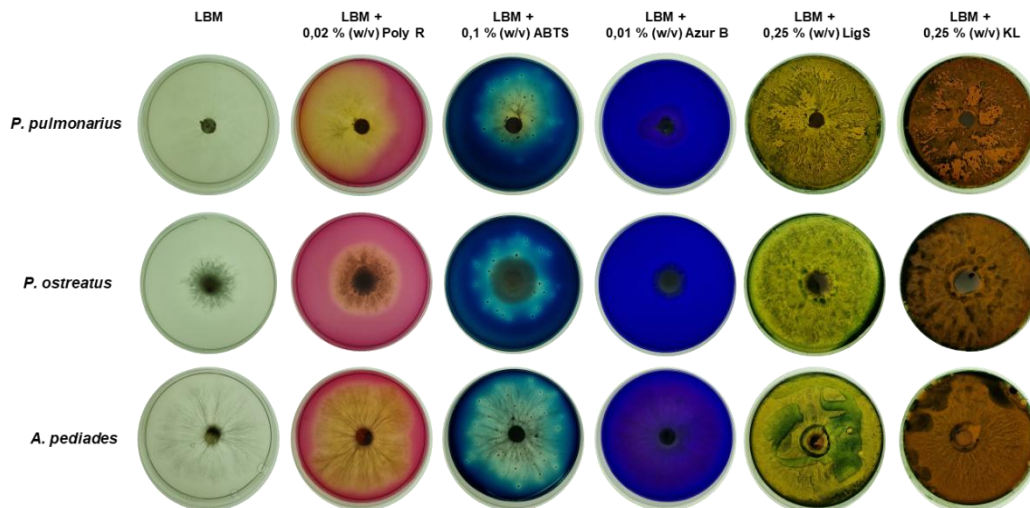


Abbildung 74: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus* und *Agrocybe pediades* im Vergleich. Lignin modifying enzyme basal medium (LBM) wurde mit verschiedenen Substraten versetzt, um extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme nachzuweisen. Die Entfärbung von Poly R weist Polyphenoloxidasen und Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen nach. Die Verfärbung von ABTS weist Laccasen nach und die von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen. Zum Nachweis der Oxidation phenolischer Komponenten wurden Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) verwendet. Als Wachstumskontrolle wurde eine LBM-Platte ohne Zusätze mit dem jeweiligen Organismus inokuliert.

Bereits 1997 konnten Palmieri *et al.* sowie 2003 Marques De Souza und Peralta zeigen, dass sowohl *P. pulmonarius* als auch *P. ostreatus* Laccasen produzieren können. Youn *et al.* verdeutlichten 1995 außerdem, dass Lignin- und Manganabhängige Peroxidasen oftmals im Zusammenspiel mit Laccasen wirken, was die Vermutung stärkt, dass bei der Degradation des Lignins und der parallelen Bildung von P1 und P2 mehrere Enzyme beteiligt sind. Um diese Enzyme näher analysieren und charakterisieren zu können, könnte anhand einer RNA-Sequenzierung zunächst überprüft werden, welche Gene während der Kultivierung in Magnesium-Lignosulfonat bzw. Kraftlignin hochreguliert sind. Aufgrund dessen, dass beide Pilze zur Gattung *Pleurotus* gehören, könnte angenommen werden, dass diese über ein ähnliches Genprofil verfügen und somit potenziell die gleichen Enzyme produzieren (Li *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2023). Das Genexpressionsprofil könnte dann auch mit einem Expressionsprofil von *Agrocybe pediades* verglichen werden, um potenzielle Ähnlichkeiten zu prüfen und die Enzyme, welche an der Bildung von P1 und P2 beteiligt sind, näher zu analysieren.

Der Fokus könnte dabei vor allem auf Manganperoxidasen gelegt werden, welche auch bereits für *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus pulmonarius* nachgewiesen werden konnten (dos Santos Bazanella *et al.*, 2013; Asada *et al.*, 1995), jedoch ebenso wie für *A. pediades* im Rahmen dieser Arbeit nicht näher analysiert wurden.

Im Zuge der Arbeit konnte ein weiteres Harzsäure-Derivat, 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4), nach der Kultivierung von *Chaetomium leptoderma* in Magnesium-Lignosulfonat, detektiert werden. Durch den Vergleich des Fermentations-Monitorings mit dem von *Agrocybe pediades* fällt auf, dass auch hier die Substanz innerhalb von 24 h bereits detektiert werden konnte. Anders im Vergleich zu *A. pediades* ist jedoch, dass nur in der ersten Hälfte der Fermentation eine Peroxidase-Aktivität detektiert werden konnte und danach bis zum Ende nur noch Laccase-Aktivität (3.4.3, Abb. 53). Dies deutet daraufhin, dass möglicherweise nur Peroxidasen an der Produktion von 7-oxo-Dehydroabietinsäure beteiligt sind, was auch durch den Vergleich der fotografischen Auswertung des qualitativen Enzymtests (3.4.3.1, Abb. 54), wobei eine Entfärbung der Poly R-Platte ausblieb, im Gegensatz dazu aber die Platte mit Azur B, was für eine Lignin- und Manganabhängige Peroxidase-Aktivität steht, fast vollständig entfärbt wurde, gestützt wird. Dies konnte wiederum bei *P. pulmonarius*, *P. ostreatus* und *A. pediades*, welche ebenfalls ein Harzsäure-Derivat produzieren, nicht beobachtet werden (Abb. 75).

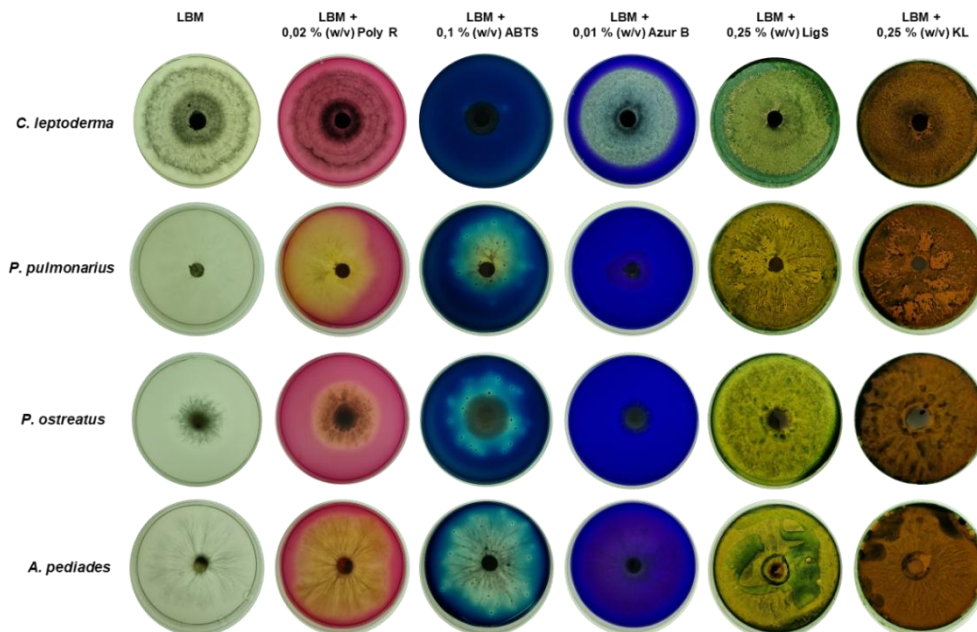


Abbildung 75: Fotografische Dokumentation des qualitativen LBM-Agarplatten-Tests zum Nachweis verschiedener extrazellulärer Lignin-modifizierender Enzyme von *Chaetomium leptoderma*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus* und *Agrocybe pediades* im Vergleich. Lignin modifying enzyme basal medium (LBM) wurde mit verschiedenen Substraten versetzt, um extrazelluläre Lignin-modifizierende Enzyme nachzuweisen. Die Entfärbung von Poly R weist Polyphenoloxidasen und Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen nach. Die Verfärbung von ABTS weist Laccasen nach und die von Azur B Lignin- bzw. Manganabhängige Peroxidasen. Zum Nachweis der Oxidation phenolischer Komponenten wurden Magnesium-Lignosulfonat (LigS) bzw. Kraftlignin (KL) verwendet. Als Wachstumskontrolle wurde eine LBM-Platte ohne Zusätze mit dem jeweiligen Organismus inokuliert.

1998 konnten Chefetz *et al.* zeigen, dass *Chaetomium thermophilum* eine Laccase sekretiert, was die Ergebnisse dieser Arbeit stärkt. Außerdem konnten Troya *et al.* im Jahr 2000 anhand von *C. globosum* und *C. erraticum* zeigen, dass *Chaetomium* Arten lignolytische Enzyme sekretieren können, wobei eine Manganperoxidase sowie Laccase nachgewiesen wurde. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass am Ligninabbau, sowie der parallelen Metabolisierung der Harzsäure-Derivate, Laccasen und Manganperoxidasen beteiligt sind. Aufgrund dessen, sollte dies in weiteren Experimenten für *C. leptoderma*, aber auch für *A. pediades*, *P. pulmonarius* und *P. ostreatus* weiter untersucht werden.

4.2.2 Analyse extrazellulärer Enzymaktivitäten sowie die potenzielle Biosynthese des Lignin-Derivates

Bei der Kultivierung von *Alternaria alstroemeriae* in Magnesium-Lignosulfonat konnte das Lignin-Derivat Detetrahydroconidendrin (X1) isoliert werden (3.2). Beim 14-tägigen Fermentations-Monitoring fiel auf, dass die Substanz erst nach einer Woche detektierbar war (3.2.3, Abb. 31). Das für die Katalyse zuständige Enzym könnte möglicherweise erst durch die im Medium vorhandenen Signalstoffe produziert und sekretiert worden sein (Archer und Peberdy, 1997; Mózsik *et al.*, 2022). Da von Beginn an nahezu abwechselnd Laccase- und Peroxidase-Aktivität detektiert werden konnte (3.2.3, Abb. 31), jedoch Detetrahydroconidendrin erst nach einer Woche detektiert und auch dann keine Korrelation mit der Substanzmenge beobachtet wurde (3.2.3, Abb. 31), liegt die Vermutung nahe, dass die gemessene Laccase- und Peroxidase-Aktivität nicht im Zusammenhang mit der Bildung von X1 steht. Beim qualitativen Nachweis konnte durch die Verfärbung der LBM-ABTS-Platte Laccase-Aktivität nachgewiesen werden, was die quantitativen Ergebnisse stützt. Ebenfalls beobachtet wurde der positive Nachweis zur Oxidation phenolischer Substanzen, was den, anhand des Abgleichs der HPLC-Chromatogramme detektierten, Ligninabbau ebenfalls stärkt (3.2.3.1, Abb. 32; 6.2.3, Abb. 91).

Bereits Irfan *et al.* konnten 2018 anhand von *Alternaria alternata* zeigen, dass *Alternaria* Arten Laccasen produzieren und sekretieren können. Ebenso konnten Singh und Gupta 2021 für einen weiteren *A. alternata* Stamm, isoliert aus Bodenproben, über einen qualitativen ABTS-Test Laccase-Aktivität nachweisen. Erst letztes Jahr wurden zudem zwei neue Laccasen LachU1 und LachU2 aus *Alternaria* sp. HU isoliert und charakterisiert (Radveikienė *et al.*, 2024). Dass *A. alstroemeriae* ebenfalls, wie in dieser Arbeit gezeigt, Laccasen produziert und sekretiert ist aufgrund der Zugehörigkeit zur Gattung *Alternaria* nicht auszuschließen. Denn verschiedene Arten innerhalb einer Gattung haben durchaus ähnliche bzw. gleiche Enzyme (Rajarammohan *et al.*, 2019; Dang *et al.*, 2015).

Die während dieser Arbeit zu Beginn des Fermentations-Monitorings detektierte Peroxidase-Aktivität könnte möglicherweise auf eine Ligninperoxidase zurückzuführen sein, wie bereits 2016 von Sharma *et al.* für *Alternaria alternata* ANF238 beobachtet wurde. Um dies zu überprüfen, sollte der Versuch wiederholt und ein Enzym-Assay mit z.B. Veratrylalkohol oder Azur B durchgeführt werden, der speziell für den Nachweis von Ligninperoxidasen angewandt wird (Arora und Gill, 2001). Dennoch ist davon auszugehen, dass die detektierte Laccase- und Peroxidase-Aktivität vorwiegend am Abbau der Ligninbestandteile, wie in Abbildung 24 zu sehen, beteiligt ist und nicht an der Metabolisierung von Conidendrin zu Detetrahydroconidendrin.

Conidendrin ist höchstwahrscheinlich die Vorstufe von X1, was zum einen von Kuo *et al.* 1990 durch experimentelle Beobachtungen nachgewiesen werden konnte und zum anderen durch, den in dieser Arbeit durchgeführten Abgleich der HPLC-Chromatogramme, wobei das im LigS enthaltene Conidendrin nach der Kultivierung mit *A. alstroemeriae* nicht mehr nachweisbar ist (3.2.1, Abb. 24), bestätigt werden konnte. Bei der Metabolisierung von Conidendrin zu Detetrahydroconidendrin werden vier Wasserstoffatome abgespalten und aus dem Cyclohexanring wird ein Benzolring (Abb. 76). Die Dehydrogenierung könnte möglicherweise durch Dehydrogenasen katalysiert werden. So konnten Eshboev *et al.* 2025, für *A. alstroemeriae* S6 zwei Alkohol-Dehydrogenasen sowie eine *Short Chain* Dehydrogenase/Reduktase nachweisen, welche dehydrierende bzw. reduzierende Funktionen haben. Da *A. alstroemeriae* S6, ebenso wie der in dieser Arbeit verwendete Pilzstamm, endophytischen Ursprungs ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch der in dieser Arbeit verwendete Organismus über diese oder ähnliche Enzyme verfügt und das Conidendrin daher zu Detetrahydroconidendrin metabolisieren konnte.

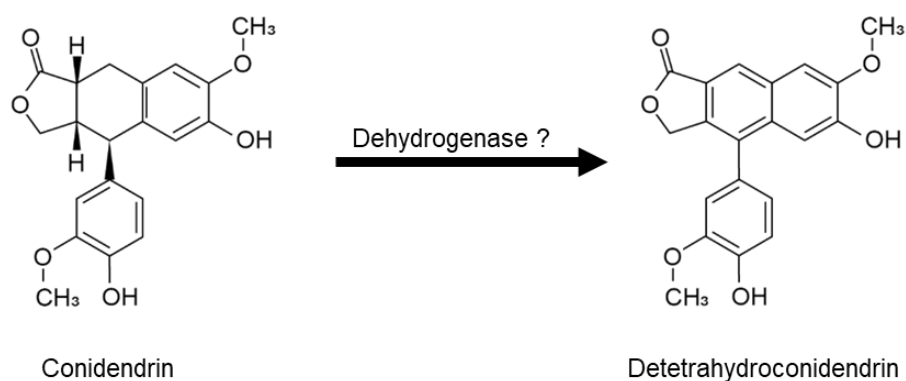


Abbildung 76: Potenzieller Schritt der Metabolisierung von Conidendrin zu Detetrahydroconidendrin.

Um dies zu beweisen, könnte zunächst eine *Proteomics*-Analyse durchgeführt werden, wobei die, unter den lignolytischen Kultivierungsbedingungen, sekretierten Enzyme analysiert und mit einem Kultivierungsansatz ohne lignolytische Bedingungen verglichen werden. Zusätzlich könnte eine Genomsequenzierung durchgeführt werden, um nach möglichen Dehydrogenase-Genen zu suchen. Sollte sich dies als erfolgreich erweisen und mit den Ergebnissen der *Proteomics*-Analyse korrelieren, könnte das ermittelte Protein zunächst anhand eines *in vitro* Assays auf seine Aktivität hin überprüft werden. Dazu würde zunächst eine Proteinsuspension angefertigt werden, die dann zusammen mit der Substanz Conidendrin kultiviert werden würde. Anschließend würde der Ansatz extrahiert und mittels HPLC-MS analysiert werden, wobei im Vergleich zur Negativkontrolle Detetrahydroconidendrin detektiert werden könnte. Des Weiteren könnte das für die Dehydrogenase codierende Gen z.B. heterolog in einen leicht-transformierbaren Organismus wie z.B. *E. coli*, *S. cerevisiae* oder *M. oryzae* transformiert werden. Dabei sollte jedoch darauf geachtet werden, dass der gewählte Organismus nicht über eigene Enzyme verfügt, welche die Metabolisierung von Conidendrin zu Detetrahydroconidendrin katalysieren können. Nach erfolgreicher Transformation könnte durch die Zugabe des Substrates Conidendrin geprüft werden, ob die transformierten Organismen, die Metabolisierung durchführen können. Ist dies der Fall, sollte Detetrahydroconidendrin im Anschluss im KF mittels HPLC-Analyse nachweisbar sein. Eine weitere Nachweismöglichkeit wäre die Inaktivierung der durch die Genomanalyse ermittelten Gene und die anschließende Kultivierung von *A. alstroemeriae* mit Magnesium-Lignosulfonat. Kann anschließend im KF kein Detetrahydroconidendrin nach HPLC-Analyse detektiert werden, wäre dies ebenfalls ein Nachweis für die Zuständigkeit des Enzyms und dessen Funktion.

4.2.3 Analyse extrazellulärer Enzymaktivitäten sowie die potenzielle Biosynthese der Indol- und Isocumarin-Derivate

Nach der Kultivierung des Ascomyceten *Coniolarrella hispanica* in Magnesium-Lignosulfonat konnten ein Indolderivat, Methylindol-3-Carboxylat, sowie zwei Isocumarin-Derivate, 8,9-Dehydroxylaron und 5-Carboxymellein, isoliert werden. Alle drei Isolate haben keinen lignolytischen Ursprung, sondern sind Sekundärmetabolite des Pilzes. Dennoch konnte auch im Rahmen dieser Arbeit anhand des qualitativen Enzym-Assays eine Laccase-Aktivität sowie die Oxidation phenolischer Substanzen beobachtet werden (3.3.3.1, Abb. 46). Während des 14-tägigen Fermentationsverlaufs, wobei Methylindol-3-Carboxylat isoliert werden konnte, wurde ebenfalls Laccase-Aktivität detektiert (3.3.3, Abb. 45). Bis Tag 8 stieg die Laccase-Aktivität parallel zur Substanzmenge an, wobei dann mit Erreichen der höchsten Laccase-Aktivität die Substanzmenge auf ein Minimum abfiel, um zwei Tage später ein Maximum zu erreichen.

Die Tatsache, dass mit Erreichen der maximalen Enzymaktivität nahezu keine Substanz detektierbar und diese bereits nach 24 h nachweisbar und parallel dazu keine Laccase-Aktivität vorhanden war, verdeutlicht, dass bei der Synthese des Methylindol-3-Carboxylats keine Laccase beteiligt ist. Dennoch beweist sich die Laccase-Aktivität im Abbau des Magnesium-Lignosulfonats, was anhand der HPLC-Analyse zu sehen ist (3.3.1, Abb. 34; 6.2.5 Abb. 94).

Methylindol-3-Carboxylat wurde bereits als Sekundärmetabolit eines marinen Bakteriums sowie für den Basidiomyceten *Antrodia albocinnamomea* und für den Endophyten *Penicillium* sp. HJT-A-6 beschrieben (Hu *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2024; Chen und Wang, 2015). Bei *C. hispanica* handelt es sich ebenfalls um einen Endophyten (Checa *et al.*, 2008), was zusammen mit den oben genannten Beobachtungen die Vermutung stärkt, dass es sich bei Methylindol-3-Carboxylat um einen Sekundärmetaboliten von *C. hispanica* handelt. Da bisher keine Literatur für *C. hispanica* dazu veröffentlicht wurde und auch im Rahmen dieser Arbeit aufgrund des späten Ergebnisses der NMR-Analyse keine weiteren Experimente durchgeführt werden konnten, kann ein möglicher Biosyntheseweg nur anhand von Literaturrecherchen hypothetisiert werden. Wie bereits in 4.1.3 beschrieben, ist Indol-3-Carbonsäure eine mögliche Vorstufe von Methylindol-3-Carboxylat, womit zunächst zu überprüfen wäre, ob auch diese Substanz möglicherweise während des Fermentations-Monitorings per HPLC-MS-Analyse nachweisbar ist und somit ebenfalls von *C. hispanica* produziert wird. Das Indol-3-Carbonsäure von Pilzen produziert werden kann, konnten 2014 Qian *et al.* anhand des Endophyten *Lasiodiplodia* sp. ME4-2 beweisen. Im Rahmen ihrer durchgeführten Experimente konnten sie zeigen, dass während der Kultivierung in Czapek's Medium sowohl Indol-3-Carbonsäure als auch Indol-3-Carbaldehyd von *Lasiodiplodia* sp. ME4-2 produziert wurde. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass Indol-3-Carbonsäure auch für *C. hispanica* nachgewiesen werden kann. Sollte dies gelingen, könnte im Anschluss überprüft werden, wie in 4.1.3 beschrieben, ob die Methylierung von Indol-3-Carbonsäure zu Methylindol-3-Carboxylat über eine Methyltransferase katalysiert wird (Abb. 77).

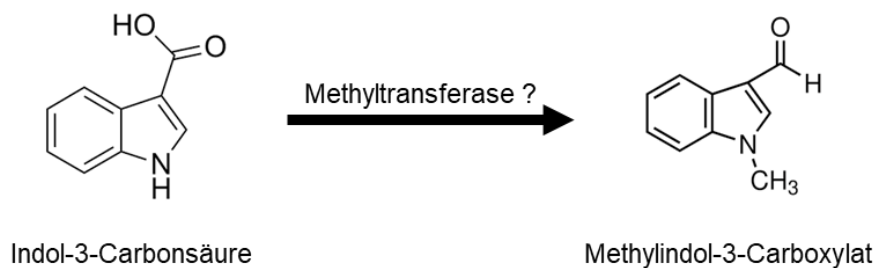


Abbildung 77: Potenziell letzter Schritt der Biosynthese von Methylindol-3-Carboxylat.

Da die Biosynthese sowohl von Indol-3-Carbonsäure als auch von Methylindol-3-Carboxylat für Pilze bisher nicht aufgeklärt wurde, gilt es weiterhin zu überprüfen, ob die Biosynthese dieser Metaboliten ausgehend von L-Tryptophan startet, sowie es für viele Indole beschrieben ist und beispielsweise auch für die Synthese von Indol-3-Essigsäure anhand von *Candida tropicalis* gezeigt wurde (Miyagi *et al.*, 2020). Um dies zu überprüfen könnte zunächst ein Supplementierungsversuch mit Isotop-markiertem L-Tryptophan durchgeführt werden. Kann die Markierung später im von *C. hispanica* produzierten Methylindol-3-Carboxylat nachgewiesen werden, startet die Synthese ausgehend von L-Tryptophan, ist es nicht nachweisbar, ist das Startermolekül ein anderes. Ausgehend von welchem Startermolekül die Synthese von Methylindol-3-Carboxylat beginnt, sind unterschiedliche Enzyme an der Biosynthese beteiligt. Daher wäre außerdem von Vorteil eine Genomanalyse durchzuführen und anhand eines Homologievergleichs mit Pilzen, wie z.B. *Antrodiella albocinnamomea* oder *Penicillium* sp. HJT-A-6, die ebenfalls Methylindol-3-Carboxylat produzieren, möglicherweise ähnliche Gencluster oder Genen zu detektieren, welche die für die Biosynthese von Methylindol-3-Carboxylat notwendigen Enzyme kodieren. Anschließend könnte durch gezielte Geninaktivierungsversuche gezeigt werden, ob die Gene und die, dadurch exprimierten Enzyme tatsächlich an der Biosynthese beteiligt sind. Ist dies der Fall, sollte nach Kultivierung der Transformante kein Methylindol-3-Carboxylat per HPLC-Analyse nachweisbar sein.

Das Isocumarin-Derivat 8,9-Dehydroxylaron, welches ebenfalls, nach der Kultivierung in Magnesium-Lignosulfonat, aus dem Kulturfiltrat isoliert werden konnte, gehört zu den α -Pyronen und wurde 2007 erstmals als Sekundärmetabolit von *Xylaria hypoxylon* beschrieben (Schöffler *et al.*, 2007). α -Pyrone haben keinen lignolytischen Ursprung, sodass die, anhand des qualitativen Enzym-Assays, detektierte Laccase-Aktivität nicht an der Synthese von 8,9-Dehydroxylaron beteiligt sein wird. Vielmehr ist davon auszugehen, sowie es auch 2016 Schäberle in seiner Arbeit über α -Pyrone zeigen konnte, dass die Biosynthese von 8,9-Dehydroxylaron über den Polyketidweg erfolgt, wie es für die meisten mikrobiellen α -Pyrone beschrieben ist. Die Polyketidbiosynthese ähnelt der Fettsäurebiosynthese, denn beide basieren auf wiederholenden Claisen-Kondensationen von Acetyl-Coenzym A und Malonyl-Coenzym A, wobei verschiedene Enzyme, wie z.B. Ketosynthasen und Acyltransferasen sowie ein Acyl-Carrier-Protein beteiligt sind. Während bei der Fettsäurebiosynthese eine vollständige Reduktion stattfindet, verbleibt bei der Polyketidsynthese ein ungesättigter PKS-Kettenrest, welcher für die Entstehung der Pyronringe Voraussetzung ist (Schäberle, 2016). Nachfolgend werden drei PKS-Systeme beschrieben, anhand derer die Biosynthese von α -Pyronen erfolgen kann. Beim modularen PKS-System beginnt die Synthese der α -Pyrone mit der Zimtsäure als Startermolekül und erfolgt insgesamt über mehrere Claisen-Kondensationen mit Malonyl-Einheiten. Die reduktiven Domänen katalysieren dann die Umwandlung der Ketogruppen in Hydroxygruppen und cis-Doppelbindungen.

Die abschließende Bildung des Lactonrings wird dann durch die Thioesterase-Domäne katalysiert (Bouhired *et al.*, 2014). Beim PKSII-System werden die Starter- und Malonyl-Einheiten an ein und demselben Acylträgerprotein verbunden und durch die anschließende Lactonisierung des Acylträgerprotein-gebundenen Endes entsteht der Pyronring. Im Vergleich zu den bisherigen Systemen besteht das PKSIII-System nur aus einer einzigen Ketosynthase, welche die Startermoleküle mit den Verlängerungseinheiten verknüpft. Der Pyronring entsteht hier ebenfalls durch die abschließende Lactonisierung der Polyketidkette (Nakano *et al.*, 2009; Schäberle, 2016).

8,9-Dehydroxylaron ist ein monozyklisches α -Pyron und gleicht strukturell dem 6-Pentyl- α -Pyron (Abb. 78), welches von verschiedenen *Trichoderma*-Arten produziert wird und zudem aktiv gegenüber Phytopathogenen, wie z.B. *Rhizoctonia solani* und *Fusarium oxysporum* ist (Scarselletti und Faull, 1994). 2025 konnten Flatschacher *et al.* anhand von *Trichoderma atroviride* zeigen, dass 6-Pentyl- α -Pyron über den Polyketidbiosyntheseweg synthetisiert wird und dabei eine PKS1 beteiligt ist. Sie konnten außerdem das Gen *pks1*, welches für die iterative Polyketidsynthase Typ I kodiert, identifizieren und dieses einem konservierten Biosynthese-Gencluster zuordnen.

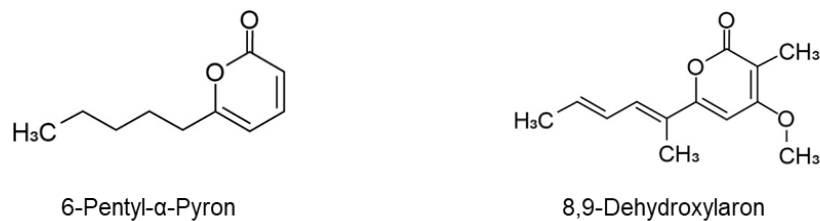


Abbildung 78: Chemische Struktur von 6-Pentyl- α -Pyron und 8,9-Dehydroxylaron im Vergleich.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von 8,9-Dehydroxylaron und 6-Pentyl- α -Pyron (Abb. 78) könnte zunächst eine Genomanalyse für *Coniolaria hispanica* durchgeführt werden, gefolgt von einem Homologieabgleich, um ein potenzielles Gencluster bzw. PKS1-kodierendes Gen zu identifizieren. Sollte dies erfolgreich sein, könnte über gezielte Geninaktivierungen überprüft werden, ob das identifizierte Gen bzw. Gencluster tatsächlich an der Biosynthese von 8,9-Dehydroxylaron beteiligt ist. Des Weiteren könnte das identifizierte Gen bzw. Gencluster auch heterolog in einen leicht-transformierbaren Organismus kloniert werden und nach erfolgreicher Transformation die Produktion des Sekundärmetaboliten 8,9-Dehydroxylaron mittels HPLC analysiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre außerdem die Zufütterung von Isotop-markierten potenziellen Vorstufen wie z.B. Acetat oder Malonat, welche bereits als Bestandteile von α -Pyronen nachgewiesen wurden (Schäberle, 2016) und somit zur Aufklärung des Biosynthesewegs beitragen könnten.

5-Carboxymellein ist das zweite Isocumarin-Derivat, welches im Rahmen dieser Arbeit nach der Kultivierung von *Coniolarrella hispanica* isoliert werden konnte. Auch hierbei handelt es sich um einen Sekundärmetaboliten, welcher unabhängig von der detektierten Laccase-Aktivität synthetisiert wurde. 5-Carboxymellein gehört zu den Melleinen, welche zu den 3,4-Dihydroisocumarinen gehören, die der Klasse der Polyketide angehören. Schon 1933 wurde Mellein, was damals noch als Ocracin bezeichnet wurde, aus *Aspergillus melleus* isoliert (Nishikawa, 1933). Mittlerweile weiß man, dass Pilze die größten Mellein-Produzenten sind und diese über viele verschiedene Bioaktivitäten verfügen (Reveglia *et al.*, 2020). 1986 konnte 5-Carboxymellein erstmals aus *Valsa ceratosperma*, isoliert und seine phytopathogenen Eigenschaften näher charakterisiert werden (Okuno *et al.*, 1986). Bereits 1979 konnten Huff und Hamilton zeigen, dass Mellein ausgehend von Acetyl- und Malonyl-CoA über den Polyketidweg synthetisiert wird. Zunächst entsteht ein Pentaketid welches nachfolgend über verschiedene Reaktionen weiter modifiziert werden kann. So können über eine Kettenverlängerung Heptaketide entstehen, die dann durch Post-PKS-Modifikationen in strukturell komplexere Isocumarine und 3,4-Dihydroisocumarinen umgewandelt werden können. Alternativ können auch Zyklisierungsreaktionen stattfinden, die den typischen Lactonring erzeugen, welcher auch in 5-Carboxymellein (Abb. 79) vorhanden ist. Anschließende Hydratisierungen sowie Aromatisierungen sind ebenfalls möglich und führen unter anderem zu dem Endprodukt Mellein (Dewick, 2002; Noor *et al.*, 2020; Reveglia *et al.*, 2020).



Abbildung 79: Chemische Struktur von Mellein und 5-Carboxymellein im Vergleich.

Wie genau die Synthese von 5-Carboxymellein abläuft ist noch nicht gänzlich geklärt, dennoch ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Mellein (Abb. 79) davon auszugehen, dass auch diese Synthese ausgehend von Acetyl- und Malonyl-CoA startet und das daraus entstehende Pentaketid zunächst zu einem 3,4-Dihydroisocumarin umgewandelt wird, so wie es auch für Mellein beschrieben wird (Huff und Hamilton, 1979). 3,4-Dihydroisocumarin könnte dann weiter modifiziert werden, sodass 5-Carboxymellein entsteht.

Zur Überprüfung dessen, könnte zunächst anhand der Supplementierung von Isotop-markiertem Acetat überprüft werden, ob, die Synthese ausgehend davon startet und über den Polyketidweg abläuft. Des Weiteren sollte das Genom von *C. hispanica* auf mögliche PKS-Gencluster bzw. Gene hin untersucht werden und diese zur Überprüfung der Beteiligung an der Synthese, heterolog in einen anderen Organismus kloniert werden. Parallel dazu könnte das potenzielle Gen auch in *C. hispanica* selbst inaktiviert werden. Ist dies erfolgreich sollte die Transformate kein 5-Carboxymellein mehr produzieren, was anhand einer HPLC-Analyse des Kulturfiltrates nach Kultivierung in Magnesium-Lignosulfonat überprüft werden könnte.

4.2.4 Analyse extrazellulärer Enzymaktivitäten sowie der potenziellen Biosynthese von Anisaldehyd

Während der Kultivierung der zwei Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus pulmonarius* in Magnesium-Lignosulfonat und Kraftlignin konnte neben den Harzsäure-Derivaten, 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1) und 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2), auch Anisaldehyd (A1) detektiert werden. Im Vergleich der qualitativen Enzym-Tests beider Pilze fällt auf (3.5.3.1, Abb. 63; 3.6.3.1 Abb. 69), dass diese über die gleichen Enzymaktivitäten verfügen. Für beide Organismen konnte die Oxidation phenolischer Substanzen sowie anhand der Verfärbung der LBM-ABTS-Platte eine Laccase-Aktivität nachgewiesen werden. Gestärkt wird dies zusätzlich mit dem positiven Nachweis durch die Gelbfärbung der LBM-Poly R-Platte, welche Polyphenoloxidasen sowie Lignin- und Manganperoxidasen detektiert. Dass sowohl *P. ostreatus* als auch *P. pulmonarius* Lignin-modifizierende Enzyme produzieren und Lignin abbauen können ist bekannt. Sowohl für *P. ostreatus* als auch für *P. pulmonarius* konnten bereits Laccasen, Manganperoxidasen, versatile Peroxidasen sowie Arylalkoholoxidasen während des Ligninabbaus nachgewiesen werden (Cohen *et al.*, 2002b; Camarero *et al.*, 1996; Gutiérrez *et al.*, 1994; Marques De Souza und Peralta, 2003). Dies zeigt sich auch im Abbau der Ligninbestandteile, welche nach der 14-tägigen Fermentation dieser Pilzstämmen anhand der HPLC-Analyse detektiert werden konnte (3.5.1, Abb. 56; 3.5.2, Abb. 58; 3.6.1, Abb. 64; 3.6.2, Abb.67).

Das *P. pulmonarius* und *P. ostreatus* Anisaldehyd auch unabhängig von ligninhaltigen Medien produzieren, zeigten 1994 Gutiérrez *et al.* in ihren Studien. Sie konnten für mehrere *Pleurotus* Stämme die Produktion verschiedene Anisyl- und Hydroxybenzylverbindungen nachweisen. 2002 konnten Okamoto *et al.* außerdem die Biosynthese von Anisaldehyd in *Pleurotus ostreatus* teilweise aufklären, wobei sie sich auf die Lignin-degradierenden Enzyme fokussierten. Sie stellten fest, dass eine Arylalkoholoxidase an der Biosynthese beteiligt ist und postulierten, dass das durch die Arylalkoholoxidase produzierte H₂O₂ von der Manganperoxidase anschließend bei der Lignindegradation genutzt wird. Eine Ligninperoxidase konnte nicht detektiert werden. Anhand eines Supplementierungsversuchs mit verschiedenen Aminosäuren konnten sie außerdem zeigen, dass die Synthese von Anisaldehyd ausgehend von L-Tyrosin startet. L-Tyrosin wird zunächst über mehrere Schritte in 4-Methoxybenzylalkohol umgewandelt, welches dann durch die Arylalkoholoxidase zu Anisaldehyd oxidiert wird (Abb. 80). Das L-Tyrosin das Startermolekül der Biosynthese von Anisaldehyd ist, konnten auch Bürger *et al.* 2022 anhand von *Pleurotus sapidus* nachweisen.

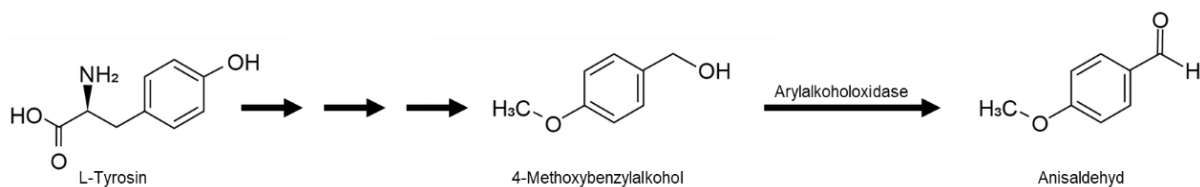


Abbildung 80: Potenzieller Biosyntheseweg von Anisaldehyd.

Da *P. pulmonarius* und *P. ostreatus* eng verwandt sind (Bao *et al.*, 2005), ist davon auszugehen, dass die Biosynthese von Anisaldehyd bei *P. pulmonarius* ähnlich abläuft. Bereits 1994 konnten Gutiérrez *et al.* beweisen, dass *P. pulmonarius* ebenfalls eine Arylalkoholoxidase produziert, wodurch angenommen werden kann, dass zumindest der letzte Schritt vom 4-Methylbenzylalkohol zum Anisaldehyd identisch ist. Dennoch muss für beide Pilze weiterhin aufgeklärt werden, wie die Synthese vom L-Tyrosin bis zum 4-Methoxybenzylalkohol abläuft. Für *Pleurotus sapidus* konnte 2024 eine O-Methyltransferase (OMT) identifiziert werden, die sehr wahrscheinlich an der Synthese von Anisaldehyd beteiligt ist, indem diese Hydroxyaromaten, wie beispielsweise 4-Hydroxybenzylalkohol, methyliert (Brescia *et al.*, 2024). Dies ist jedoch nur ein erster Schritt zur Aufklärung des Biosynthesewegs und muss für *P. ostreatus* und *P. pulmonarius* erst noch nachgewiesen werden. Dies könnte anhand einer RNA-Sequenzierung erfolgen, indem die transkribierten Gene der zwei Pilzstämme sequenziert und auf das Vorhandensein einer OMT hin untersucht werden. Potenzielle OMT-Gene könnten dann bioinformatisch und funktionell weiter charakterisiert werden. Anhand eines Supplementierungsversuchs mit Isotop-markierten potenziellen Vorstufen, wie z.B. 4-Hydroxybenzylalkohol, könnte z.B. eine potenzielle Vorstufe sowie die Beteiligung des Enzyms OMT nachgewiesen werden.

Gestärkt werden könnte dies weiterhin durch die heterologe Expression des detektierten OMT-codierenden Gens oder aber auch durch eine Geninaktivierung in *P. ostreatus* und *P. pulmonarius* selbst. Auch könnte eine RNA-Sequenzierung zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung erfolgen, um noch weitere stark exprimierte Gencluster bzw. Gene zu detektieren und diese auf eine mögliche Beteiligung innerhalb des Biosynthesewegs zu analysieren. Parallel dazu könnte der Kultivierungsansatz auch mittels HPLC- und GC-MS analysiert werden, um weitere Vorstufen zu detektieren, was ebenfalls Rückschlüsse auf potenzielle Enzyme zulässt. Durch gezielte Ansätze könnte somit die Biosynthese von Anisaldehyd in *P. ostreatus* und *P. pulmonarius* zukünftig vollständig aufgeklärt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Acharya, K.; Sikder, R.; Dutta, A. K. (2017):** Physiochemical characterization and antioxidant activity of methanol extract from an edible mushroom *Agrocybe pediades*. *International journal of ChemTech Research* 10 (3), S. 204 – 211.
- Ahmed, Sarah A.; Khan, Ziauddin; Wang, Xue-wei; Moussa, Tarek A. A.; Al-Zahrani, Hassan S.; Almaghrabi, Omar A. et al. (2016):** *Chaetomium*-like fungi causing opportunistic infections in humans: a possible role for extremotolerance. *Fungal Diversity* 76 (1), S. 11 – 26.
- Anderson, John R.; Edwards, Raymond L.; Whalley, Anthony J. S. (1983):** Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-Methyl-3,4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family *xylariaceae*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, S. 2185.
- Arantes, Valdeir; Milagres, Adriane M. F.; Filley, Timothy R.; Goodell, Barry (2011):** Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38 (4), S. 541 – 555.
- Archer, D. B.; Peberdy, J. F. (1997):** The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Critical reviews in biotechnology* 17 (4), S. 273 – 306.
- Armarego, Wilfried L. F. (2017):** Purification of chemicals. *Butterworth-Heinemann*.
- Aro, Thomas; Fatehi, Pedram (2017):** Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. *ChemSusChem* 10 (9), S. 1861 – 1877.
- Arora, D. S.; Gill, P. K. (2001):** Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 28 (7-8), S. 602 – 605.
- Asada, Y.; Watanabe, A.; Irie, T.; Nakayama, T.; Kuwahara, M. (1995):** Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochimica et biophysica acta* 1251 (2), S. 205 – 209.
- Aza, Pablo; Molpeceres, Gonzalo; Ruiz-Dueñas, Francisco Javier; Camarero, Susana (2021):** Heterologous Expression, Engineering and Characterization of a Novel Laccase of *Agrocybe pediades* with Promising Properties as Biocatalyst. *Journal of fungi* 7 (5).
- Bahadur, B.; Rajam, M. V.; Sahijram, L.; Krishnamurthy, K. V. (Hg.) (2015):** Plant Biology and Biotechnology. Plant Diversity, Organization, Function and Improvement: *Springer*.
- Bajwa, D. S.; Pourhashem, G.; Ullah, A. H.; Bajwa, S. G. (2019):** A concise review of current lignin production, applications, products and their environmental impact. *Industrial Crops and Products* 139.
- Bao, Dapeng; Aimi, Tadanori; Kitamoto, Yutaka (2005):** Cladistic relationships among the *Pleurotus ostreatus* complex, the *Pleurotus pulmonarius* complex, and *Pleurotus eryngii* based on the mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequence analysis. *J Wood Sci* 51 (1), S. 77 – 82.
- Berlin, Alex; Balakshin, Mikhail (2014):** Industrial Lignins. *Bioenergy Research: Advances and Applications*: Elsevier, S. 315 – 336.
- Bertella, Stefania; Luterbacher, Jeremy S. (2020):** Lignin Functionalization for the Production of Novel Materials. *Trends in Chemistry* 2 (5), S. 440 – 453.

- Bhat, Zubair Shanib; Rather, Muzafar Ahmad; Maqbool, Mubashir; Lah, Hafiz Ul; Yousuf, Syed Khalid; Ahmad, Zahoor (2017):** α -pyrones: Small molecules with versatile structural diversity reflected in multiple pharmacological activities-an update. *Biomedicine & pharmacotherapy* 91, S. 265 – 277.
- Boudet, A. M.; Lapiere, C.; Grima-Pettenati, J. (1995):** Biochemistry and molecular biology of lignification. *The New phytologist* 129 (2), S. 203 – 236.
- Bouhired, Sarah M.; Crüsemann, Max; Almeida, Celso; Weber, Tilmann; Piel, Jörn; Schäberle, Till F.; König, Gabriele M. (2014):** Biosynthesis of phenylannolone A, a multidrug resistance reversal agent from the halotolerant myxobacterium *Nannocystis pusilla* B150. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 15 (5), S. 757 – 765.
- Braga, A.; Faria, N. (2022):** Biotechnological production of specialty aromatic and aromatic-derivative compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 38 (5), S. 80.
- Brebu, Mihai; Vasile, Cornelia (2010):** Thermal degradation of lignin - a review. *Cellulose Chemistry & Technology* 44 (9), S. 353.
- Brescia, Fabio Francesco; Korf, Lukas; Essen, Lars-Oliver; Zorn, Holger; Ruehl, Martin (2024):** A Novel O- and S-Methyltransferase from *Pleurotus sapidus* Is Involved in Flavor Formation. *Journal of agricultural and food chemistry* 72 (12), S. 6471 – 6480.
- Brunvoll, Jon; Bohn, Robert K.; Hargittai, Istvan (1985):** Molecular structure of p-anisaldehyde from electron diffraction. *Journal of Molecular Structure* 129 (1-2), S. 81 – 91.
- Bugg, Timothy D. H.; Ahmad, Mark; Hardiman, Elizabeth M.; Rahmanpour, Rahman (2011):** Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural product reports* 28 (12), S. 1883 – 1896.
- Bundesamt für Umwelt (2019):** Nichts geht verloren. Wie Kreislaufwirtschaft für Umwelt und Unternehmen gut sein kann. *die umwelt - Natürliche Ressourcen in der Schweiz* (4).
- Bürger, Friederike; Koch, Maximilian; Fraatz, Marco A.; Omarini, Alejandra B.; Berger, Ralf G.; Zorn, Holger (2022):** Production of an Anise- and Woodruff-like Aroma by Monokaryotic Strains of *Pleurotus sapidus* Grown on Citrus Side Streams. *Molecules* 27 (3).
- Calça, Francisco J. Simões; Cortez, Vagner Gularte; Xavier-Santos, Solange (2020):** Dung fungi from Brazil: *Agrocybe pediades* (Fr.) Fayod (*Basidiomycota*) in Cerrado. *Sci. Plena* 16 (6).
- Call, H. P. (1994):** Process for modifying, breaking down or bleaching lignin, materials containing lignin or like substances. *World patent application* (094/29510).
- Calvo-Flores, Francisco García; Dobado, José A. (2010):** Lignin as renewable raw material. *ChemSusChem* 3 (11), S. 1227 – 1235.
- Camarero, S.; Bockle, B.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (1996):** Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and environmental microbiology* 62 (3), S. 1070 – 1072.
- Camarero, S.; Sarkar, S.; Ruiz-Dueñas, F. J.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. (1999):** Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *The Journal of biological chemistry* 274 (15), S. 10324 – 10330.

- Camarero, Susana; García, Olga; Vidal, Teresa; Colom, José; Del Río, José C.; Gutiérrez, Ana et al. (2004):** Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology* 35 (2-3), S. 113 – 120.
- Chakar, Fadi S.; Ragauskas, Arthur J. (2004):** Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products* 20 (2), S. 131 – 141.
- Che, Jinxin; Chen, Xiumei; Ouyang, Qiuli; Tao, Nengguo (2019):** p-Anisaldehyde Exerts Its Antifungal Activity Against *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by Disrupting the Cell Wall Integrity and Membrane Permeability. *Journal of microbiology and biotechnology* 30 (6), S. 878 – 884.
- Checa, Julia; Arenal, Francisco; Blanco, Natividad; Rogers, Jack D. (2008):** *Coniolaria hispanica* sp. nov. and other additions to *Coniolaria*. *Mycological Research* 112 (7), S. 795 – 801.
- Chefetz, Benny; Chen, Yona; Hadar, Yitzhak (1998):** Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Applied and environmental microbiology* 64 (9), S. 3175 – 3179.
- Chen, Zi-Ming; Wang, Shun-Lin (2015):** Two new compounds from cultures of the basidiomycete *Antrodia albocinnamomea*. *Natural product research* 29 (21), S. 1985 – 1989.
- Chi, Myoung-Hwan; Park, Sook-Young; Lee, Yong-Hwan (2009):** A Quick and Safe Method for Fungal DNA Extraction. *The Plant Pathology Journal* 25 (1), S. 108 – 111.
- Choudhary, Muhammad Iqbal; Atif, Muhammad; Shah, Syed Adnan Ali; Sultan, Sadia; Erum, Saira (2014):** Biotransformation of dehydroabiatic acid with microbial cell cultures and α -glucosidase inhibitory activity of resulting metabolites. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 (7), S. 375 – 378.
- Christensen, G. D.; Simpson, W. A.; Younger, J. J.; Baddour, L. M.; Barrett, F. F.; Melton, D. M.; Beachey, E. H. (1985):** Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *Journal of clinical microbiology* 22 (6), S. 996 – 1006.
- Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. (2002a):** Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied microbiology and biotechnology* 58 (5), S. 582 – 594.
- Cohen, Roni; Persky, Limor; Hazan-Eitan, Zahit; Yarden, Oded; Hadar, Yitzhak (2002b):** Mn²⁺ alters peroxidase profiles and lignin degradation by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* under different nutritional and growth conditions. *Applied biochemistry and biotechnology* 102-103 (1-6), S. 415 – 429.
- Costa, Stefania; Dedola, Davide; Pellizzari, Simone; Blo, Riccardo; Rugiero, Irene; Pedrini, Paola; Tamburini, Elena (2017):** Lignin Biodegradation in Pulp-and-Paper Mill Wastewater by Selected White Rot Fungi. *Water* 9 (12), S. 935.
- Dang, Ha X.; Pryor, Barry; Peever, Tobin; Lawrence, Christopher B. (2015):** The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. *BMC genomics* 16 (1), S. 239.
- D'Arrigo, Paola; Rossato, Letizia A. M.; Strini, Alberto; Serra, Stefano (2024):** From Waste to Value: Recent Insights into Producing Vanillin from Lignin. *Molecules* 29 (2).
- Datta, Rahul; Kelkar, Aditi; Baraniya, Divyashri; Molaei, Ali; Moulick, Amitava; Meena, Ram; Formanek, Pavel (2017):** Enzymatic Degradation of Lignin in Soil: A Review. *Sustainability* 9 (7), S. 1163.

- Dethlefs, F.; Stan, H. J. (1996):** Determination of resin acids in pulp mill EOP bleaching process effluent. *Analytical and bioanalytical chemistry* 356 (6), S. 403 – 410.
- Dewick, Paul M. (2002):** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. *John Wiley & Sons*.
- Doherty, William O.S.; Mousavioun, Payam; Fellows, Christopher M. (2011):** Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial Crops and Products* 33 (2), S. 259 – 276.
- Dorado, J.; Claassen, F. W.; van Beek, T. A.; Lenon, G.; Wijnberg, J. B.; Sierra-Alvarez, R. (2000):** Elimination and detoxification of softwood extractives by white-rot fungi. *Journal of Biotechnology* 80 (3), S. 231 – 240.
- dos Santos Bazanella, Gisele Cristina; Souza, Daniela Farani de; Castoldi, Rafael; Oliveira, Roselene Ferreira; Bracht, Adelar; Peralta, Rosane Marina (2013):** Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. *Folia microbiologica* 58 (6), S. 641 – 647.
- Durairaj, Pradeepraj; Hur, Jae-Seoun; Yun, Hyungdon (2016):** Versatile biocatalysis of fungal cytochrome P450 monooxygenases. *Microbial cell factories* 15 (1), S. 125.
- Eggert, Claudia; Temp, Ulrike; Eriksson, Karl-Erik L. (1995):** The Ligninolytic System of the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and Characterization of the Laccase Characterization of the Laccase. *Applied and environmental microbiology* 62 (4), S. 1151 – 1158.
- El-Gendi, Hamada; Saleh, Ahmed K.; Badierah, Raied; Redwan, Elrashdy M.; El-Maradny, Yousra A.; El-Fakharany, Esmail M. (2021):** A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. *Journal of fungi* 8 (1).
- Eraghi Kazzaz, Armin; Fatehi, Pedram (2020):** Technical lignin and its potential modification routes: A mini-review. *Industrial Crops and Products* 154.
- Erfani Jazi, Mehdi; Narayanan, Ganesh; Aghabozorgi, Fatemeh; Farajidizaji, Behzad; Aghaei, Ali; Kamyabi, Mohammad Ali et al. (2019):** Structure, chemistry and physicochemistry of lignin for material functionalization. *SN Appl. Sci.* 1 (9), S. 151.
- Eriksson, Therese; Gudla, Harish; Manabe, Yumehiro; Yoneda, Tomoki; Friesen, Daniel; Zhang, Chao et al. (2022):** Carbonyl-Containing Solid Polymer Electrolyte Host Materials: Conduction and Coordination in Polyketone, Polyester, and Polycarbonate Systems. *Macromolecules* 55 (24), S. 10940 – 10949.
- Eshboev, Farkhod; Gao, Alex X.; Abdurashidov, Akhror; Mardieva, Kamila; Baymirzaev, Asadali; Musakhanov, Mirzatimur et al. (2025):** Genomic and Metabolomic Analysis of the Endophytic Fungus *Alternaria alstroemeriae* S6 Isolated from *Veronica acinifolia*: Identification of Anti-Bacterial Properties and Production of Succinic Acid. *Antibiotics* 14 (7).
- Evstigneyev, Edward I.; Shevchenko, Sergey M. (2020):** Lignin valorization and cleavage of arylether bonds in chemical processing of wood: a mini-review. *Wood Sci Technol* 54 (4), S. 787 – 820.
- Faix, O. (1991):** Classification of Lignins from Different Botanical Origins by FT-IR Spectroscopy. *Holzforschung* 45 (s1), S. 21 – 28.
- Fang, Xianhe; Hu, Xiangdong (2018):** Advances in the Synthesis of Lignan Natural Products. *Molecules* 23 (12).
- Fayod, V. (1889):** Prodrome d'une histoire naturelle des *Agaricinés*. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique* 7e (9), S. 181 – 411.

- Ferrari, Roselyne; Gautier, Valérie; Silar, Philippe (2021):** Lignin degradation by *ascomyces*. In: Wood Degradation and Ligninolytic Fungi, Bd. 99, S. 77 – 113.
- Fetting, C. (2020):** "The European Green Deal". *ESDN Report*.
- Flatschacher, Daniel; Eschlböck, Alexander; Pierson, Siebe; Schreiner, Ulrike; Stock, Valentina; Schiller, Arne et al. (2025):** Linking a polyketide synthase gene cluster to 6-pentyl-alpha-pyrone, a *Trichoderma* metabolite with diverse bioactivities. *Microbial cell factories* 24 (1), S. 89.
- Funaoka, M.; Matsubara, M.; Seki, N.; Fukatsu, S. (1995):** Conversion of native lignin to a highly phenolic functional polymer and its separation from lignocellulosics. *Biotechnology and bioengineering* 46 (6), S. 545 – 552.
- Gan, Mei Jiao; Niu, Yu Qin; Qu, Xue Jing; Zhou, Chun Hui (2022):** Lignin to value-added chemicals and advanced materials: extraction, degradation, and functionalization. *Green Chem.* 24 (20), S. 7705 – 7750.
- Gao, Huiju; Chu, Xiang; Wang, Yanwen; Zhou, Fei; Zhao, Kai; Mu, Zhimei; Liu, Qingxin (2013):** Media optimization for laccase production by *Trichoderma harzianum* ZF-2 using response surface methodology. *Journal of microbiology and biotechnology* 23 (12), S. 1757 – 1764.
- Gillet, S.; Aguedo, M.; Petitjean, L.; Morais, A. R. C.; Da Costa Lopes, A. M.; Łukasik, R. M.; Anastas, P. T. (2017):** Lignin transformations for high value applications: towards targeted modifications using green chemistry. *Green Chem.* 19 (18), S. 4200 – 4233.
- González-González, Paulina; Gómez-Manzo, Saúl; Tomasini, Araceli; Martínez Y Pérez, José Luis; García Nieto, Edelmira; Anaya-Hernández, Arely et al. (2023):** Laccase Production from *Agrocybe pediades*: Purification and Functional Characterization of a Consistent Laccase Isoenzyme in Liquid Culture. *Microorganisms* 11 (3).
- Gosselink, R.J.A.; Jong, E. de; Guran, B.; Abächerli, A. (2004):** Co-ordination network for lignin - standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN). *Industrial Crops and Products* 20 (2), S. 121 – 129.
- Greif, Matthew D.; Currah, Randolph S. (2007):** Development and dehiscence of the cephalothecoid peridium in *Aporothielavia leptoderma* shows it belongs in *Chaetomidium*. *Mycological Research* 111 (Pt 1), S. 70 – 77.
- Greif, Matthew D.; Stchigel, Alberto M.; Miller, Andrew N.; Huhndorf, Sabine M. (2009):** A re-evaluation of genus *Chaetomidium* based on molecular and morphological characters. *Mycologia* 101 (4), S. 554 – 564.
- Gutiérrez, A.; Caramelo, L.; Prieto, A.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. (1994):** Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Applied and environmental microbiology* 60 (6), S. 1783 – 1788.
- Hadar, Yitzhak; Kerem, Zohar; Gorodecki, Barbara (1993):** Biodegradation of lignocellulosic agricultural wastes by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biotechnology* (30), S. 133 – 139.
- Haile, Adane; Gelebo, Gemeda Gebino; Tesfaye, Tamrat; Mengie, Wassie; Mebrate, Million Ayele; Abuhay, Amare; Limeneh, Derseh Yilie (2021):** Pulp and paper mill wastes: utilizations and prospects for high value-added biomaterials. *Bioresources and bioprocessing* 8 (1), S. 35.
- Hammel, Kenneth E. (1997):** Fungal degradation of lignin. Driven by Nature: Plant Litter Quality and Decomposition. *CAB International* (45).

- Hammel, Kenneth E.; Cullen, Dan (2008):** Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current opinion in plant biology* 11 (3), S. 349 – 355.
- Hammel, Kenneth E.; Kapich, Alexander N.; Jensen, Kenneth A.; Ryan, Zachary C. (2002):** Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 30 (4), S. 445 – 453.
- Hao, Meng; Xu, Jianwei; Wen, Houpeng; Du, Jiawei; Zhang, Shaoyong; Lv, Min; Xu, Hui (2022):** Recent Advances on Biological Activities and Structural Modifications of Dehydroabietic Acid. *Toxins* 14 (9).
- Hatakka, Annele; Hammel, Kenneth E. (2010):** Fungal biodegradation of lignocelluloses. *Industrial applications*, S. 319 – 340.
- Hemmati, Shiva; Seradj, Hassan (2016):** Justicidin B: A Promising Bioactive Lignan. *Molecules* 21 (7).
- Hofrichter, Martin (2002):** Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30 (4), S. 454 – 466.
- Hofrichter, Martin; Kellner, Harald; Pecyna, Marek J.; Ullrich, René (2015):** Fungal unspecific peroxygenases: heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome p450 properties. *Advances in experimental medicine and biology* 851, S. 341 – 368.
- Hofrichter, Martin; Ullrich, René (2006):** Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Applied microbiology and biotechnology* 71 (3), S. 276 – 288.
- Horta, Maria Augusta C.; Thieme, Nils; Gao, Yuqian; Burnum-Johnson, Kristin E.; Nicora, Carrie D.; Gritsenko, Marina A. et al. (2019):** Broad Substrate-Specific Phosphorylation Events Are Associated With the Initial Stage of Plant Cell Wall Recognition in *Neurospora crassa*. *Frontiers in microbiology* 10, S. 2317.
- Hu, Shen-Cai; Tan, Ren-Xiang; Hong, Kui; Yu, Zi-Niu; Zhu, Hai-Liang (2005):** Methyl indole-3-carboxylate. *Acta Crystallogr E Struct Rep Online* 61 (6), 1654 – 1656.
- Huff, William E.; Hamilton, Pat B. (1979):** Mycotoxins -Their Biosynthesis in Fungi: Mycotoxins -Their Biosynthesis in Fungi: Ochratoxins -Metabolites of Combined Pathways. *Journal of Food Protection* 42 (10), S. 815 – 820.
- IEA (2023):** World Energy Outlook 2023. *International Energy Agency*.
- Ince, Bahar; Cetecioglu, Zeynep; Ince, Orhan (2011):** Pollution Prevention in the Pulp and Paper Industries. In: Elzbieta Broniewicz (Hg.): *Environmental Management in Practice: InTech*.
- IPCC (2021):** Climate Change 2021 – The Physical Science Basis: Cambridge University Press.
- Irfan, Muhammad; Mehmood, Sajid; Irshad, Muhammad; Anwar, Zahid (2018):** Optimized production, purification and molecular characterization of fungal laccase through *Alternaria alternata*. *Turkish Journal of Biochemistry* 43 (6), S. 613 – 622.
- Isikgor, Furkan H.; Becer, C. Remzi (2015):** Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.* 6 (25), S. 4497 – 4559.
- Jacob, Stefan; Bormann, Sebastian; Becker, Michael; Antelo, Luis; Holtmann, Dirk; Thines, Eckhard (2021):** *Magnaporthe oryzae* as an expression host for the production of the unspecific peroxygenase AaeUPO from the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *MicrobiologyOpen* 10 (6), e1229.

- Jansen, Rolf; Sood, Sakshi; Mohr, Kathrin; Kunze, Brigitte; Irschik, Herbert; Stadler, Marc; Müller, Rolf (2014):** Nannozinones and Sorazinones, unprecedented Pyrazinones from *Myxobacteria*. *Journal of natural products* 26 (77), S. 2545 – 2552.
- Janusz, Grzegorz; Pawlik, Anna; Sulej, Justyna; Swiderska-Burek, Urszula; Jarosz-Wilkolazka, Anna; Paszczynski, Andrzej (2017):** Lignin degradation: microorganisms, enzymes involved, genomes analysis and evolution. *FEMS microbiology reviews* 41 (6), S. 941 – 962.
- Jensen, K. A.; Houtman, C. J.; Ryan, Z. C.; Hammel, K. E. (2001):** Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and environmental microbiology* 67 (6), S. 2705 – 2711.
- Ji, Xing-yue; Xue, Si-tu; Zhan, Yue-chen; Shen, Jia-jia; Wu, Lin-tao; Jin, Jie et al. (2014):** Design, synthesis and antiproliferative activity of a novel class of indole-2-carboxylate derivatives. *European journal of medicinal chemistry* 83, S. 409 – 418.
- Joos, F.; Sarmiento, J. L. (1995):** Der Anstieg des atmosphärischen Kohlendioxids. *Phys. Bl.* 51 (5), S. 405 – 411.
- Kaur, Randhir; Salwan, Richa; Sharma, Vivek (2022):** Structural properties, genomic distribution of laccases from *Streptomyces* and their potential applications. *Process Biochemistry* 118, S. 133 – 144.
- Kawazoe, K.; Yutani, A.; Tamemoto, K.; Yuasa, S.; Shibata, H.; Higuti, T.; Takaishi, Y. (2001):** Phenylanthralene compounds from the subterranean part of *Vitex rotundifolia* and their antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of natural products* 64 (5), S. 588 – 591.
- Khan, Mo Aqib Raza; Wang, Bo-Wei; Chen, Yih-Yu; Lin, Ting-Hsuan; Lin, Hsiu-Chin; Yang, Yu-Liang et al. (2021):** Natural polyketide 6-pentyl-2H-pyrone-2-one and its synthetic analogues efficiently prevent marine biofouling. *Biofouling* 37 (3), S. 257 – 266.
- Kirk, T. K.; Kirk, T. Kent; Higuchi, Takayoshi; Chang, Hou-min (2018):** Lignin Biodegradation: Microbiology, Chemistry, and Potential Applications: CRC Press.
- Kirk, T. Kent; Farrell, Roberta L. (1987):** Enzymatic "Combustion": The microbial degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology* (41), S. 465 – 505.
- Kohler, Annegret; Kuo, Alan; Nagy, Laszlo G.; Morin, Emmanuelle; Barry, Kerrie W.; Buscot, Francois et al. (2015):** Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature genetics* 47 (4), S. 410 – 415.
- Kumar, Parveen; Barrett, Diane M.; Delwiche, Michael J.; Stroeve, Pieter (2009):** Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (8), S. 3713 – 3729.
- Kumar, Sunil; Ritika (2020):** A brief review of the biological potential of indole derivatives. *Futur J Pharm Sci* 6 (1).
- Kun, Dávid; Pukánszky, Béla (2017):** Polymer/lignin blends: Interactions, properties, applications. *European Polymer Journal* 93, S. 618 – 641.
- Kuo, Shiao-Wei (2018):** Hydrogen bonding in polymeric materials. *John Wiley & Sons*.
- Kuo, Yueh-Hsiung; Wu, Tseng-Rong; Cheng, Ming-Chu; Wang, Yu (1990):** Five new compounds from the heartwood of *Juniperus formosana* Hayata. *Chem. Pharm. Bull.* 38 (12), S. 3195 – 3201.

- Kuo, Yueh-Hsiung; Wu, Tseng-Rong; Lin, Yau-Tan (1982):** New Lignan Detetrahydroconidendrin from *Juniperus Formosana* Hayata. *J Chinese Chemical Soc* 29 (3), S. 213 – 215.
- Kutney, J. P.; Berset, J. D.; Hewitt, G. M.; Singh, M. (1988):** Biotransformation of Dehydroabietic, Abietic, and Isopimaric Acids by *Mortierella isabellina* Immobilized in Polyurethane Foam. *Applied and environmental microbiology* 54 (4), S. 1015 – 1022.
- Kutney, James P.; Singh, M.; Hewitt, G. M.; Salisbury, Philip J.; Worth, b. R. (1981):** Studies related to biological detoxification of kraft pulp mill effluent. I. The biodegradation of dehydroabietic acid with *Mortierella isabellina*. *Canadian Journal of Chemistry* 59 (15), S. 2334 – 2341.
- Leach, J. M.; Thakore, A. N. (1973):** Identification of the Constituents of Kraft Pulping Effluent that Are Toxic to Juvenile Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Bd. Can.* 30 (4), S. 479 – 484.
- Lee, Yang Soo (2000):** Observation of Soft-Rot Wood Degradation Caused by Higher *Ascomyceteous* fungi. *Mycobiology* 28 (1), S. 47 – 50.
- Lehr, Maximilian; Miltner, Martin; Friedl, Anton (2021):** Removal of wood extractives as pulp (pre-)treatment: a technological review. *SN Appl. Sci.* 3 (12).
- Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J.; Ziegenhagen, D.; Wojtaś-Wasilewska, M.; Cho, N. S. et al. (1999):** Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology: FG & B* 27 (2-3), S. 175 – 185.
- Li, Tao; Takkellapati, Sudhakar (2018):** The current and emerging sources of technical lignins and their applications. *Biofuels, bioproducts & biorefining: Biofpr* 0, S. 1 – 32.
- Li, Yang; Ragauskas, Arthur J. (2012):** Kraft Lignin-Based Rigid Polyurethane Foam. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 32 (3), S. 210 – 224.
- Li, Zihao; Zhou, Yuanyuan; Xu, Congtao; Pan, Jinlong; Li, Haikang; Zhou, Yi; Zou, Yajie (2023):** Genome-wide analysis of the *Pleurotus eryngii* laccase gene (PeLac) family and functional identification of PeLac5. *AMB Express* 13 (1), S. 104.
- Lin, Minsheng; Yang, Linjie; Zhang, Han; Xia, Yue; He, Ying; Lan, Wu et al. (2021):** Revealing the structure-activity relationship between lignin and anti-UV radiation. *Industrial Crops and Products* 174.
- Luchnikova, Natalia A.; Ivanova, Kseniya M.; Tarasova, Ekaterina V.; Grishko, Victoria V.; Ivshina, Irina B. (2019):** Microbial Conversion of Toxic Resin Acids. *Molecules* 24 (22).
- Lupoi, Jason S.; Singh, Seema; Parthasarathi, Ramakrishnan; Simmons, Blake A.; Henry, Robert J. (2015):** Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 49, S. 871 – 906.
- Maltese, Federica; van der Kooy, Frank; Verpoorte, Robert (2009):** Solvent derived artifacts in natural products chemistry. *Natural product communications* 4 (3).
- Marques De Souza, Cristina Giatti; Peralta, Rosane Marina (2003):** Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. *J. Basic Microbiol.* 43 (4), S. 278 – 286.

- Martinez, Angel T.; Speranza, Mariela; Ruiz-Duenas, Francois J.; Ferreira, Patricia; Camarero, Susana; Guillen, Francisco et al. (2005):** Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin the fungal attack of lignin. *International Microbiology* (8), S. 195 – 204.
- Mathews, Stephanie L.; Pawlak, Joel; Grunden, Amy M. (2015):** Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. *Applied microbiology and biotechnology* 99 (7), S. 2939 – 2954.
- Meyer, W.; Gams, W. (2003):** Delimitation of *Umbelopsis* (*Mucorales*, *Umbelopsidaceae* fam. nov.) based on ITS sequence and RFLP data. *Mycological Research* 107 (3), S. 339 – 350.
- Mimini, Vebi; Sykacek, Eva; Syed Hashim, Sharifah Nurul Ain; Holzweber, Julian; Hettegger, Hubert; Fackler, Karin et al. (2019):** Compatibility of Kraft Lignin, Organosolv Lignin and Lignosulfonate With PLA in 3D Printing. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 39 (1), S. 14 – 30.
- Miyagi, Masaru; Wilson, Rachel; Saigusa, Daisuke; Umeda, Keiko; Saijo, Reina; Hager, Christopher L. et al. (2020):** Indole-3-acetic acid synthesized through the indole-3-pyruvate pathway promotes *Candida tropicalis* biofilm formation. *PloS one* 15 (12), e0244246.
- Mohagheghzadeh, Abdolali; Schmidt, Thomas J.; Alfermann, A. Wilhelm (2002):** Arylnaphthalene lignans from in vitro cultures of *Linum austriacum*. *Journal of natural products* 65 (1), S. 69 – 71.
- Momoh-Salami, T. M.; Zakka, A. W.; Omotayo, A. E.; Buraimoh, O. M. (2023):** The impact of global climate change on biodiversity and public health: a review. *Science World Journal* 18 (2).
- Mózsik, László; Iacovelli, Riccardo; Bovenberg, Roel A. L.; Driessen, Arnold J. M. (2022):** Transcriptional Activation of Biosynthetic Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 10, S. 901037.
- Murray, James; King, David (2012):** Climate policy: Oil's tipping point has passed. *Nature* 481 (7382), S. 433 – 435.
- Nakano, Chiaki; Ozawa, Hiroki; Akanuma, Genki; Funa, Nobutaka; Horinouchi, Sueharu (2009):** Biosynthesis of aliphatic polyketides by type III polyketide synthase and methyltransferase in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 191 (15), S. 4916 – 4923.
- Nedelcheva, Rada; Zarev, Yancho; Mihaylova, Rositsa; Kozuharova, Ekaterina; Momekov, Georgi; Ionkova, Iliana (2024):** Arylnaphthalene lignans with a focus *Linum species*: a review on phytochemical, biotechnological and pharmacological potential. *PHAR* 71, S. 1 – 10.
- Niku-Paavola, M. L.; Raaska, L.; Itävaara, M. (1990):** Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. *Mycological Research* 94 (1), S. 27 – 31.
- Nilsson, Thomas; Daniel, Geoffrey (1989):** Chemistry and Microscopy of Wood Decay by Some Higher *Ascomycetes*. *Holzforschung* 43 (1), S. 11 – 18.
- Nishikawa, Hidejiro (1933):** Biochemistry of filamentous fungi III A metabolic product of *Aspergillus melleus* Yukawa. Part II. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan* 9 (10-12), S. 148 – 1551.

- Noor, Ahmad Omar; Almasri, Diena Mohammedallam; Bagalagel, Alaa Abdullah; Abdallah, Hossam Mohamed; Mohamed, Shaimaa Gamal Abdallah; Mohamed, Gamal Abdallah; Ibrahim, Sabrin Ragab Mohamed (2020):** Naturally Occurring Isocoumarins Derivatives from Endophytic Fungi: Sources, Isolation, Structural Characterization, Biosynthesis, and Biological Activities. *Molecules* 25 (2), S. 395.
- Okamoto, Kenji; Narayama, Shinji; Katsuo, Akihisa; Shigematsu, Ichirou; Yanase, Hideshi (2002):** Biosynthesis of p-anisaldehyde by the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93 (2), S. 207 – 210.
- Okuno, Toshikatsu; Oikawa, Satoru; Goto, Takanobu; Sawai, Ko; Shirahama, Haruhisa; Matsumoto, Takeshi (1986):** Structures and Phytotoxicity of Metabolites from *Valsa ceratosperma*. *Agricultural and Biological Chemistry* 50 (4), S. 997 – 1001.
- Omura, T.; Sato, R. (1964):** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemeprotein nature. *Journal Biol Chem* 239 (7), S. 2370 – 2378.
- O'Toole, George A. (2011):** Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE* (47).
- O'Toole, George A.; Kolter, Robert (1998):** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology* 28 (3), S. 449 – 461.
- Palmieri, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Scaloni, A.; Capasso, A.; Sannia, G. (1997):** A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of biological chemistry* 272 (50), S. 31301 – 31307.
- Park, Soyung; Kim, Seungsu; Shin, Dongyun (2021):** Arylnaphthalene lactones: structures and pharmacological potentials. *Phytochem Rev* 20 (5), S. 1033 – 1054.
- Parums, Dinah V. (2024):** A Review of the Increasing Global Impact of Climate Change on Human Health and Approaches to Medical Preparedness. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 30, e945763.
- Peduto, Antonella; Bruno, Ferdinando; Dehm, Friedrike; Krauth, Verena; Caprariis, Paolo de; Weinigel, Christina et al. (2014):** Further studies on ethyl 5-hydroxy-indole-3-carboxylate scaffold: design, synthesis and evaluation of 2-phenylthiomethyl-indole derivatives as efficient inhibitors of human 5-lipoxygenase. *European journal of medicinal chemistry* 81, S. 492 – 498.
- Pfrenge, Tim (2022):** Generation of renewable materials from industrial lignin waste by fungal biotransformation. *Johannes Gutenberg-Universität Mainz*.
- Pointing, Stephen B. (1999):** Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production of tropical fungi. *Fungal Diversity* (2), S. 17 – 33.
- Pokhrel, D.; Viraraghavan, T. (2004):** Treatment of pulp and paper mill wastewater - a review. *The Science of the total environment* 333 (1-3), S. 37 – 58.
- Poraj-Kobielska, Marzena; Kinne, Matthias; Ullrich, René; Scheibner, Katrin; Hofrichter, Martin (2012):** A spectrophotometric assay for the detection of fungal peroxygenases. *Analytical biochemistry* 421 (1), S. 327 – 329.
- Pu, Hong; Liu, Jianxin; Wang, Yeji; Peng, Yuhui; Zheng, Wanying; Tang, Yang et al. (2021):** Bioactive α -Pyrone Derivatives from the Endophytic Fungus *Diaporthe* sp. CB10100 as Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *Frontiers in chemistry* 9.

- Qian, Chao-Dong; Fu, Yu-Hang; Jiang, Fu-Sheng; Xu, Zheng-Hong; Cheng, Dong-Qing; Ding, Bin et al. (2014):** *Lasiodiplodia* sp. ME4-2, an endophytic fungus from the floral parts of *Viscum coloratum*, produces indole-3-carboxylic acid and other aromatic metabolites. *BMC microbiology* 14, S. 297.
- Qiang, Hongru; Wang, Jiewen; Liu, Hengxu; Zhu, Yunqing (2023):** From vanillin to biobased aromatic polymers. *Polym. Chem.* 14 (37), S. 4255 – 4274.
- Que, Yawei; Huang, Donghai; Gong, Shuangjun; Zhang, Xuejiang; Yuan, Bin; Xue, Minfeng et al. (2022):** Indole-3-Carboxylic Acid From the Endophytic Fungus *Lasiodiplodia pseudotheobromae* LPS-1 as a Synergist Enhancing the Antagonism of Jasmonic Acid Against *Blumeria graminis* on Wheat. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 12.
- Radveikienė, Ingrida; Vidžiūnaitė, Regina; Meškys, Rolandas; Časaitė, Vida (2024):** Blue and Yellow Laccases from *Alternaria* sp. Strain HU: Characterization and Immobilization on Magnetic Nanoparticles. *Journal of fungi* 10 (8).
- Rajarammohan, Sivasubramanian; Paritosh, Kumar; Pental, Deepak; Kaur, Jagreet (2019):** Comparative genomics of *Alternaria* species provides insights into the pathogenic lifestyle of *Alternaria brassicae* - a pathogen of the *Brassicaceae* family. *BMC genomics* 20 (1), S. 1036.
- Reimers, Jeffrey R.; Hall, Lachlan E. (1999):** The Solvation of Acetonitrile. *J. Am. Chem. Soc.* 121 (15), S. 3730 – 3744.
- Reveglia, Pierluigi; Masi, Marco; Evidente, Antonio (2020):** Melleins-Intriguing Natural Compounds. *Biomolecules* 10 (5).
- Rico-García, Diana; Ruiz-Rubio, Leire; Pérez-Alvarez, Leyre; Hernández-Olmos, Saira L.; Guerrero-Ramírez, Guillermo L.; Vilas-Vilela, José Luis (2020):** Lignin-Based Hydrogels: Synthesis and Applications. *Polymers* 12 (1).
- Rinaldi, Roberto; Jastrzebski, Robin; Clough, Matthew T.; Ralph, John; Kennema, Marco; Bruijninx, Pieter C. A.; Weckhuysen, Bert M. (2016):** Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. *Angewandte Chemie* 55 (29), S. 8164 – 8215.
- Rogers, Jack D. (1979):** The *Xylariaceae*: systematic, biological and evolutionary aspects. *Mycologia* 71 (1), S. 1 – 42.
- Ruiz-Dueñas, Francisco J.; Barrasa, José M.; Sánchez-García, Marisol; Camarero, Susana; Miyauchi, Shingo; Serrano, Ana et al. (2021):** Genomic Analysis Enlightens *Agaricales* Lifestyle Evolution and Increasing Peroxidase Diversity. *Molecular biology and evolution* 38 (4), S. 1428 – 1446.
- Sánchez, Carmen (2010):** Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied microbiology and biotechnology* 85 (5), S. 1321 – 1337.
- Sánchez-Ruiz, María Isabel; Santillana, Elena; Linde, Dolores; Romero, Antonio; Martínez, Angel T.; Ruiz-Dueñas, Francisco Javier (2024):** Structure-function characterization of two enzymes from novel subfamilies of manganese peroxidases secreted by the lignocellulose-degrading *Agaricales* fungi *Agrocybe pediades* and *Cyathus striatus*. *Biotechnology for biofuels and bioproducts* 17 (1), S. 74.
- Sarkanen, K. V.; Hergert, H. L.; Ludwig, C. H. (1971):** Classification and Distribution. Lignins: Occurrence Formation, Structure, Chemical Macromolecular Properties, Utilization.

- Savluchinske Feio, S.; Gigante, B.; Carlos Roseiro, J.; Marcelo-Curto, M.J (1999):** Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives. *Journal of Microbiological Methods* 35 (3), S. 201 – 206.
- Scarselletti, R.; Faull, J. L. (1994):** In vitro activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research* 98 (10), S. 1207 – 1209.
- Schäberle, Till F. (2016):** Biosynthesis of α -pyrones. *Beilstein journal of organic chemistry* 12, S. 571 – 588.
- Schick Zapanta, Laura; Tien, Ming (1997):** The Roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *Journal of Biotechnology* 53 (2-3), S. 93 – 102.
- Schoenmakere, M. de; Gillabel, J.; Reichel, A. (2016):** Circular economy in Europe. Delevoping the knowledge base. *European Environment Agency*.
- Schön, Lara (2023):** Degradation of phenolic substances from lignolic wastes and the production of novel compounds through filamentous fungi. *Johannes Gutenberg-Universität Mainz*.
- Schüffler, Anja; Sterner, Olov; Anke, Heidrun (2007):** Cytotoxic alpha-pyrones from *Xylaria hypoxylon*. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 62 (3-4), S. 169 – 172.
- Schutyser, W.; Renders, T.; van den Bosch, S.; Koelewijn, S-F; Beckham, G. T.; Sels, B. F. (2018):** Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading. *Chemical Society reviews* 47 (3), S. 852 – 908.
- Sharma, Anuja; Aggarwal, Neeraj K.; Yadav, Anita (2016):** First Report of Lignin Peroxidase Production from *Alternaria alternata* ANF238 Isolated from Rotten Wood Sample. 4 (5), S. 76 – 87.
- Shreaz, Sheikh; Bhatia, Rimple; Khan, Neelofar; Muralidhar, Sumathi; Basir, Seemi F.; Manzoor, Nikhat; Khan, Luqman Ahmad (2011):** Exposure of *Candida* to p-anisaldehyde inhibits its growth and ergosterol biosynthesis. *The Journal of general and applied microbiology* 57 (3), S. 129 – 136.
- Sierra-Alvarez, R.; Dorado, J.; Lenon, G.; Claassen, F. W.; van Beek, T. A.; Wijnberg, H. B. P. A. (2000):** Removal and transformation of toxic resin acids by wood-inhabiting fungi. *Pulping./Process & Product Quality Conference*.
- Simmons, E. G. (2007):** *Alternaria*. An identification manual. *CBS Fungal Biodiversity Series* (6), S. 444 – 445.
- Singh, Deepti; Gupta, Neeraj (2021):** Screening and Molecular Characterization of Ligninolytic Enzyme-Producing Strain *Alternaria alternata* from soil. *Biosc Biotech Res Comm* 14 (3), S. 1345 – 1351.
- Singh Arora, Daljit; Kumar Sharma, Rakesh (2010):** Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Applied biochemistry and biotechnology* 160 (6), S. 1760 – 1788.
- Souza Ramos, Aline de; Fiaux, Sorele Batista; Leite, Selma Gomes Ferreira (2008):** Production of 6-pentyl- α -pyrone by *trichoderma harzianum* in solid-state fermentation. *Brazilian journal of microbiology*: 39 (4), S. 712 – 717.
- Stahel, Walter R. (2016):** The circular economy. *Nature* 531 (7595), S. 435 – 438.
- Staszczak, Magdalena; Nowak, Grzegorz; Grzywnowicz, Krzysztof; Leonowicz, Andrzej (1996):** Proteolytic activities in cultures of selected white-rot fungi. *J. Basic Microbiol.* 36 (3), S. 193 – 203.

- Stellmach, Bruno (1988):** Katalase. In: Bruno Stellmach (Hg.): Bestimmungsmethoden Enzyme. Heidelberg: Steinkopff, S. 148 – 155.
- Sugano, Yasushi; Yoshida, Toru (2021):** DyP-Type Peroxidases: Recent Advances and Perspectives. *International journal of molecular sciences* 22 (11).
- Sun, Lei; Yin, Xiaolei; Sossah, Frederick Leo; Han, Xuerong; Li, Yu (2023):** Comparative genomic analysis of *pleurotus* species reveals insights into the evolution and coniferous utilization of *Pleurotus placentodes*. *Front. Mol. Biosci.* 10, Artikel 1292556.
- Sundberg, Richard (2012):** The chemistry of indoles. *Elsevier* (18).
- Suzuki, Yuzo; Okamura-Abe, Yuriko; Nakamura, Masaya; Otsuka, Yuichiro; Araki, Takuma; Otsuka, Hiroyuki et al. (2020):** Development of the production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid from lignin extracts, which are industrially formed as by-products, as raw materials. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 130 (1), S. 71 – 75.
- Tanase-Opedal, Mihaela; Espinosa, Eduardo; Rodríguez, Alejandro; Chinga-Carrasco, Gary (2019):** Lignin: A Biopolymer from Forestry Biomass for Biocomposites and 3D Printing. *Materials* 12 (18).
- Thakur, Vijay Kumar; Thakur, Manju Kumari (2015):** Recent advances in green hydrogels from lignin: a review. *International journal of biological macromolecules* 72, S. 834 – 847.
- Tian, Jiang-Hao; Pourcher, Anne-Marie; Bouchez, Théodore; Gelhaye, Eric; Peu, Pascal (2014):** Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Applied microbiology and biotechnology* 98 (23), S. 9527 – 9544.
- Tonin, Fabio; Tieves, Florian; Willot, Sébastien; van Troost, Anouska; van Oosten, Remco; Breestraat, Stefaan et al. (2021):** Pilot-Scale Production of Peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Organic process research & development* 25 (6), S. 1414 – 1418.
- Troschütz, Reinhard; Karg, Eva-Maria; Werz, Oliver; Koeberle, Andreas (2008):** Use of indole-3-carboxylic acid esters for the inhibition of microsomal prostaglandin E2 synthase. (Patent DE102008027331A1).
- Troya, T.; Muñoz-Mingarro, D.; Llinares, F.; Rodríguez-Borrajo, C.; Yuste, M.; Rubio, F. (2000):** Detection of lignocellulolytic enzymatic activities of *Chaetomium* spp. *Forest Systems* 9 (1), S. 5 – 15.
- Upton, Brianna M.; Kasko, Andrea M. (2016):** Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective. *Chemical reviews* 116 (4), S. 2275 – 2306.
- van Beek, Teris A.; Claassen, Frank W.; Dorado, Jose; Godejohann, Markus; Sierra-Alvarez, Reyes; Wijnberg, Joannes B. P. A. (2007):** Fungal biotransformation products of dehydroabietic acid. *Journal of natural products* 70 (2), S. 154 – 159.
- van Maris, Antonius J. A.; Abbott, Derek A.; Bellissimi, Eleonora; van den Brink, Joost; Kuyper, Marko; Luttkik, Marijke A. H. et al. (2006):** Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek* 90 (4), S. 391 – 418.
- Vasile, Cornelia; Baican, Mihaela (2023):** Lignins as Promising Renewable Biopolymers and Bioactive Compounds for High-Performance Materials. *Polymers* 15 (15).
- Vásquez-Garay, Francisco; Carrillo-Varela, Isabel; Vidal, Claudia; Reyes-Contreras, Pablo; Faccini, Mirko; Teixeira Mendonça, Regis (2021):** A Review on the Lignin Biopolymer and Its Integration in the Elaboration of Sustainable Materials. *Sustainability* 13 (5), S. 2697.

- Venkatasubbaiah, P.; Sutton, T. B.; Chilton, W. S. (1991):** Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot. *Phytopathology* 81 (3), S. 243 – 247.
- Venturella, G.; Gargano, M. L.; Compagano, R. (2015):** The genus *Pleurotus* in Italy. *Fl. Medit.* 25 (Special Issue).
- Vevere, Laima; Fridrihsone, Anda; Kirpluks, Mikelis; Cabulis, Ugis (2020):** A Review of Wood Biomass-Based Fatty Acids and Rosin Acids Use in Polymeric Materials. *Polymers* 12 (11).
- Vigh, Maria (2023):** A trashed treasure: Lignin could become a large and renewable source of organic compounds for the chemical industry to replace fossil fuel-based chemicals. *EMBO reports* 24 (5), e57103.
- Vishtal, Alexey Grigorievich; Kraslawski, Andrzej (2011):** Challenges in industrial applications of technical lignins. *BioResources* 6(3), S. 3547 – 3568.
- Volkman, John K.; Holdsworth, Daniel G.; Richardson, Desmond E. (1993):** Determination of resin acids by gas chromatography and high-performance liquid chromatography in paper mill effluent, river waters and sediments from the upper Derwent Estuary, Tasmania. *Journal of Chromatography A* 643 (1-2), S. 209 – 219.
- Wan, Qingpei; Thompson, Barry C. (2024):** Control of Properties through Hydrogen Bonding Interactions in Conjugated Polymers. *Advanced science* 11 (8), e2305356.
- Wang, Guan; Wang, Yongli; Ma, Youguang; Hao, Hongxun; Wang, Huihui; Zhang, Jie (2014):** Concomitant Crystallization of Cefuroxime Acid and Its Acetonitrile Solvate in Acetonitrile and Water Solution. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 (36), S. 14028 – 14035.
- Wariishi, Hiroyuki; Akileswaran, Lakshmi; Gold, Michael H. (1988):** Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral Characterization of the Oxidized States and the Catalytic Cycle¹. *Biochemistry* 27 (14), S. 5365 – 5370.
- Whetten, R.; Sederoff, R. (1995):** Lignin Biosynthesis. *the plant cell* (Vol. 7), S. 1001 – 1013.
- Widsten, Petri; Kandelbauer, Andreas (2008):** Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 42 (4), S. 293 – 307.
- Windeisen, E.; Wegener, G. (2012):** Lignin as Building Unit for Polymers. In: *Polymer Science: A Comprehensive Reference*: Elsevier, S. 255 – 265.
- Wood, D. A.; Smith, F. A. (1987):** The cultivation of mushrooms, S. 309 – 343.
- World Meteorological Organization (2024):** WMO Greenhouse Gas Bulletin – No. 20: The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Based on Global Observations through 2023.
- Woudenberg, J. H. C.; Groenewald, J. Z.; Binder, M.; Crous, P. W. (2013):** *Alternaria* redefined. *Studies in mycology* 75 (1), S. 171 – 212.
- Xiao, Dongliang; Wang, Yan; Gao, Congcong; Zhang, Xuemei; Feng, Weixing; Lu, Xuan; Feng, Baomin (2024):** A New Quinazolinone Alkaloid from *Rhodiola tibetica* Endophytic Fungus *Penicillium* sp. HJT-A-6.
- Xu, F. (1996):** Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35 (23), S. 7608 – 7614.
- Yadav, Lal Sahab; Bagool, R. G. (2015):** Isolation and Screening of Cellulolytic *Chaetomium* sp. from Deteriorated Paper Samples. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 4 (8).

- Yamagishi, Naho; Nishikawa, Junji; Oshima, Youichi; Eguchi, Naoki (2009):** Black spot disease of *alstroemeria* caused by *Alternaria alstroemeriae* in Japan. *J Gen Plant Pathol* 75 (5), S. 401 – 403.
- Yano, S.; Nakamura, T.; Uehara, T.; Furuno T.; Takahashi, A. (1994):** Biotransformation of terpenoids in conifers by microorganisms I. Hydroxylation of dehydroabietic acid by *Chaetomium cochliodes*. *Journal of the Japan Wood Research Society* 40 (11), S. 1226 – 1232.
- Youn, Hong-Duk; Hah, Yung Chil; Kang, Sa-Ouk (1995):** Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* 132 (3), S. 183 – 188.
- Zamora-Lagos, Maria-Antonia; Eckstein, Simone; Langer, Angela; Gazanis, Athanasios; Pfeiffer, Friedhelm; Habermann, Bianca; Heermann, Ralf (2018):** Phenotypic and genomic comparison of *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii* TT01 and a widely used rifampicin-resistant *Photorhabdus luminescens* laboratory strain. *BMC genomics* 19 (1), S. 854.
- Zare, Rasoul; Asgari, Bitia; Gams, Walter (2010):** The species of *Coniolariaella*. *Mycologia* 102 (6), S. 1383 – 1388.
- Zhang, Rui; Maltari, Riku; Guo, Ming; Kontro, Jussi; Eronen, Aleks; Repo, Timo (2020):** Facile synthesis of vanillin from fractionated Kraft lignin. *Industrial Crops and Products* 145.
- Zhu, Xudong; Zhou, Zijing; Guo, Gaijuan; Li, Jinda; Yan, Hong; Li, Fen (2023):** Proteomics and metabolomics analysis of the lignin degradation mechanism of lignin-degrading fungus *Aspergillus fumigatus* G-13. *Analytical methods: advancing methods and applications* 15 (8), S. 1062 – 1076.
- Zirbes, Michael; Quadri, Lorenzo L.; Breiner, Manuel; Stenglein, Andreas; Bomm, Alexander; Schade, Wolfgang; Waldvogel, Siegfried R. (2020):** High-Temperature Electrolysis of Kraft Lignin for Selective Vanillin Formation. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8 (19), S. 7300 – 7307.

6. Anhang

6.1 ITS-Sequenzen der eigenständig isolierten Pilzstämme

Gelistet sind die analysierten und editierten Nukleotidsequenzen, die aus der PCR-Amplifikation der ITS-Region der Pilz-rDNA mittels der Primer ITS1-F oder ITS4 und ITS5 resultierten. Die Identifikation der Organismen erfolgte über eine Homologiesuche mit dem Tool *BLASTn* (*National Center for Biotechnology information* (NCBI)-Datenbank).

ITS-Sequenz von *Agrocybe pediades*:

CAGCGCAAACCCATTATAGCAGACGTCCACGGCGTAGATAATTATCACACCAATAGACGG
 TTCCACTGCGGGCCACCGGCTAATACATTTAAGGGGAGCAGACTAATGAAAGCCAGCAA
 AAAGACCCCAAGTCCAAGCCATTATCAGCAAAAGCTAATAAGTTGAGAATTTAATGACA
 CTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTGAT
 GATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGC
 GAGAGCCAAGAGTCCGTTGCTGAAAGTTGTATATAGTTTATAGGCACTAGGCCATATACAA
 TACATTCTGTTACATTCTTTGGGGTATGTGTAAGACATAGGCCTGGATAATACAAGGAAAG
 CCGACTCGTGAAAGCCAGCAGTCTCCCGACCGAGTTGCCTCGGAAATTATCGTCCAG
 GTCTACAAAGGGTGCACAGGTGGAGATATAAAGATGACGGGCGAGCACATGTCCCCGAG
 AGGACCAGCTACAACCACGCCAGGTTTATTCAATAATGATCCT

ITS-Sequenz von *Alternaria alstroemeriae*:

GACAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCAT
 GCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTC
 TGCAATTCACACTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGAT
 CCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTT
 ATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGAAAAGACAAG
 GGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCGCCTTCATATTTGTGT
 AATG

ITS-Sequenz von *Coniolaria hispanica*:

ATGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATTGAGGTCAACCTTCTGTAAGGG
 GGTTCTTTTACGGCAGGAGGGCCGGCCCGGCGTAGGCGAGATGGAGAAAATCTACTA
 CGCCTAGAGCGCGAACCGGCTCCGCCACTGGATTTGAGGAGCGACGGCGGGACGCCG
 TGGGCTCCCAACGCTAAGCAACAGGGGCTTAAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGC
 ATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGAAT
 TCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGA
 GATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTTTCGTTTTATCGTTTCAGAGATTGAGGGCAAAA
 ACAGAGTTTCGTGGGCCGCGGGGAGGGGCGCCCCCGCCGAGGCAACGTACG
 GTATGTTACAGGGGTTGGGGAGTTTGGGTCAACTCTAATGATCCCTCCGCTGGTTC
 ACCAACGGAGACCTTGTTACG

ITS-Sequenz von *Chaetomium leptoderma*:

TTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTCTTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTGGGTAAA
AAAGGCTTTTTAACGGCCGGAACCCGCAGCACGCCCTGAGCGAGATAATACTACTACGC
TCGGAGTGACTAGCGAGCCCGCCACTGGTTTTTCAGGGCCTGCGGCAGCCGCAGGTCC
CCAACACAAGCCGGGGGCTTGATGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAG
AATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCA
CATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTG
AAAGTTTTGACTTATTCAGTACAGAAGACTCAGAGAGGCCATAAATTCAGAGTTAGAGC
CTCCGGCGGGCGCCCTGTAGGGGGCCGGGGGGCGCCGGGGGTGAGCCCGGTGCCG
CCCGCCGAAGCAACGGTGTAAAGGTAACGTTACAGATGGTTTAGGGAGTTTTGCAACTC
TGTAATGATCCCTCCGCTGTTTACCAACGGAGACCTTGTTACGA

ITS-Sequenz von *Pleurotus pulmonarius*:

ACAGAAGGTTCCGTAAGGTGAACCTGCGGGAAGGATCATTAAATGAATTCATATGGAGTT
GTTGCTGGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACCTT
TGATAGATCTGTGAAGTCGTCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGT
CTCGGTGTGACAACGCAGTCTATTTACTTAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAATGTCA
TTAATGGGCCTTGTGCCTATAAACCATAATACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAA
TCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTG
AGTGTCATTAAATTCTCAAACCTCACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTG
GCTGTAACAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCAT
GATGTGATAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCCCTAATCGTCC
GCAAGGACAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCA
TATCAATAAGCCGGGAAGGAAAAAA

ITS-Sequenz von *Pleurotus ostreatus*:

AAAGGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGGAAGGACATTAATGAATTCATATGGAGTTGTTGCT
GGCCTCTAGGGGCATGTGCACGCTTCACTAGTCTTTCAACCACCTGTGAACCTTTGATAG
ATCTGTGAAGTCGTCTTCAAGTCGTCAGACTTGGTTTGCTGGGATTTAAACGTCTCGGT
GTGACAACGCAGTCTATTTACTTAACACACCCCAAATGTATGTCTACGAATGTCATTTAATG
GGCCTTGTGCCTATAAACCATAATACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCA
TTAAATTCTCAAACCTCACATTTATTTGTGATGTTTGGATTGTTGGGGGTTGCTGGCTGTAA
CAAGTCGGCTCCTCTTAAATGCATTAGCAGGACTTCTCATTGCCTCTGCGCATGATGTGA
TAATTATCACTCATCAATAGCACGCATGAATAGAGTCCAGCTCTCTAATCGTCCGCAAGGA
CAATTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA
AGCCGGGAAGGAAAAAA

6.2 HPLC-Chromatogramme verschiedener Pilzisolat und Reinsubstanzen

6.2.1 HPLC-Chromatogramme von *Agrocybe pediades*

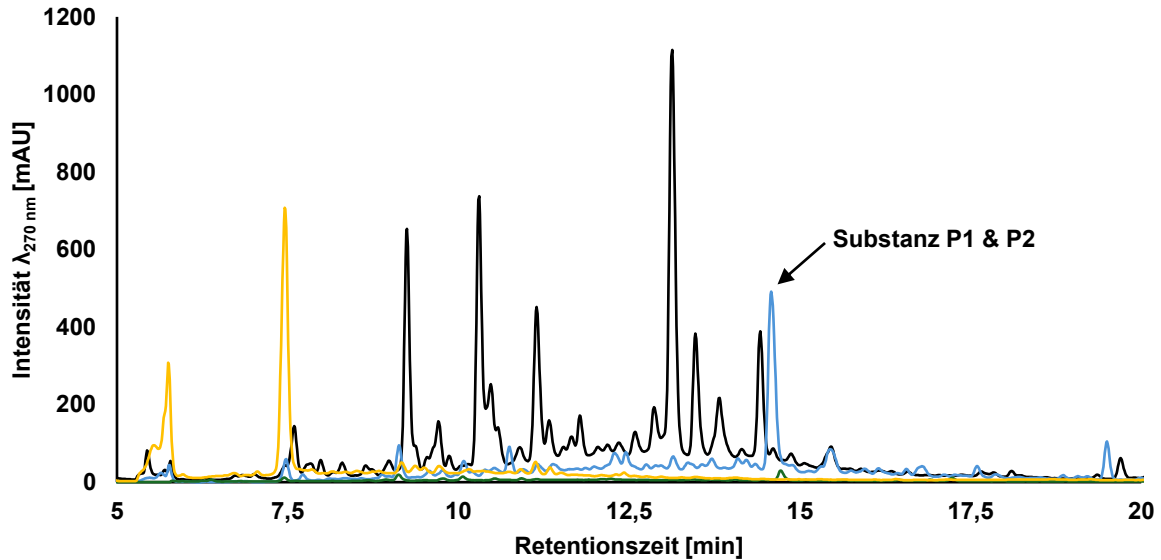


Abbildung 81: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Lignosulfonat (schwarz) sowie *A. pediades* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

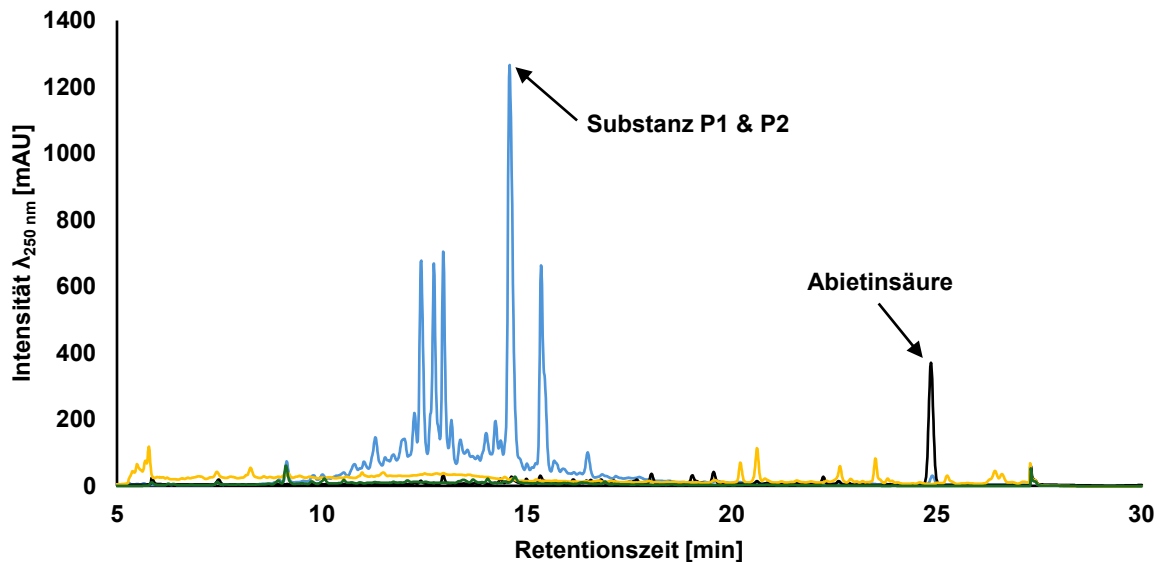


Abbildung 82: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Abietinsäure (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium mit DMSO (gelb), Minimalmedium mit Abietinsäure (schwarz) sowie *A. pediades* kultiviert in Minimalmedium mit DMSO (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,6 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 250 nm.

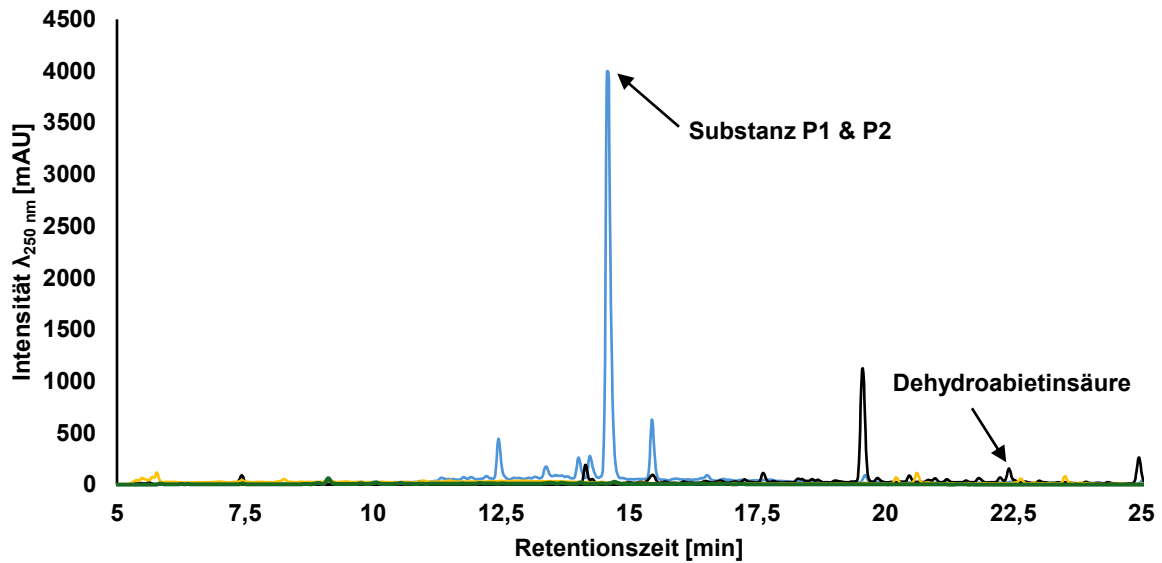


Abbildung 83: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Dehydroabietinsäure (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium mit DMSO (gelb), Minimalmedium mit Dehydroabietinsäure (schwarz) sowie *A. pediades* kultiviert in Minimalmedium mit DMSO (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,6 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 250 nm.

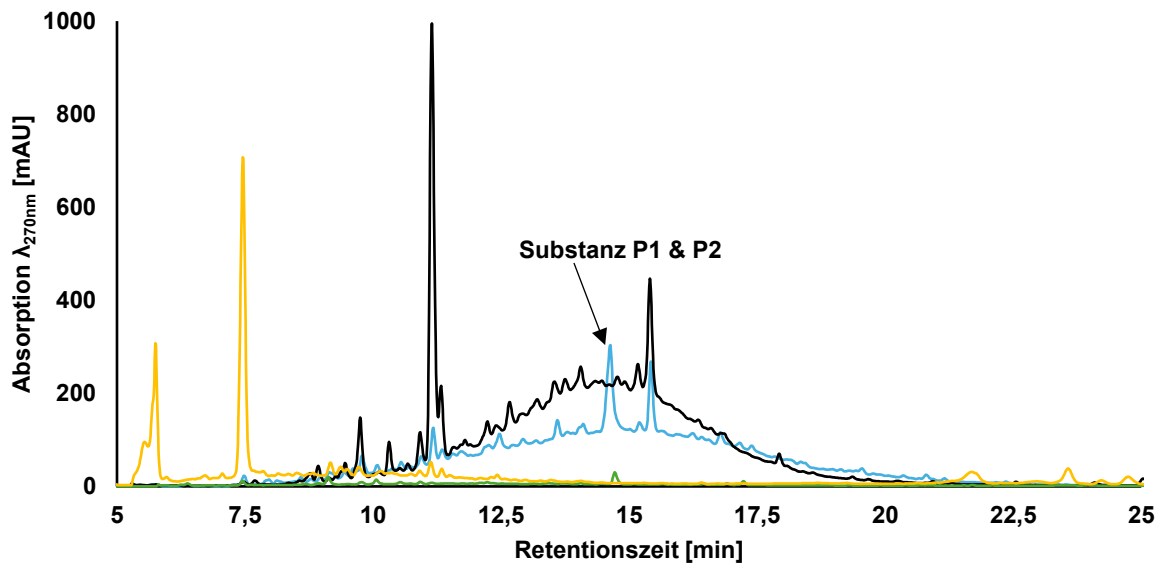


Abbildung 84: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Lignosulfonat (schwarz) sowie *A. pediades* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,6 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

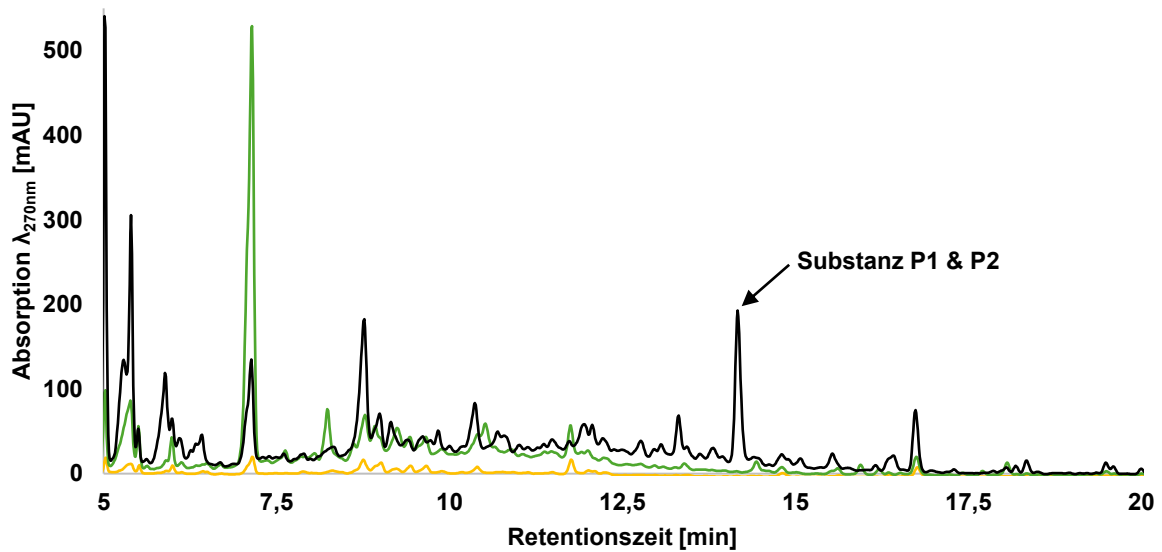


Abbildung 85: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 24-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen *A. pediades* kultiviert in HMG-Medium (gelb) und in HMG-Medium mit Kohlenmonoxid (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

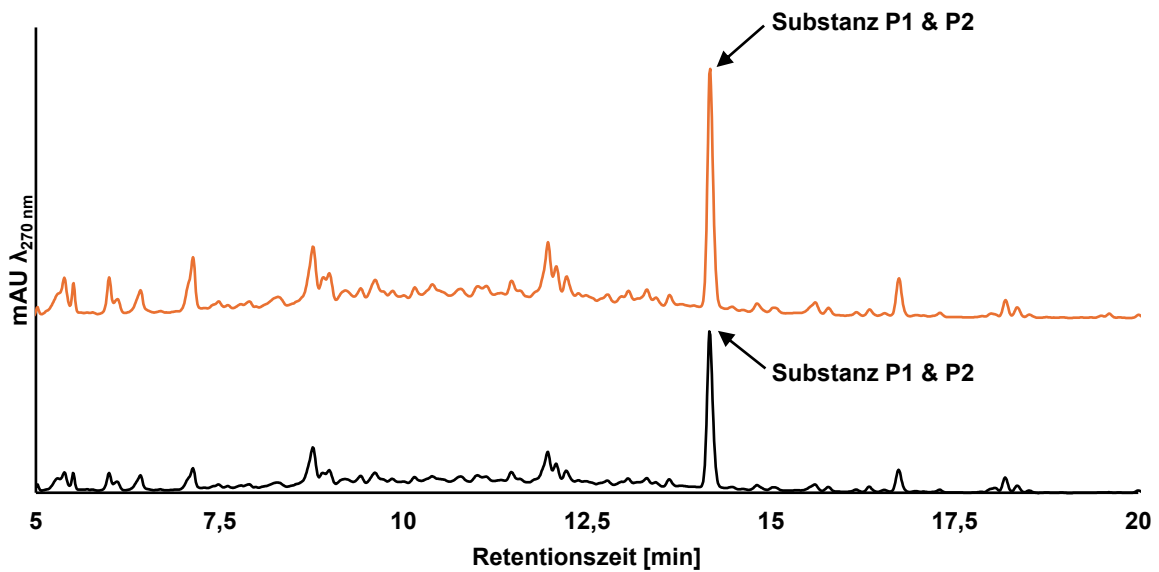


Abbildung 86: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 72-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zur Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat unter Zugabe von Kohlenmonoxid (orange). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 Minuten in beiden Ansätzen. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

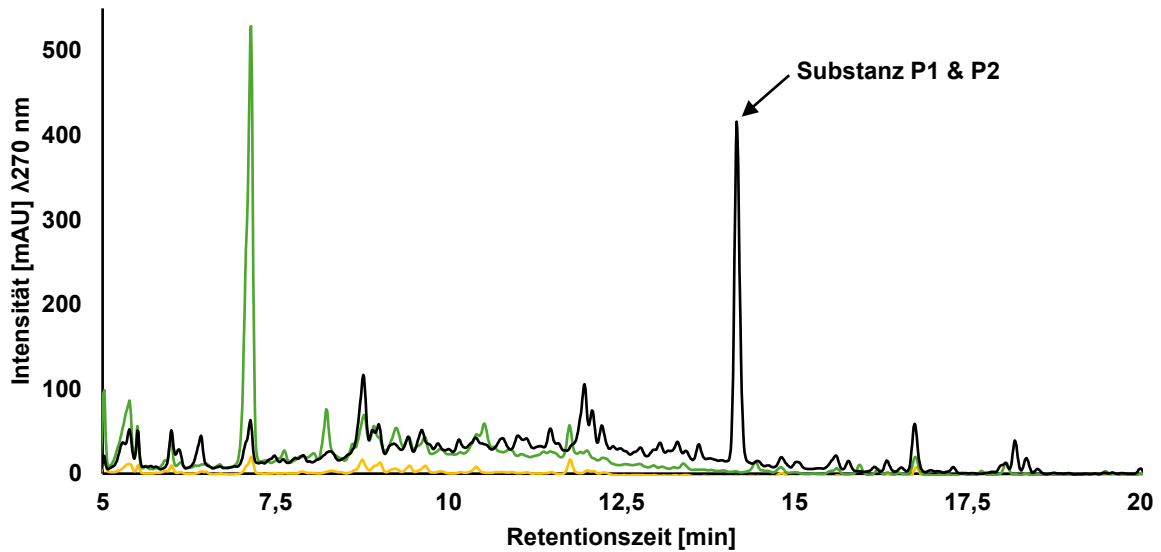


Abbildung 87: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Agrocybe pediades* nach 72-stündiger Kultivierung in HMG-Medium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen *A. pediades* kultiviert in HMG-Medium (gelb) und in HMG-Medium mit Kohlenmonoxid (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

6.2.2 HPLC-Chromatogramme der Abietinsäure und Dehydroabietinsäure

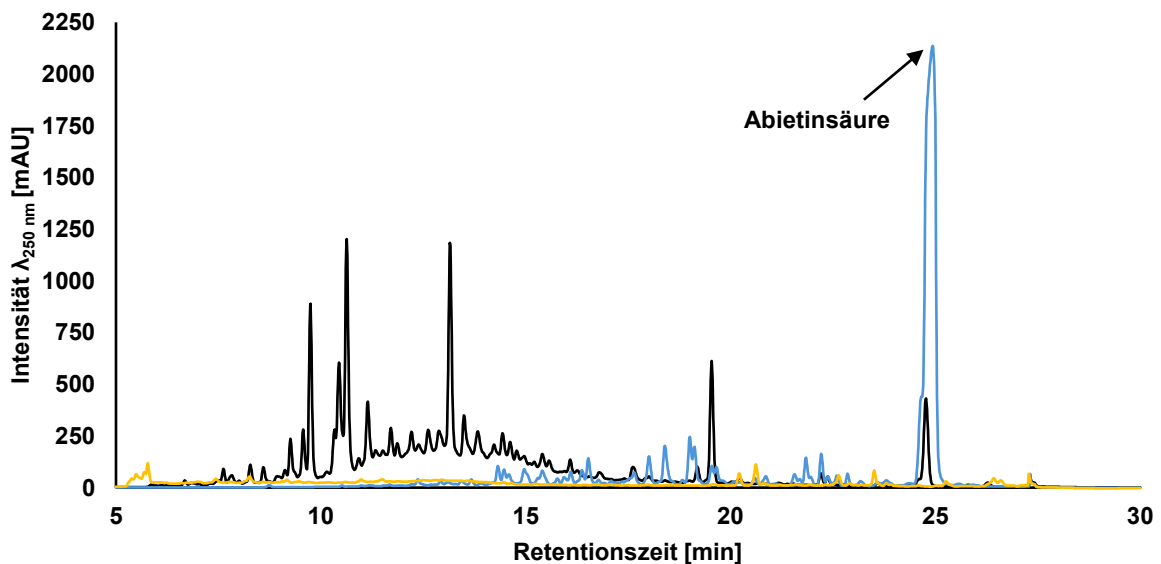


Abbildung 88: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Abietinsäure (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb) und Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Abietinsäure hat eine Retentionszeit von 24,8 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 250 nm.

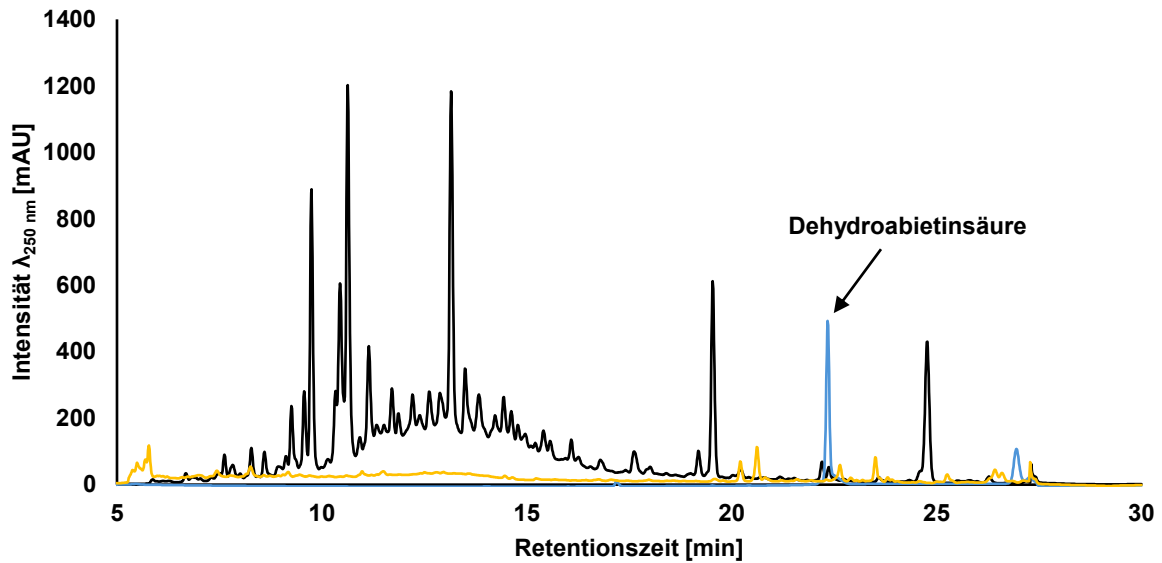


Abbildung 89: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Dehydroabietinsäure (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb) und Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Dehydroabietinsäure hat eine Retentionszeit von 22,4 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 250 nm.

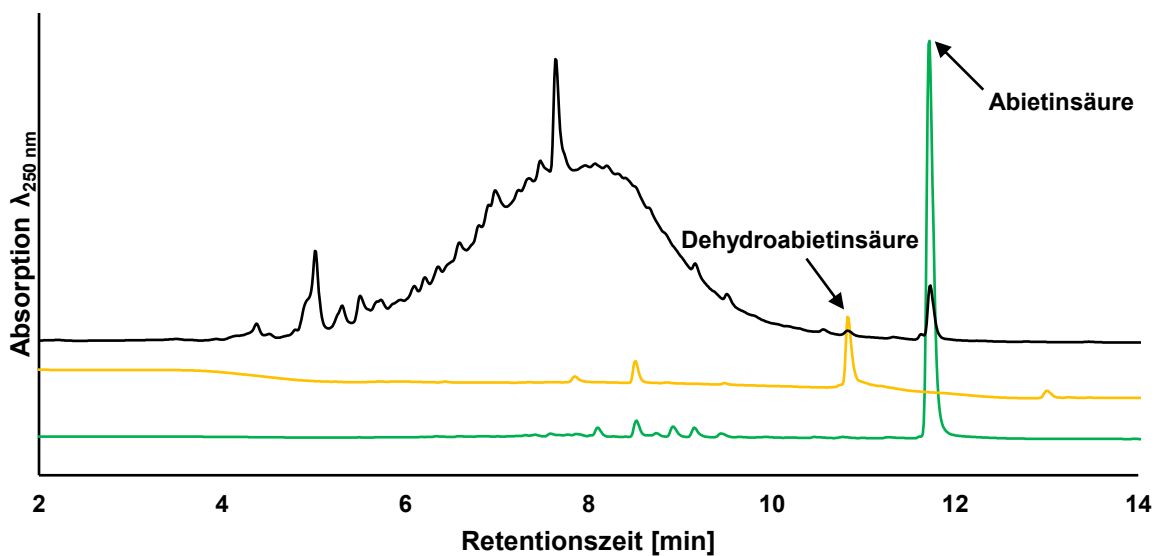


Abbildung 90: HPLC-MS-Chromatogramm der Reinsubstanzen Abietinsäure (grün) und Dehydroabietinsäure (gelb) im Vergleich zur Kontrolle Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz). Abietinsäure hat eine Retentionszeit von 11,7 min und Dehydroabietinsäure von 10,8 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 250 nm.

6.2.3 HPLC-Chromatogramme von *Alternaria astroemeriae*

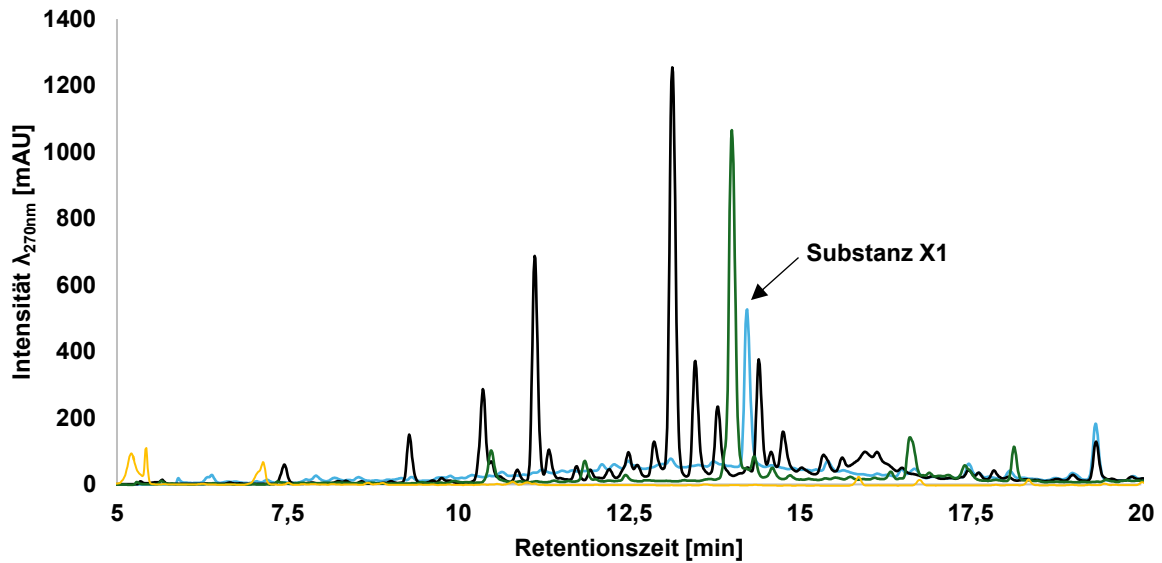


Abbildung 91: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Alternaria astroemeriae* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) sowie *A. astroemeriae* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurde die Substanz X1 mit einer Retentionszeit von 14,2 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm

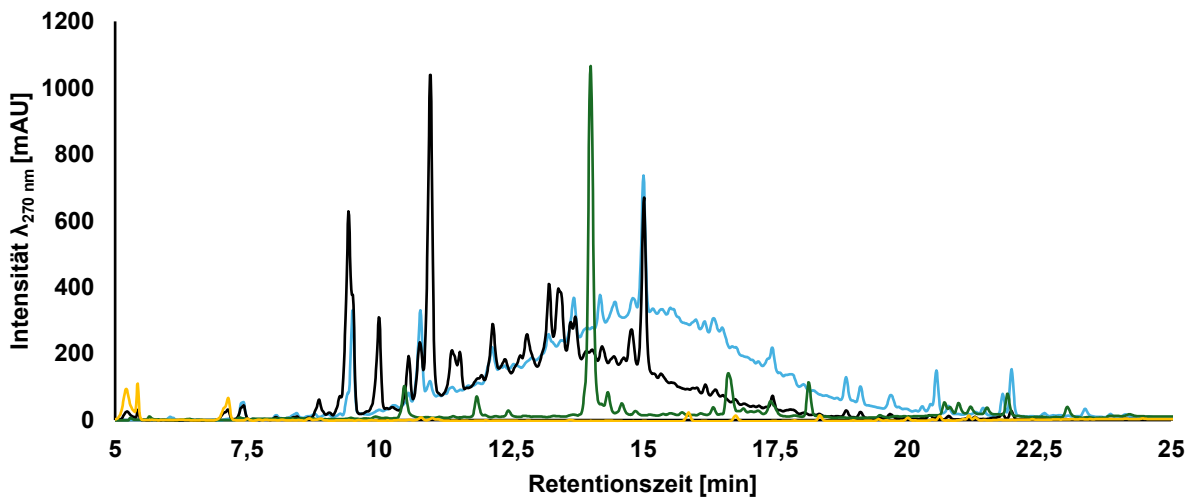


Abbildung 92: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Alternaria astroemeriae* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz) sowie *A. astroemeriae* kultiviert in Minimalmedium (grün). Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

6.2.4 HPLC-Chromatogramm von Conidendrin

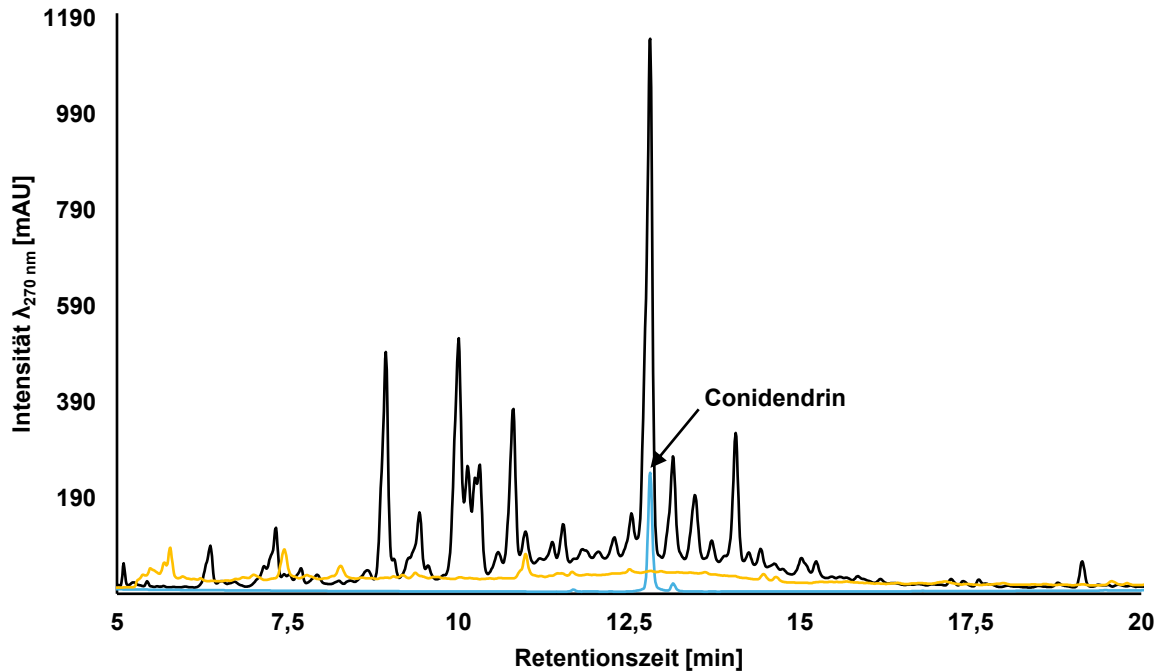


Abbildung 93: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanz Conidendrin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb) und Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz). Conidendrin hat eine Retentionszeit von 12,8 min. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

6.2.5 HPLC-Chromatogramme von *Coniolaria hispanica*

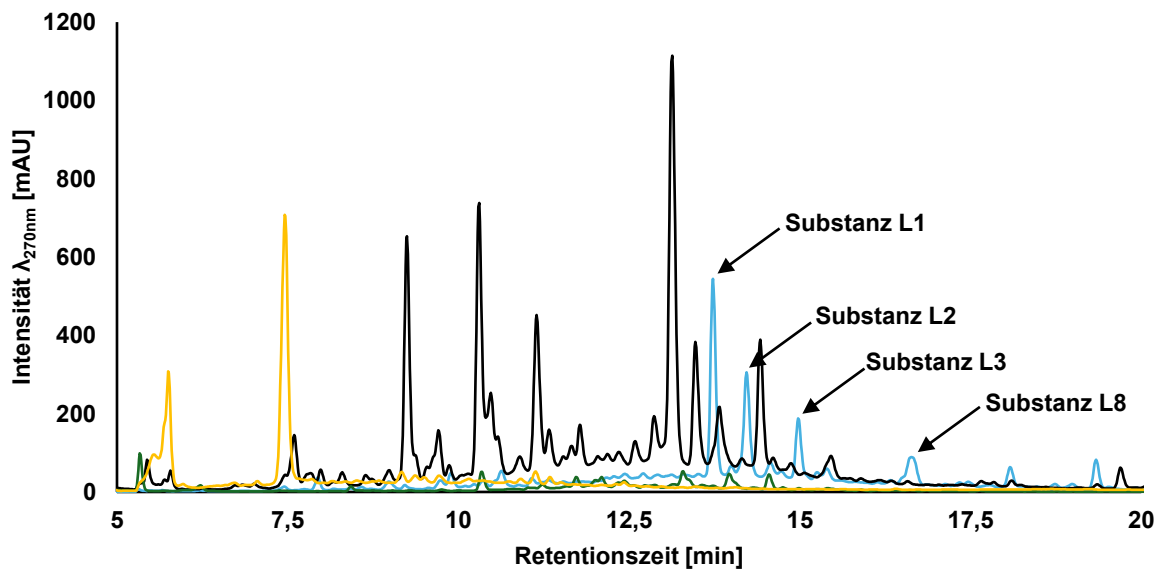


Abbildung 94: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolaria hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) sowie *C. hispanica* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurden die Substanzen L1 mit einer Retentionszeit von 13,9 Minuten, L2 mit 14,4 Minuten, L3 mit 15 Minuten und L8 mit 16,6 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

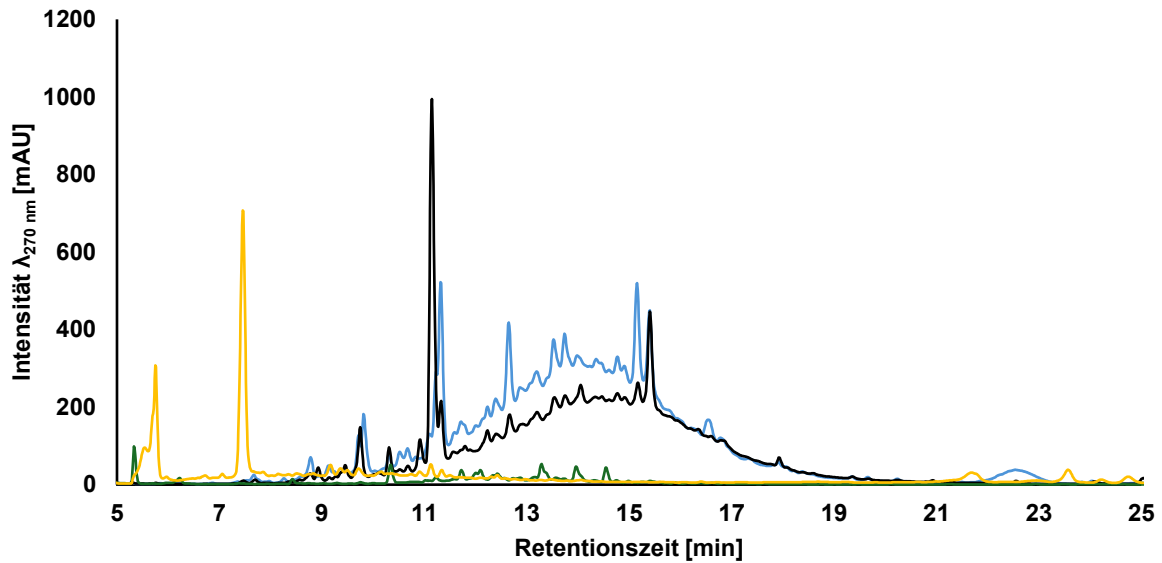


Abbildung 95: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolaria hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz) sowie *C. hispanica* kultiviert in Minimalmedium (grün). Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

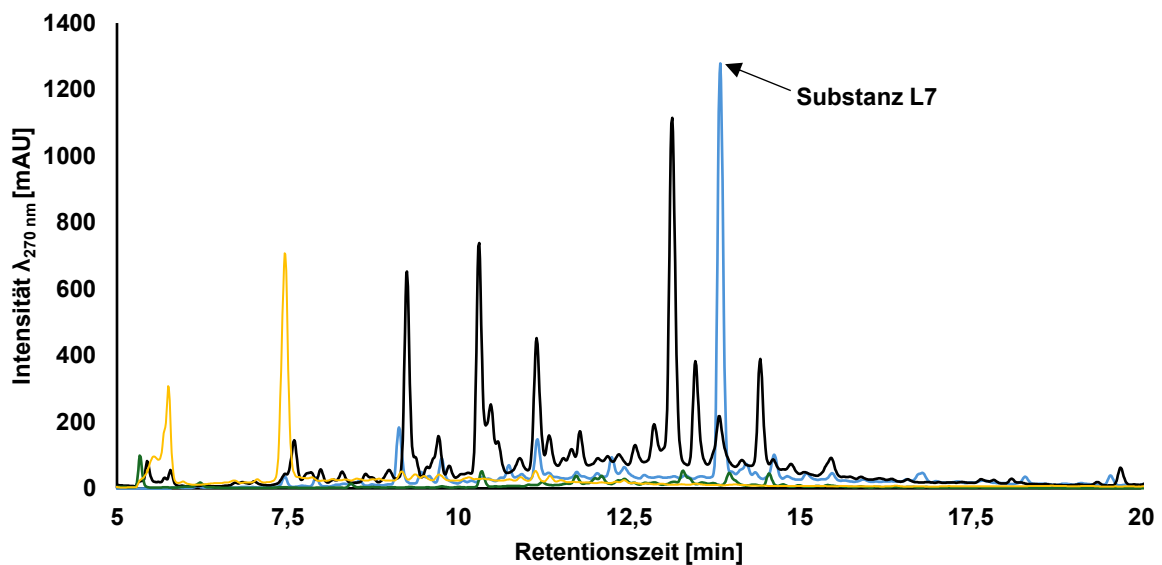


Abbildung 96: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Coniolaria hispanica* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) sowie *C. hispanica* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurde die Substanz L7 mit einer Retentionszeit von 13,8 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm

6.2.6 HPLC-Chromatogramme von *Chaetomium leptoderma*

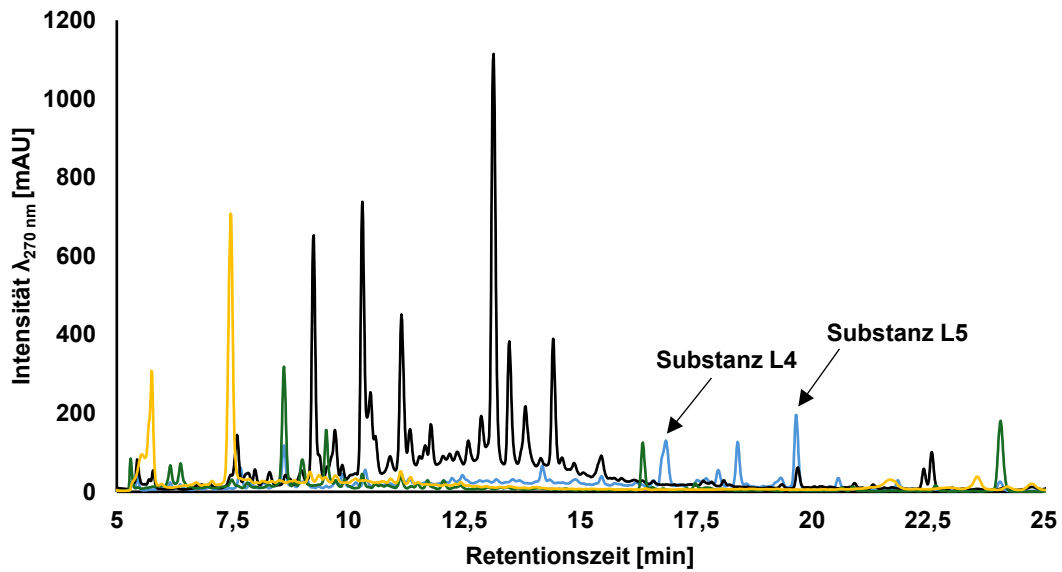


Abbildung 97: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) sowie *C. leptoderma* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurden die Substanzen L4 mit einer Retentionszeit von 16,4 Minuten und L5 mit 18,4 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

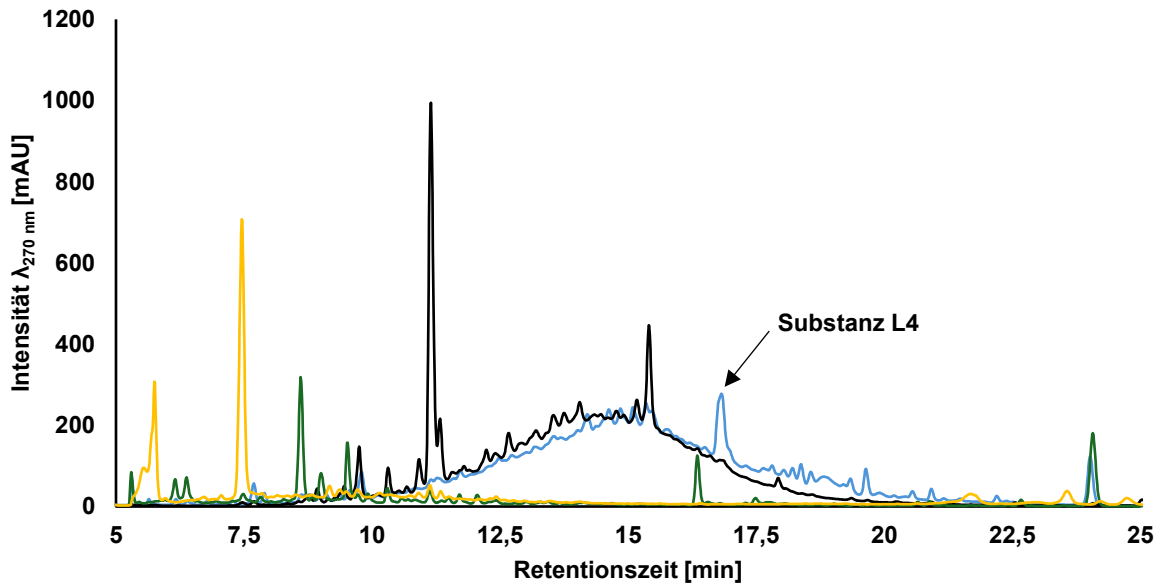


Abbildung 98: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Chaetomium leptoderma* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz) sowie *C. leptoderma* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurde die Substanz L4 mit einer Retentionszeit von 16,8 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

6.2.7 HPLC-Chromatogramme von *Pleurotus pulmonarius*

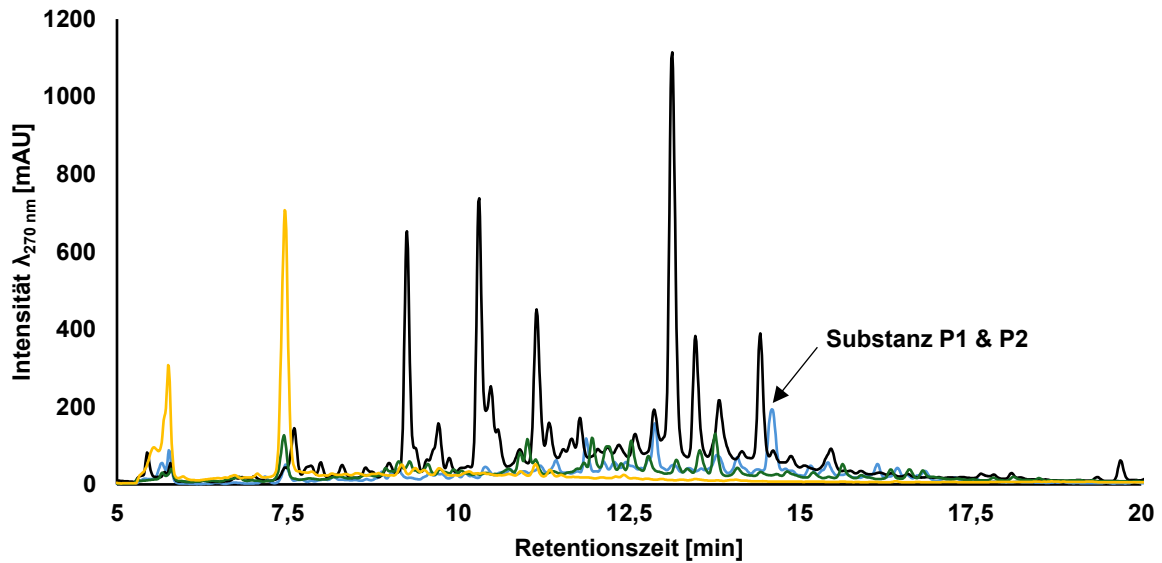


Abbildung 99: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pleurotus pulmonarius* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) sowie *P. pulmonarius* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

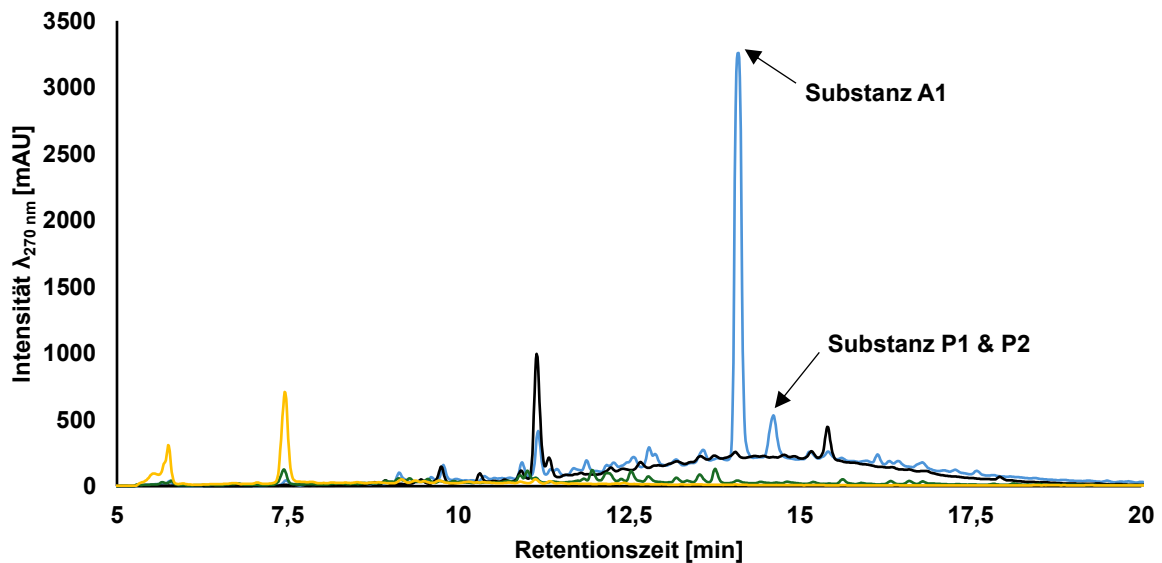


Abbildung 100: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pleurotus pulmonarius* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz) sowie *P. pulmonarius* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 Minuten sowie die Substanz A1 mit 14,1 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

6.2.8 HPLC-Chromatogramme von *Pleurotus ostreatus*

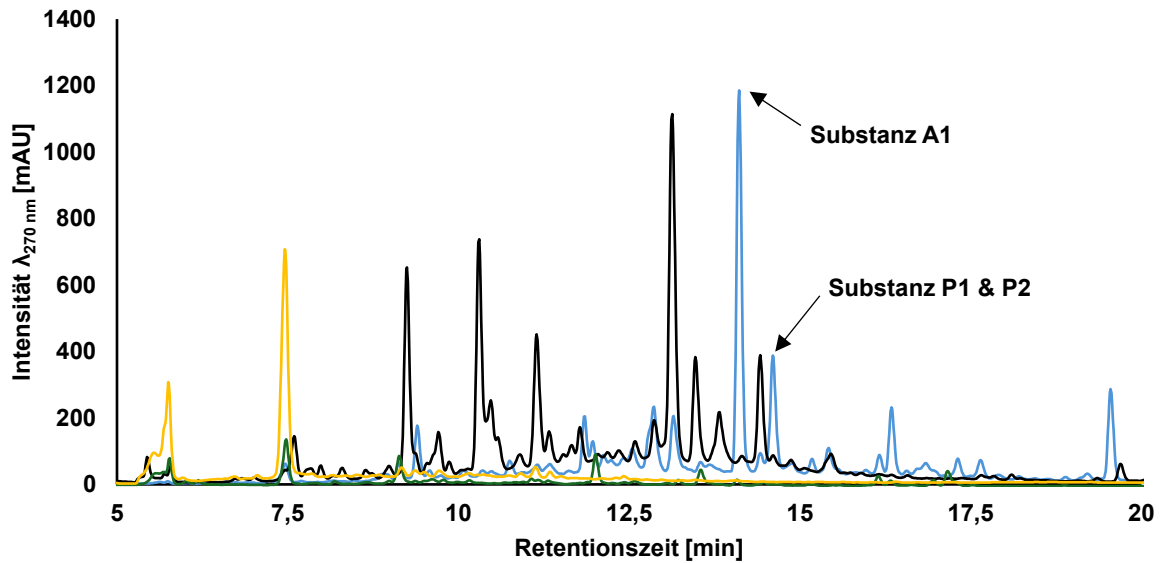


Abbildung 101: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pleurotus ostreatus* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat (schwarz) sowie *P. ostreatus* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,5 Minuten sowie die Substanz A1 mit 14,1 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

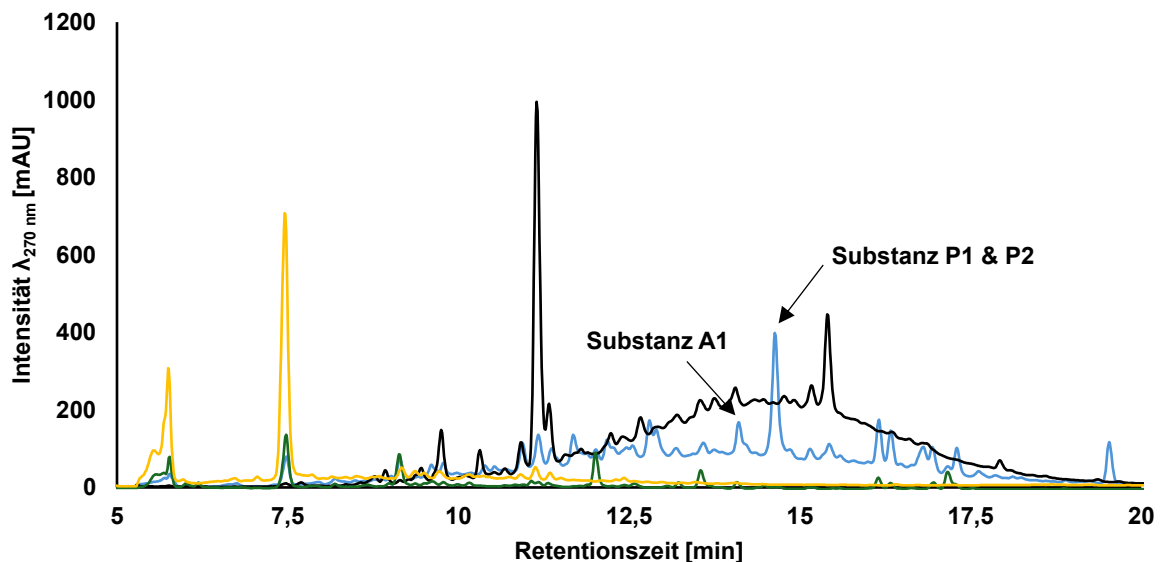


Abbildung 102: HPLC-Chromatogramm des Rohextraktes von *Pleurotus ostreatus* nach 14-tägiger Kultivierung in Minimalmedium mit Kraftlignin (blau) im Vergleich zu den Kontrollen. Abgebildet sind die Kontrollen Minimalmedium (gelb), Minimalmedium mit Kraftlignin (schwarz) sowie *P. ostreatus* kultiviert in Minimalmedium (grün). Detektiert wurden die Substanzen P1 und P2 mit einer Retentionszeit von 14,6 Minuten sowie die Substanz A1 mit 14,1 Minuten. Aufgenommen bei einer Wellenlänge von 270 nm.

6.3 Fermentations-Monitoring von *Coniolariaella hispanica*

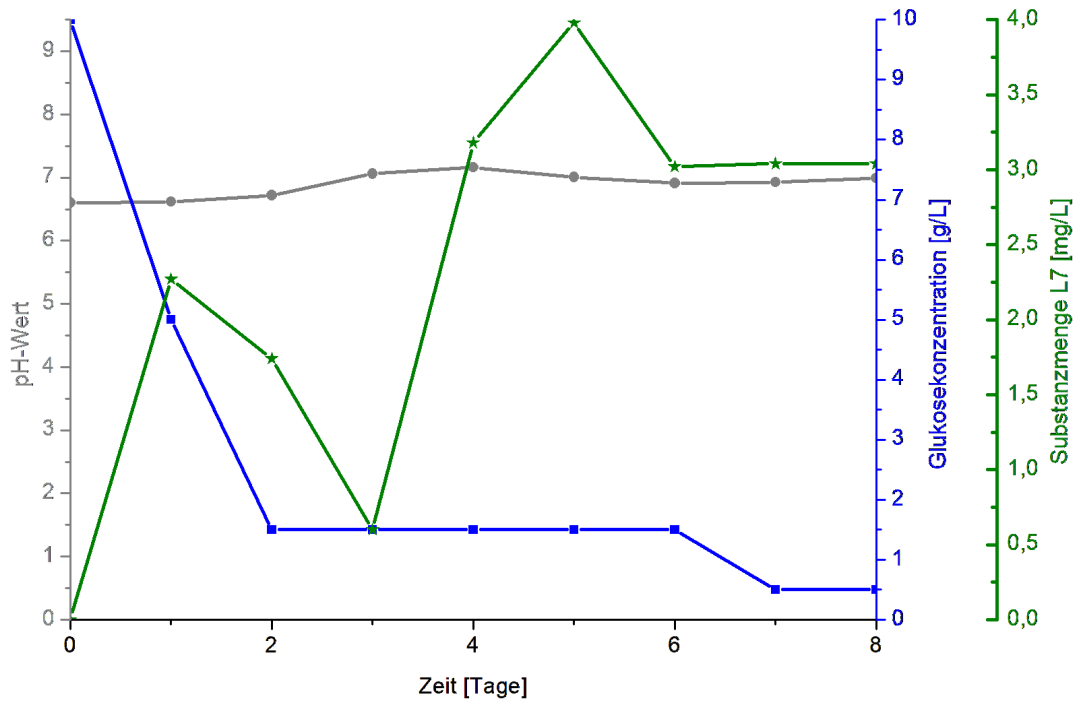


Abbildung 103: Fermentationsverlauf von *Coniolariaella hispanica* in Minimalmedium mit Magnesium-Lignosulfonat über einen Zeitraum von 8 Tagen im 20 L-Maßstab. Abgebildet sind die pH-Werte (grau), die Glukosekonzentration in g/L (blau) und die Substanzmenge von L7 (grün) in mg/L. Enzymaktivität konnte während der Fermentation nicht gemessen werden. Erstellt mit Origin 7.5.

6.4 NMR-Spektren der isolierten Reinsubstanzen

Abgebildet sind die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der in dieser Arbeit isolierten Reinsubstanzen nach Kultivierung der verschiedenen Pilzstämme mit lignolytischem Industrieabfall (Magnesium-Lignosulfonat und Kraftlignin).

6.4.1 NMR-Spektren der Reinsubstanzen P1 und P2 von *Agrocybe pediades*

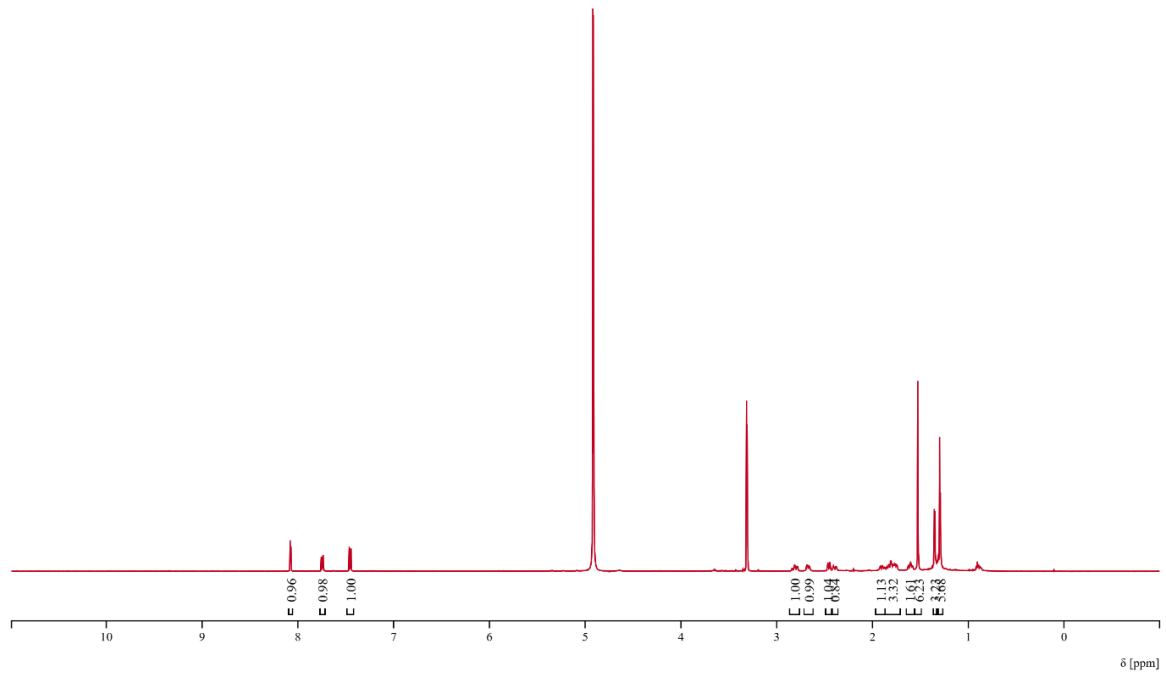


Abbildung 104: ^1H -NMR-Spektrum von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1).

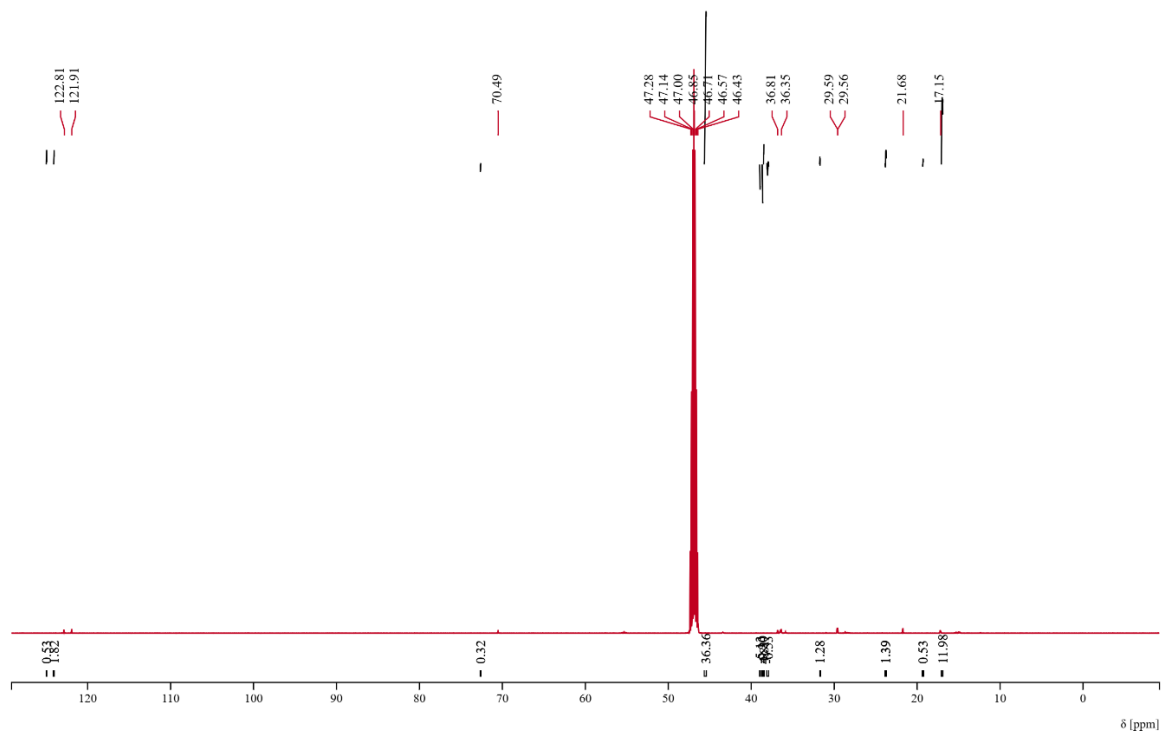


Abbildung 105: ^{13}C -NMR-Spektrum von 15-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P1).

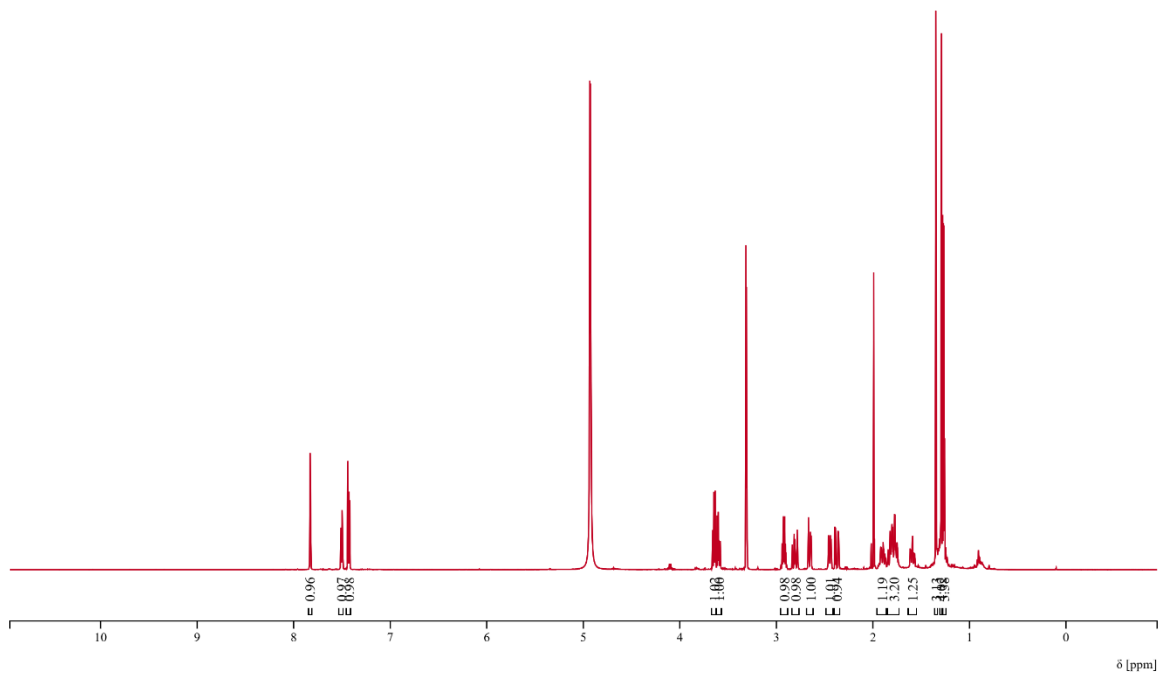


Abbildung 106: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2).

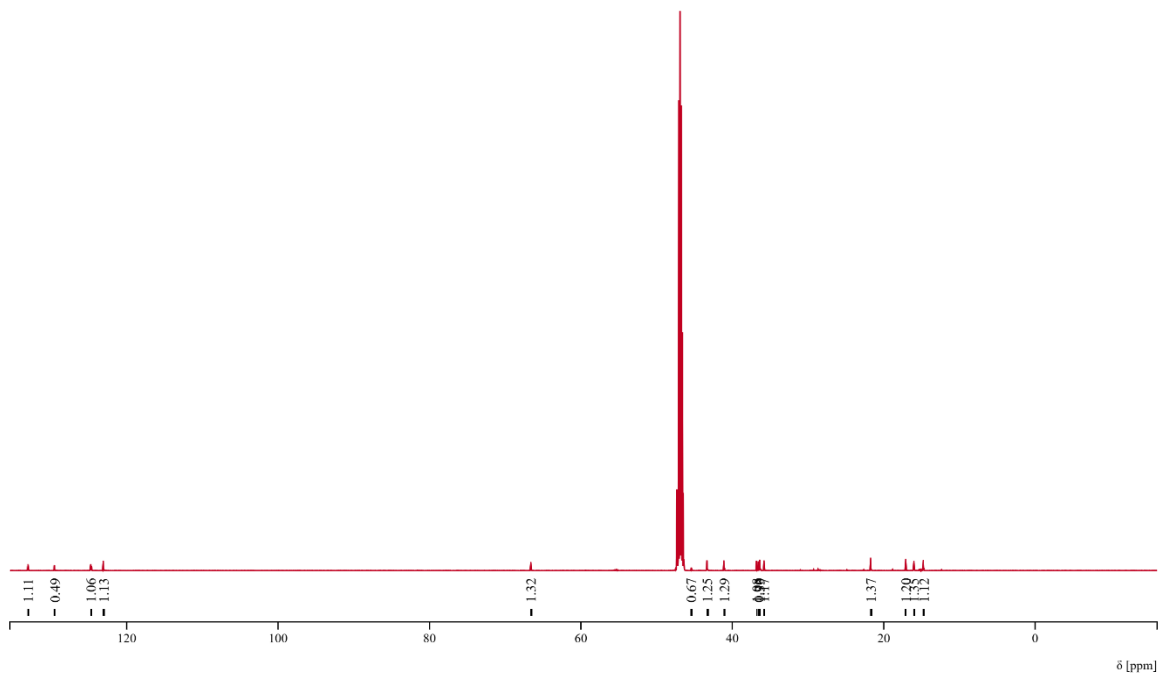


Abbildung 107: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 16-hydroxy-7-oxo-Dehydroabietinsäure (P2).

6.4.2 NMR-Spektren der Reinsubstanz X1 von *Alternaria astroemeriae*

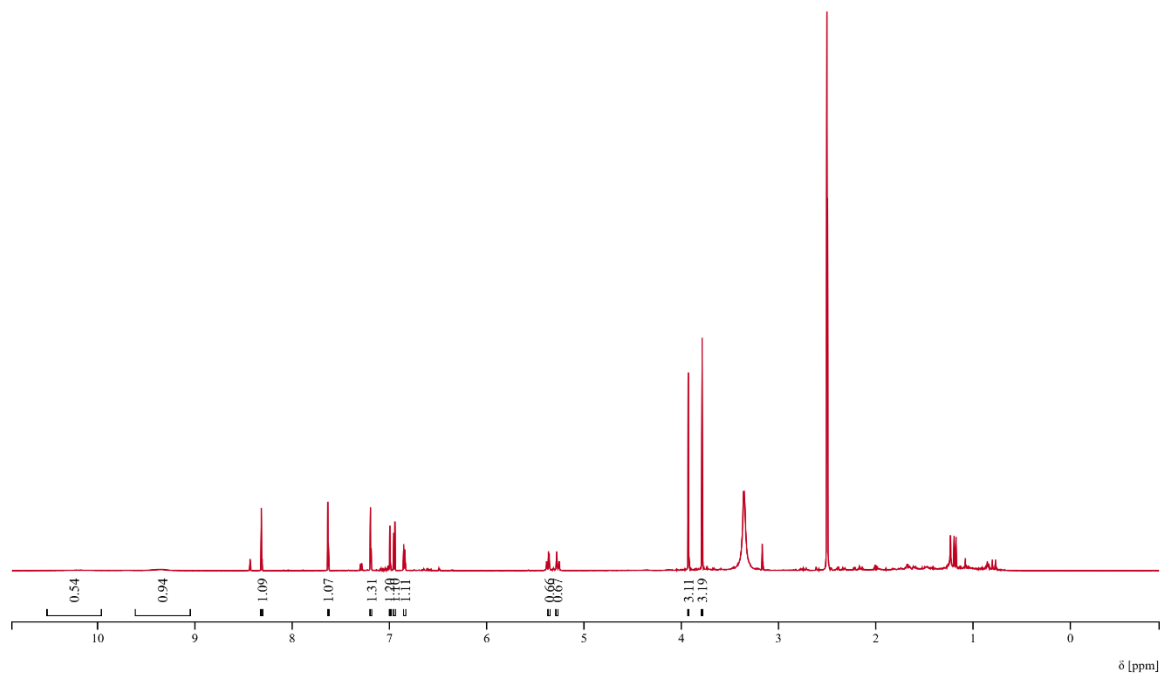


Abbildung 108: ¹H-NMR-Spektrum von Detetrahydroconidendrin (X1).

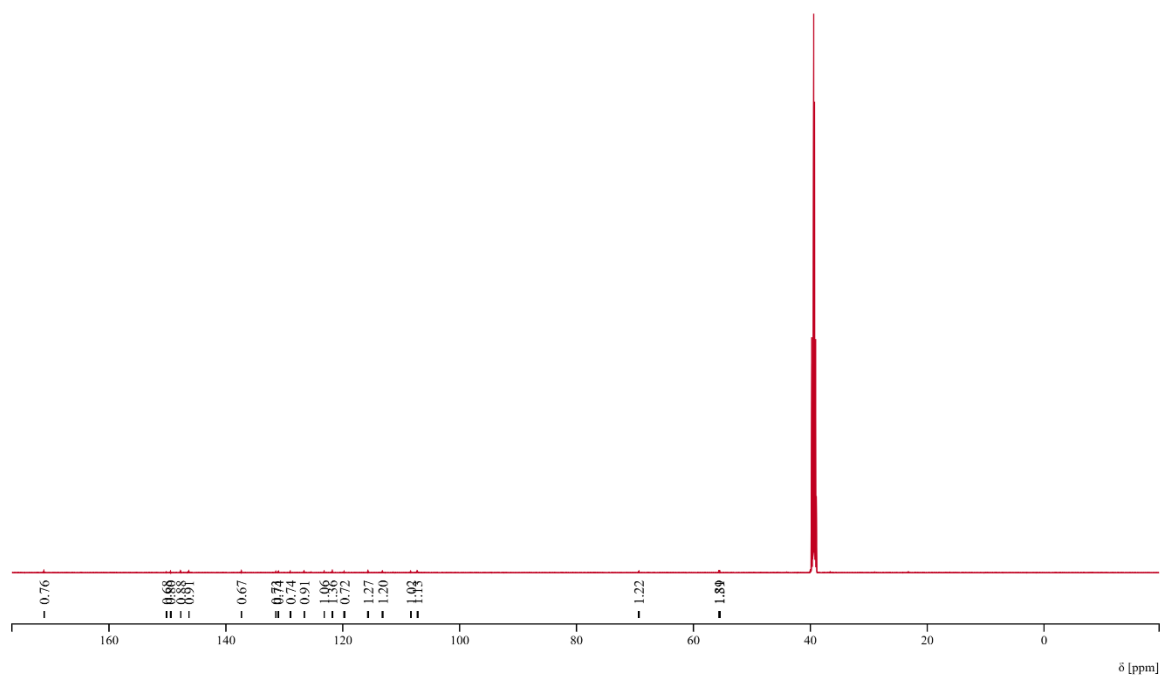


Abbildung 109: ¹³C-NMR-Spektrum von Detetrahydroconidendrin (X1).

6.4.3 NMR-Spektren der Reinsubstanzen L2, L7-1 und L8 von *Coniolaria hispanica*

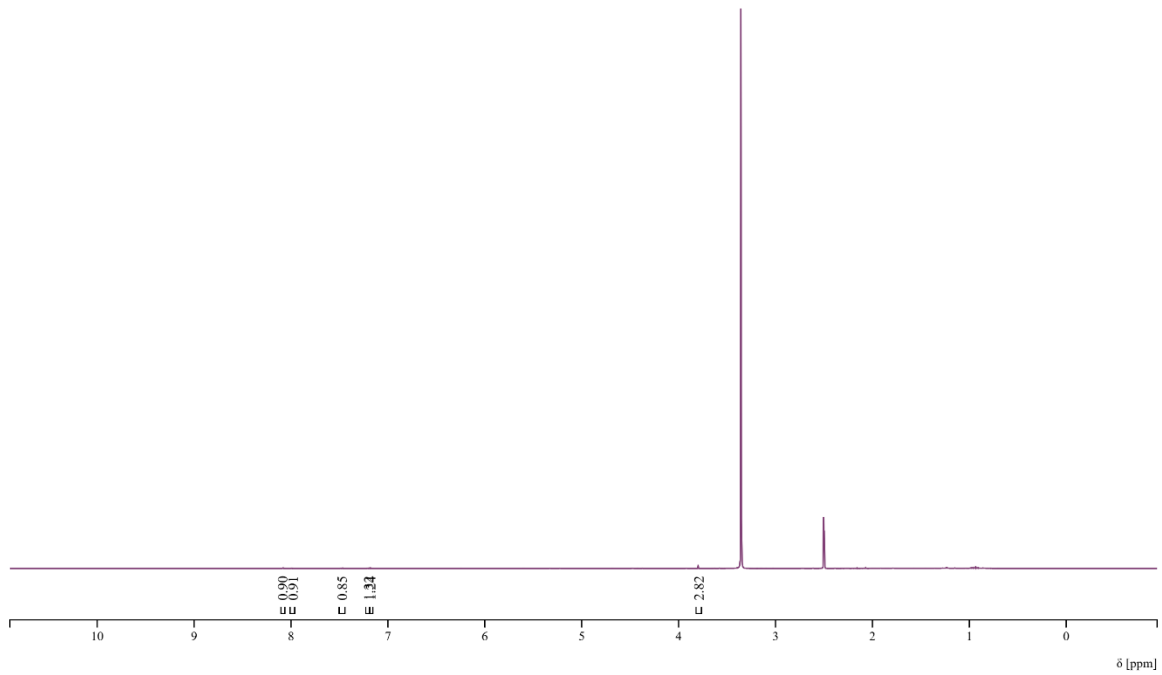


Abbildung 110: ¹H-NMR-Spektrum von Methylindol-3-Carboxylat (L2).

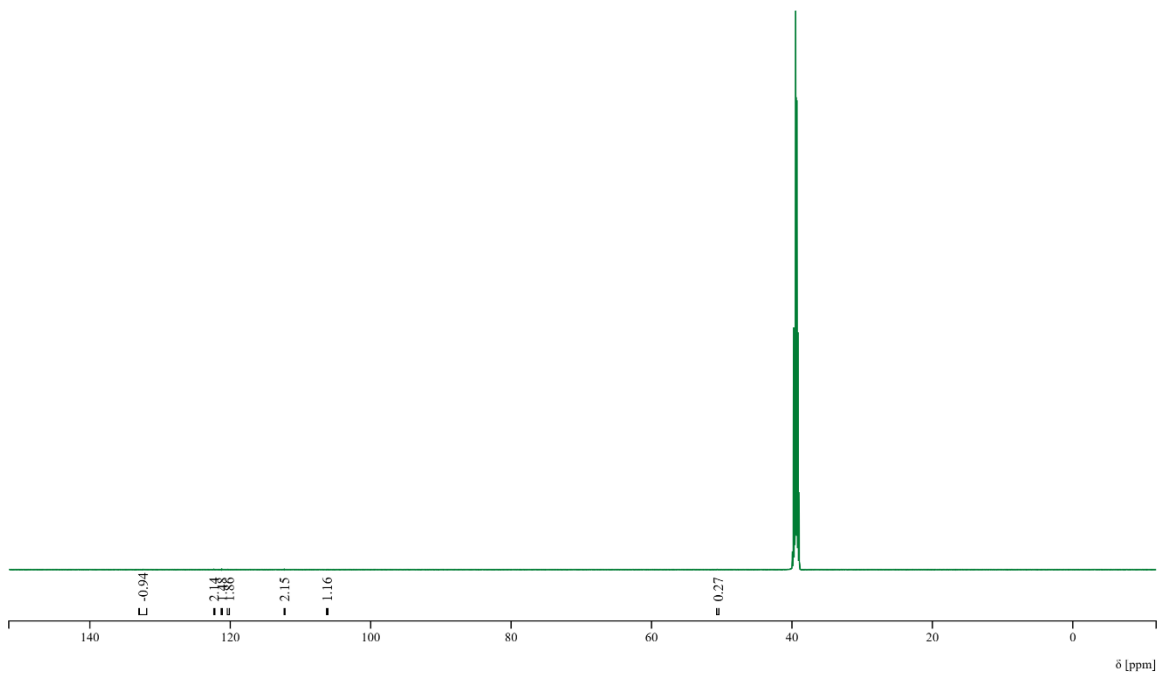


Abbildung 111: ¹³C-NMR-Spektrum von Methylindol-3-Carboxylat (L2).

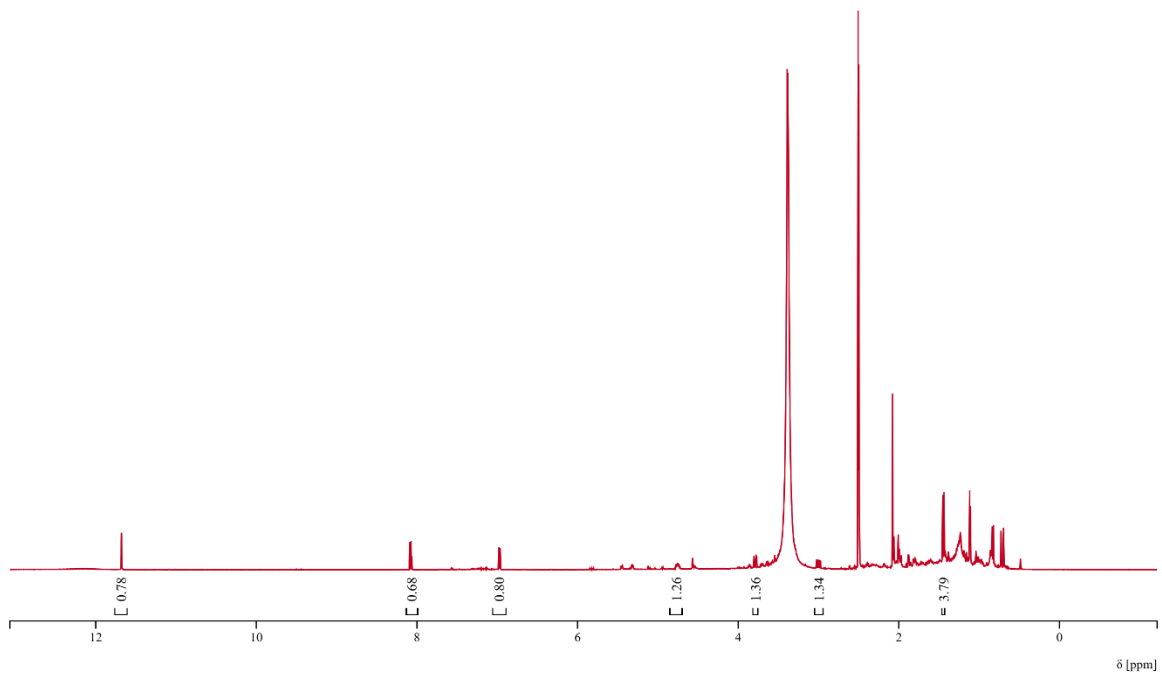


Abbildung 112: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 5-Carboxymellein (L7-1).

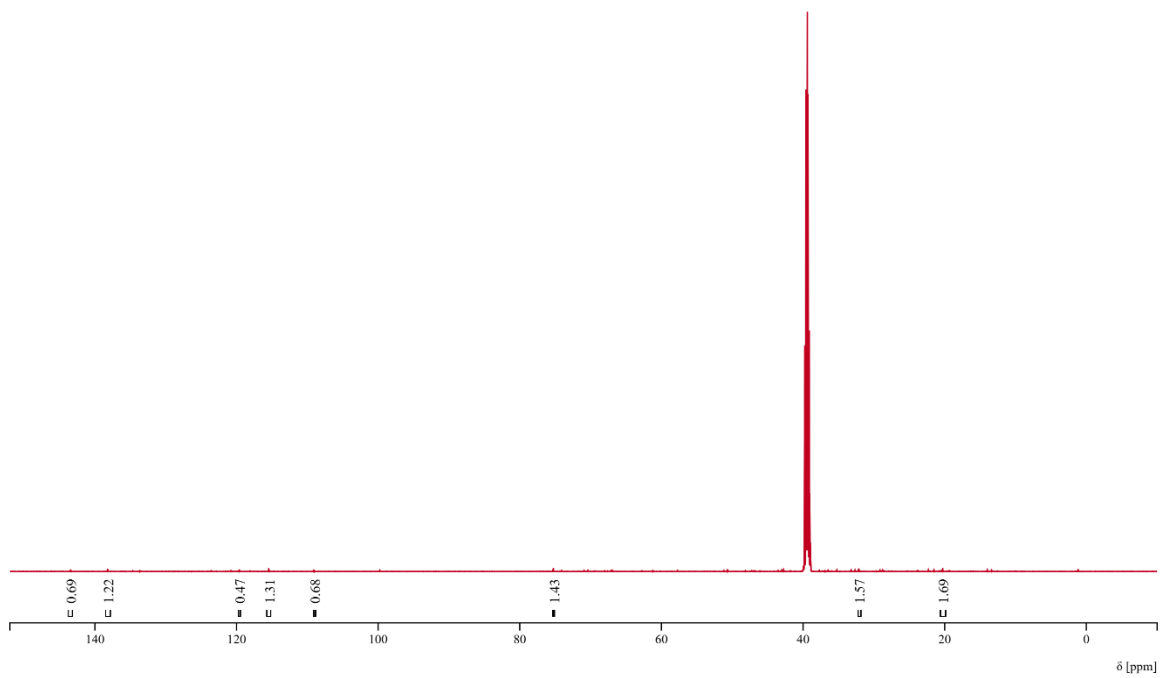


Abbildung 113: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von 5-Carboxymellein (L7-1).

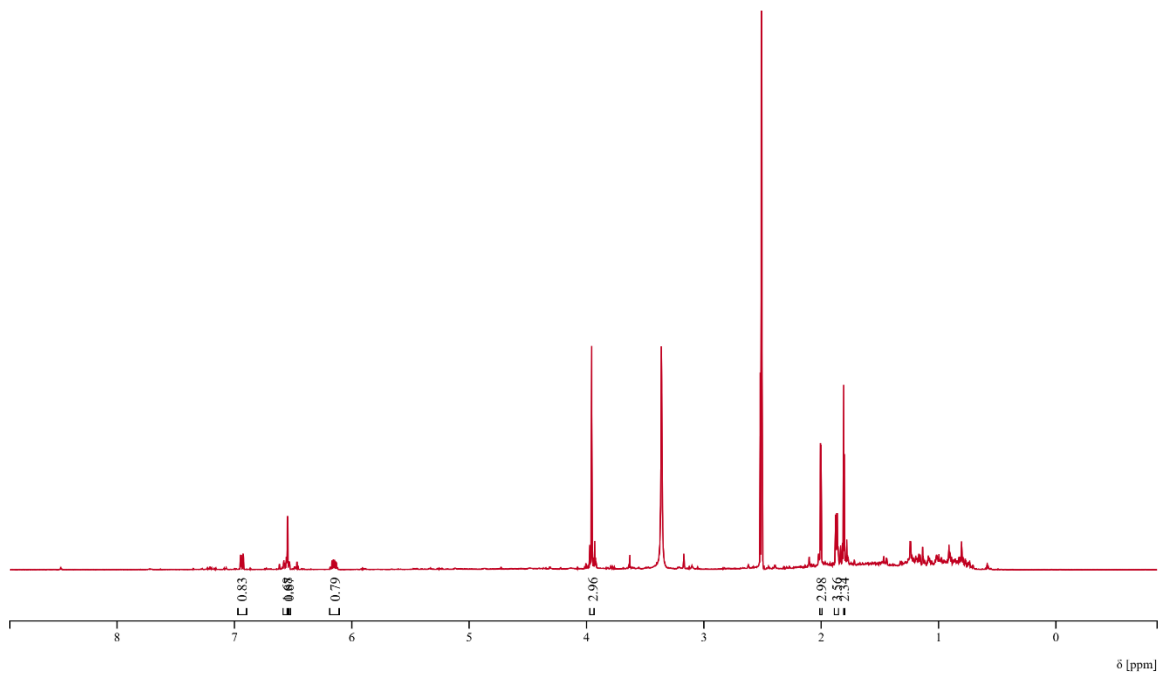


Abbildung 114: ¹H-NMR-Spektrum von 8,9-Dehydroxylaron (L8).

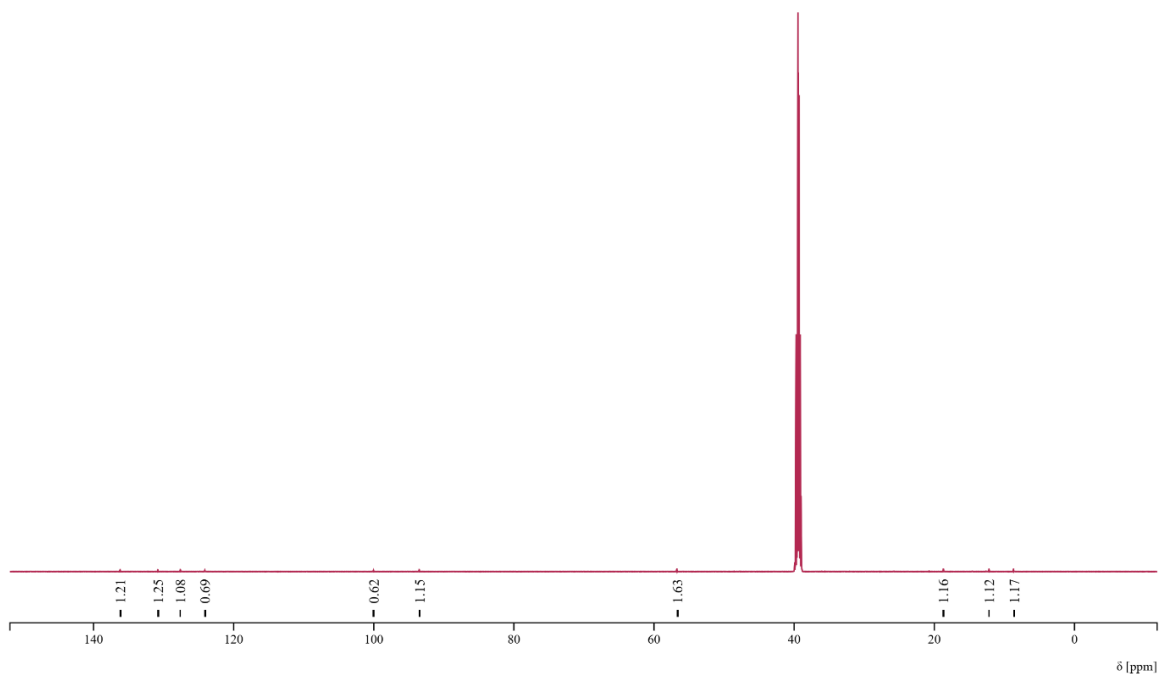


Abbildung 115: ¹³C-NMR-Spektrum von 8,9-Dehydroxylaron (L8).

6.4.4 NMR-Spektren der Reinsubstanz L4 von *Chaetomium leptoderma*

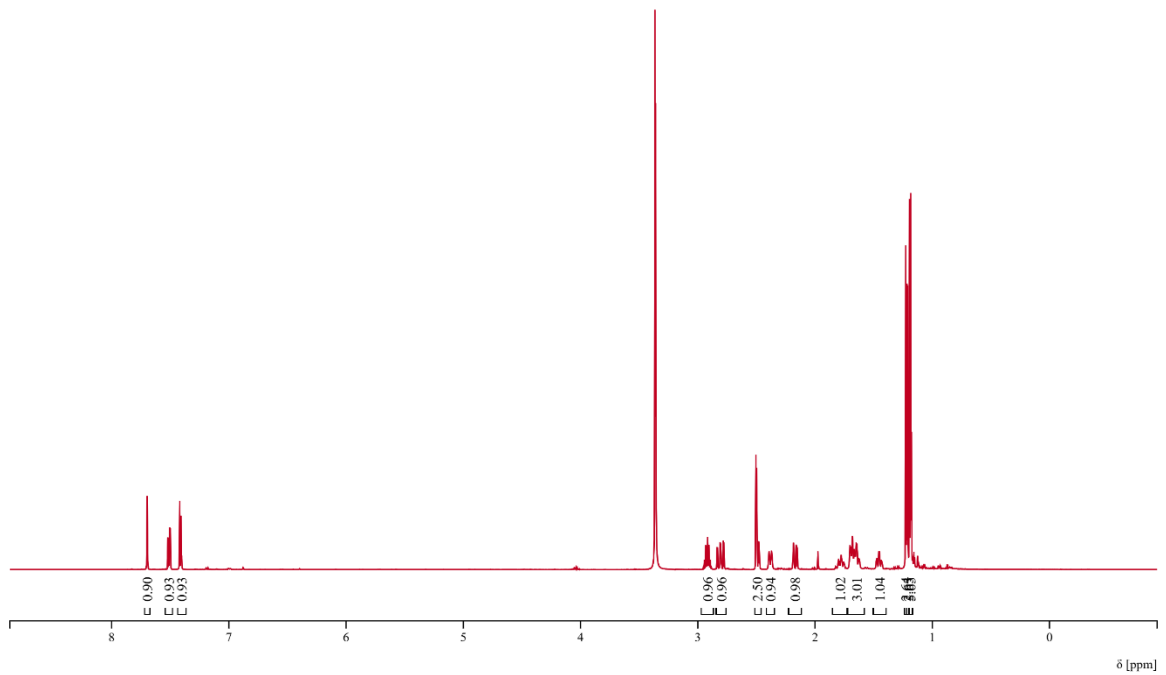


Abbildung 116: ¹H-NMR-Spektrum von 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4).

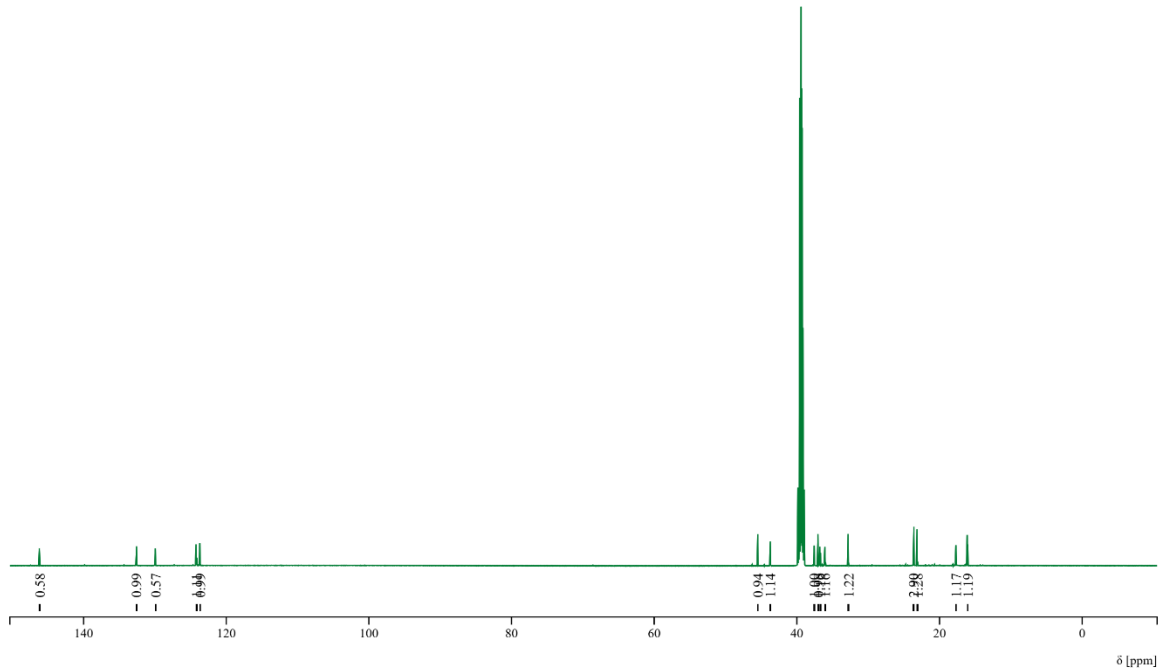


Abbildung 117: ¹³C-NMR-Spektrum von 7-oxo-Dehydroabietinsäure (L4).

6.4.5 NMR-Spektren der Reinsubstanz A1 von *Pleurotus pulmonarius*

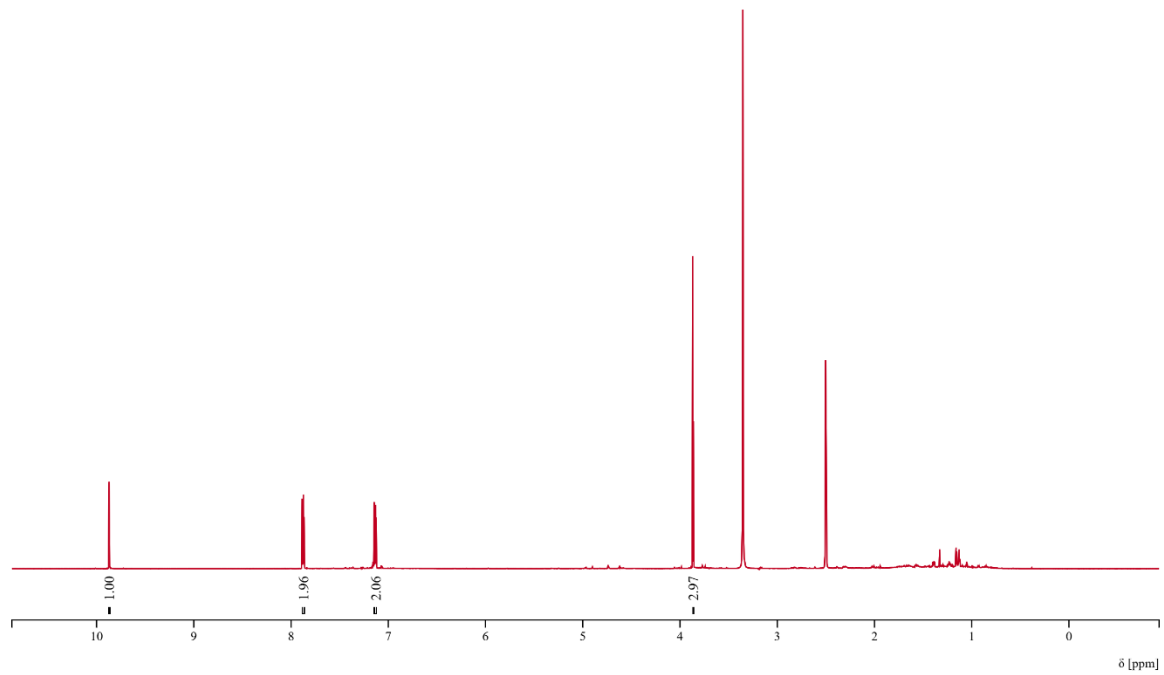


Abbildung 118: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Anisaldehyd (A1).

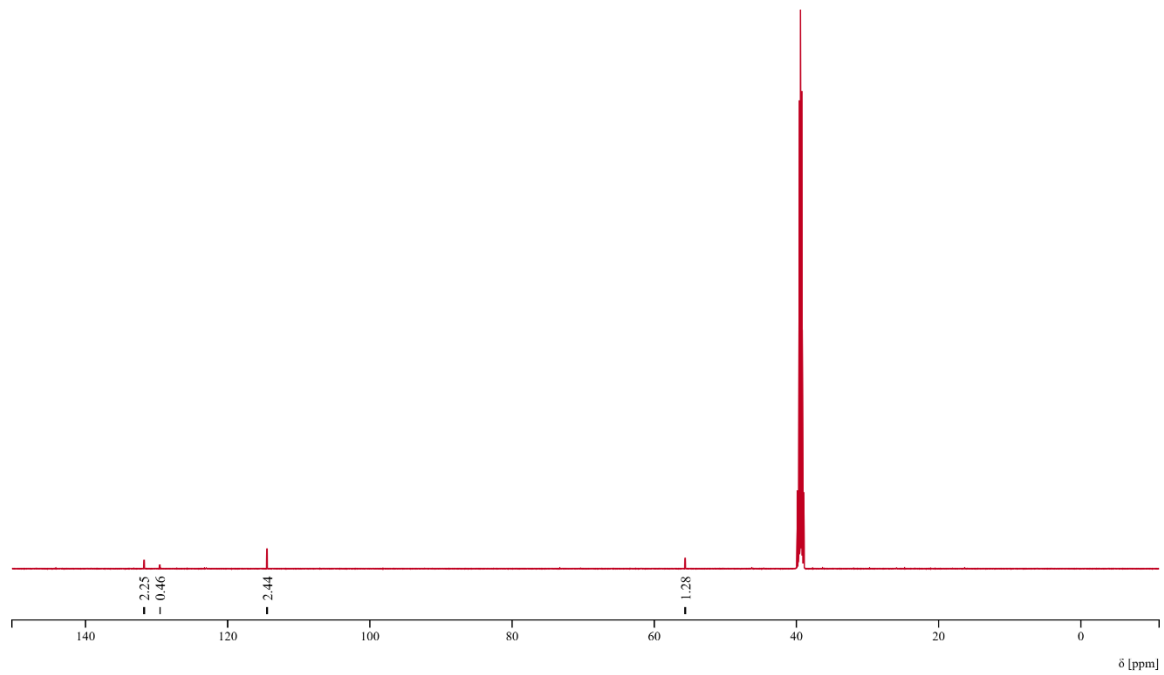


Abbildung 119: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von Anisaldehyd (A1).

6.5 Auswertung Wachstums- und Biofilm-Assay

6.5.1 Wachstumskurven der Stämme *Pseudomonas aeruginosa* PA01 und PA14 nach Inkubation mit verschiedenen Reinsubstanzen

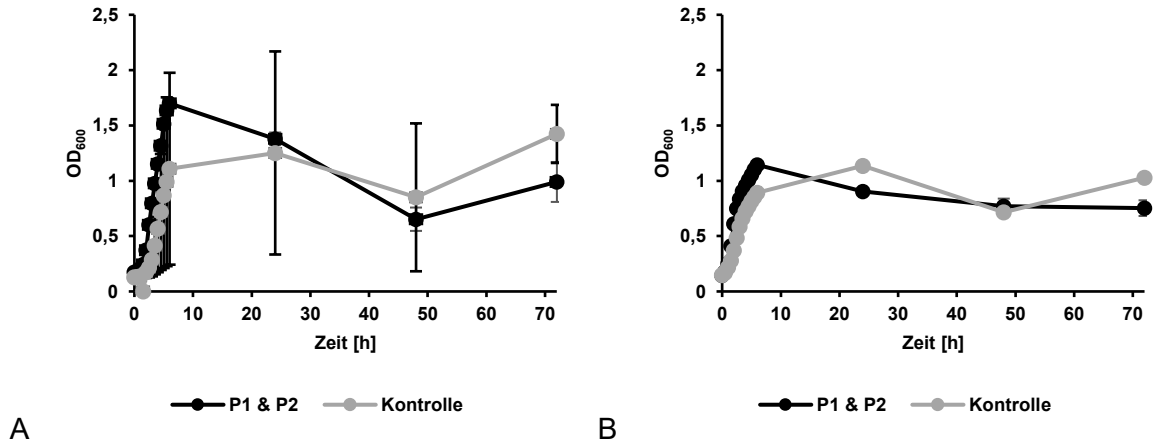


Abbildung 120: Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit den Reinsubstanzen P1 und P2 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Abgebildet sind die Absorptionswerte bei 600 nm über 72 Stunden [h]. Als Wachstumskontrolle wurde *P. aeruginosa* in TSB-Medium mitgeführt. Durchgeführt in Triplikaten, abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (schwarze Balken).

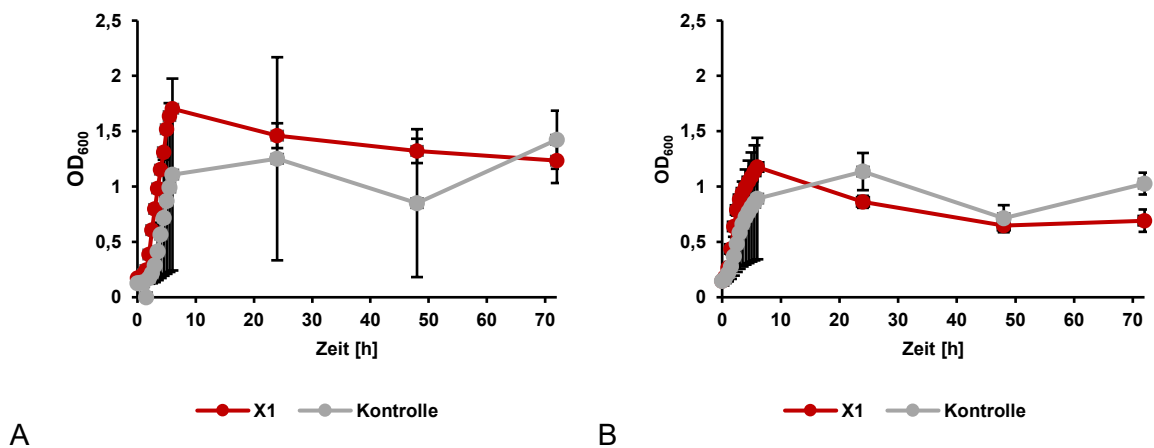


Abbildung 121: Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz X1 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Abgebildet sind die Absorptionswerte bei 600 nm über 72 Stunden [h]. Als Wachstumskontrolle wurde *P. aeruginosa* in TSB-Medium mitgeführt. Durchgeführt in Triplikaten, abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (schwarze Balken).

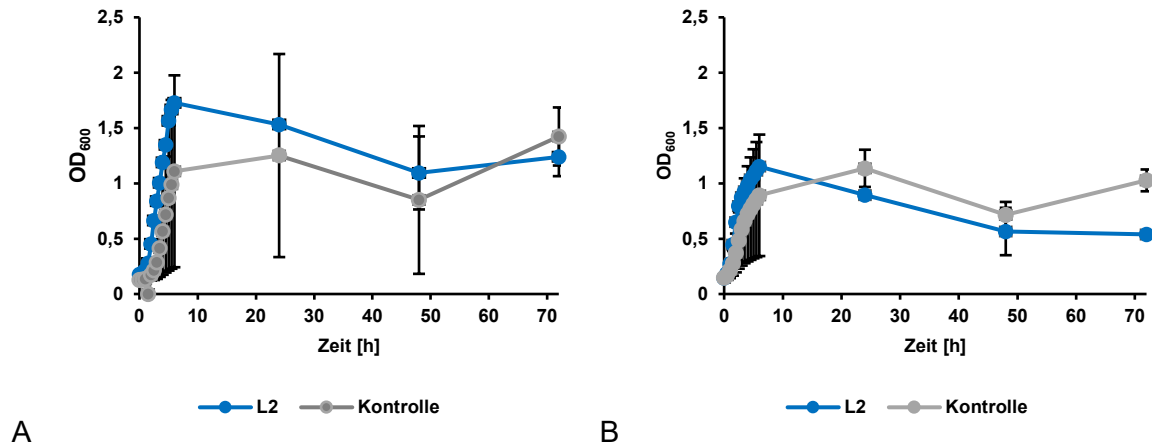


Abbildung 122: Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz L2 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Abgebildet sind die Absorptionswerte bei 600 nm über 72 Stunden [h]. Als Wachstumskontrolle wurde *P. aeruginosa* in TSB-Medium mitgeführt. Durchgeführt in Triplikaten, abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (schwarze Balken).

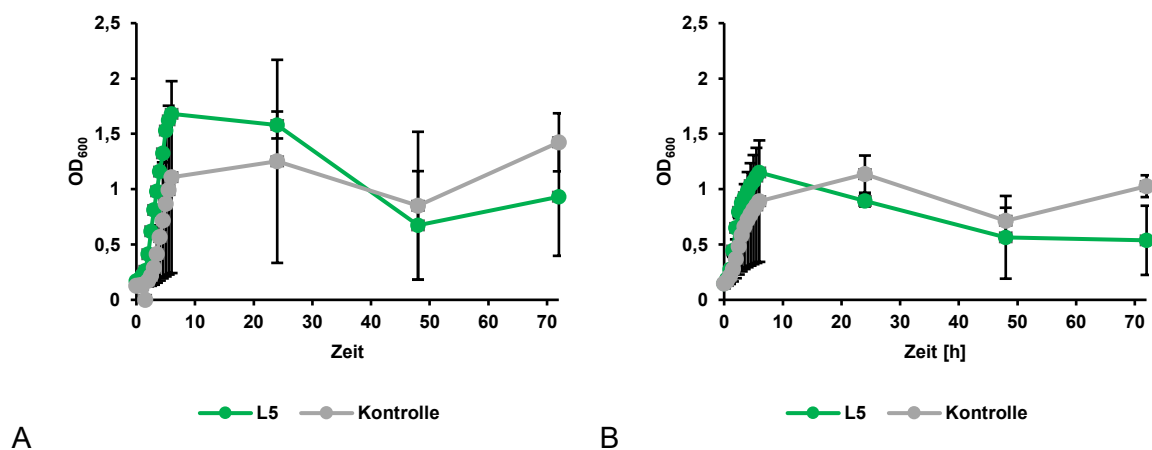


Abbildung 123: Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz L5 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Abgebildet sind die Absorptionswerte bei 600 nm über 72 Stunden [h]. Als Wachstumskontrolle wurde *P. aeruginosa* in TSB-Medium mitgeführt. Durchgeführt in Triplikaten, abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (schwarze Balken).

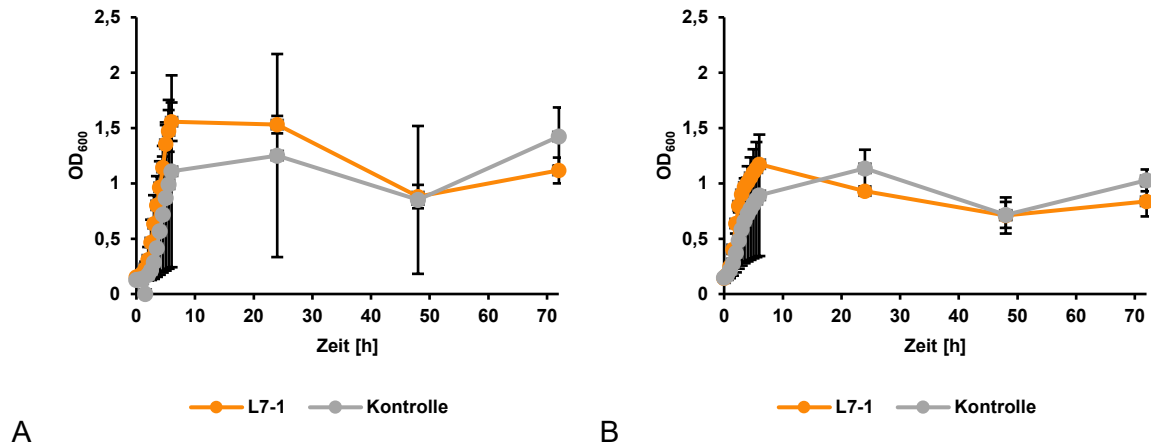


Abbildung 124: Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz L7-1 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Abgebildet sind die Absorptionswerte bei 600 nm über 72 Stunden [h]. Als Wachstumskontrolle wurde *P. aeruginosa* in TSB-Medium mitgeführt. Durchgeführt in Triplikaten, abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (schwarze Balken).

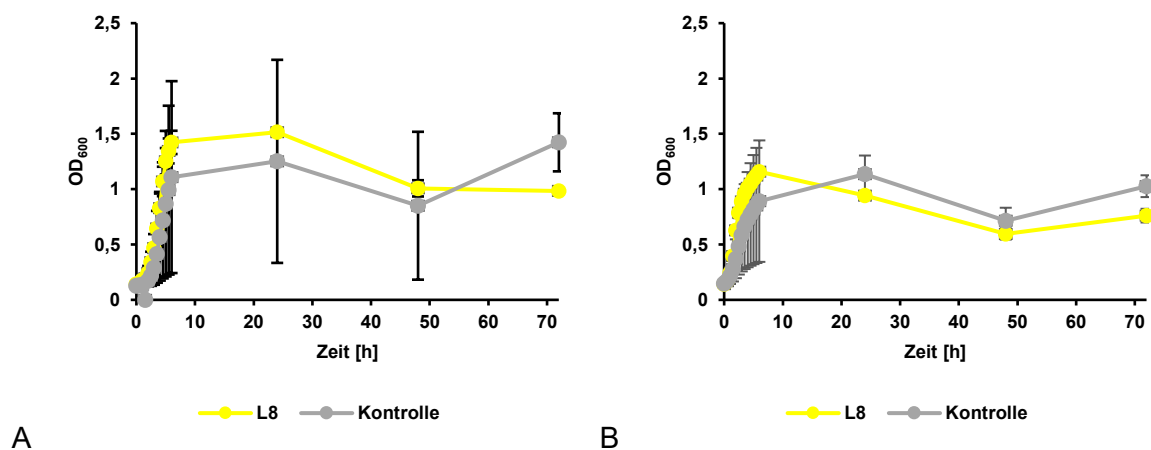


Abbildung 125: Wachstumskurven von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 (A) und *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 (B) nach Inkubation mit der Reinsubstanz L8 über einen Zeitraum von 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle. Abgebildet sind die Absorptionswerte bei 600 nm über 72 Stunden [h]. Als Wachstumskontrolle wurde *P. aeruginosa* in TSB-Medium mitgeführt. Durchgeführt in Triplikaten, abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (schwarze Balken).

6.5.2 Biofilm-Assay der Stämme *Pseudomonas aeruginosa* PA01 und PA14 nach Inkubation mit verschiedenen Reinsubstanzen

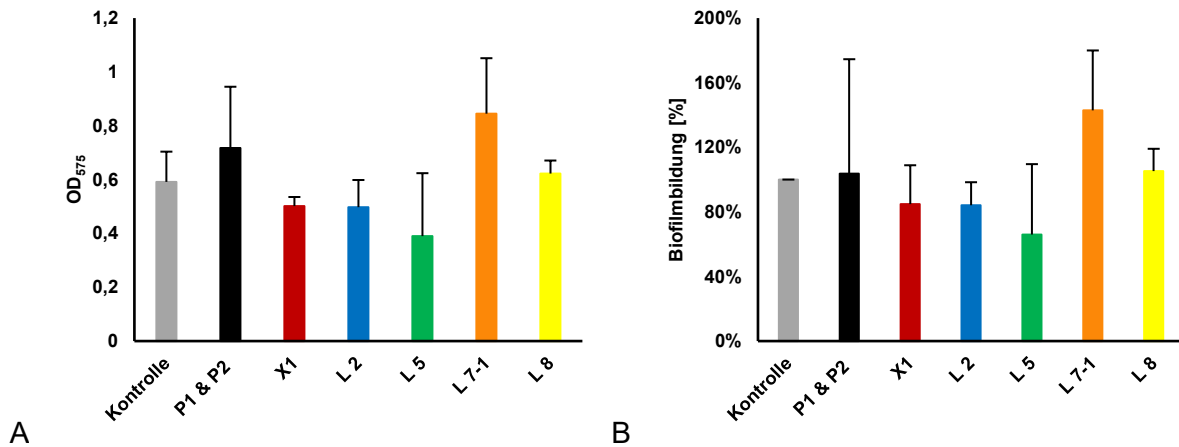


Abbildung 126: Auswertung des Biofilm-Assays von *Pseudomonas aeruginosa* PA01 DSM 19880 nach 72-stündiger Inkubation mit den Reinsubstanzen P1 & P2, X1, L2, L5, L7-1 und L8. Abgebildet sind die Absorptionswerte bei 575 nm (A) sowie die Biofilmbildung in Prozent [%] (B) im Vergleich zur Wachstumskontrolle (*P. aeruginosa* PA01 kultiviert in TSB-Medium). Durchgeführt in Triplikaten von denen der Mittelwert und die Standardabweichung (schwarze Balken) berechnet wurden.

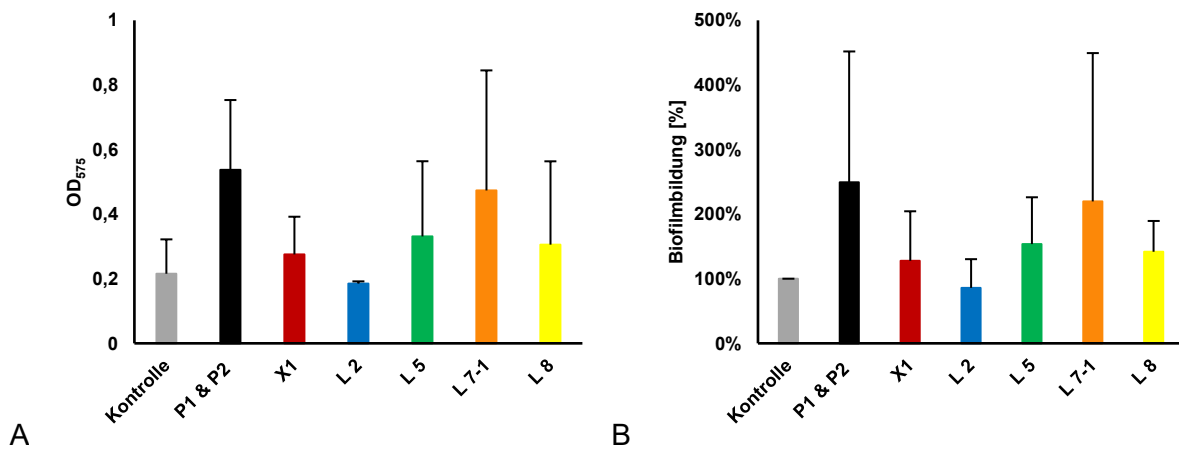


Abbildung 127: Auswertung des Biofilm-Assays von *Pseudomonas aeruginosa* PA14 DSM 19982 nach 72-stündiger Inkubation mit den Reinsubstanzen P1 & P2, X1, L2, L5, L7-1 und L8. Abgebildet sind die Absorptionswerte bei 575 nm (A) sowie die Biofilmbildung in Prozent [%] (B) im Vergleich zur Wachstumskontrolle (*P. aeruginosa* PA14 kultiviert in TSB-Medium). Durchgeführt in Triplikaten von denen der Mittelwert und die Standardabweichung (schwarze Balken) berechnet wurden.