

Aus dem Institut für Lebensmittelchemie und
Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Biotransformationen von Lignosulfonaten und Herbiziden durch Basidiomyceten

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Adrian Imami

geboren am 10. August 1986 in Würzburg

2015

Dekan: Prof. Dr. V. Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Czermak

Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie

Technische Hochschule Mittelhessen Gießen

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum, Ort

Unterschrift

Danksagung

Das Anfertigen der Arbeit erfolgte zwischen Juli 2012 und Januar 2016 am Institut für Lebensmittelchemie- und -biotechnologie. Die Anleitung übernahm mein Doktorvater Prof. Holger Zorn. An dieser Stelle möchte ich mich hierfür recht herzlich bei Ihm bedanken. Danke für die spannenden Themen, die konstruktiven Gespräche und das nötige Vertrauen in mein Schaffen. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das sehr gute Arbeitsklima machten einen erfolgreichen Abschluss erst möglich.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Peter Czermak für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Bereitstellung des Bioreaktors im Zuge meiner Arbeit. Dank gilt zudem Prof. Richard Göttlich und Prof. Siegfried Schindler für den Beitritt in die Prüfungskommission.

Ich danke allen Mitarbeiter/innen am LCB für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und den kollegialen, hilfsbereiten Umgang miteinander. Es war stets eine Freude auf die Arbeit zu kommen! Bei der Unterstützung meiner Arbeit hervorzuheben sind vor allem Herr Prof. Martin Rühl für seine Hilfestellung und die konstruktive Kritik und Falk Amelung für die umfangreiche Hilfe bei Fragen zu Beginn dieser Arbeit. Ich möchte hierbei auch Ilya Galperin und Marcus Schultze für Ihre Unterstützung nicht unerwähnt lassen. Mein weiterer Dank gilt den fleißigen Korrektoren meiner Arbeit Astrid, Marco und Marina. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Grieb und Frau Dr. Isberner von der THM für die Betreuung rund um finanzielle und organisatorische Belange. Dank gilt in diesem Zuge auch dem kooperativen Promotionskolleg „Bioressourcen und Biotechnologie“ der THM und JLU Gießen für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und besonders meiner Frau Melvy für die pausenlose Unterstützung während dieser Arbeit. Danke, dass Ihr stets zu mir gestanden habt (besonders wenn es mal nicht so gut lief) und immer an mich geglaubt habt. Ohne Euch wäre ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Veröffentlichungen

Publikationen

Imami A, Riemer S, Schulze M, Amelung F, Gorshkov V, Rühl M, Ammenn J, Zorn H (2015) Depolymerization of lignosulfonates by submerged cultures of the basidiomycete *Irpex consors* and cloning of a putative versatile peroxidase. *Enzyme Microb Technol* 81:8–15.

Imami A, Herold N, Spielmeyer A, Hausmann H, Dötzer R, Behnken HN, Leonhardt S, Weil A, Schoof S, Zorn H (2015) Biotransformation of the herbicide Dimethenamid-P by the basidiomycete *Irpex consors*. In Vorbereitung.

Tagungsbeiträge

Imami A, Riemer S, Zorn H (2014) Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten zur Optimierung des Lignocelluloseaufschlusses. Abschlusstreffen des vom BMEL geförderten Projektes „Lignocellulose-Bioraffinerie Phase II“, Leuna, 23 – 24. Januar 2014.

Imami A, Riemer S, Schulze, Rühl M, Zorn H (2014) Biotransformation of lignosulfonates by basidiomycetes. 7th International Congress on Biocatalysis (BioCat), Hamburg, 31. August – 4. September 2014.

Zusammenfassung

Auf Grundlage von Vorarbeiten am LCB konnte gezeigt werden, dass der Basidiomycet *Irpex consors* in der Lage ist, das durchschnittliche Molekulargewicht von Lignosulfonaten aus Sulfitablaugen deutlich zu reduzieren. Weiterführende Untersuchungen wurden zum Einfluss der Konzentration der Lignosulfonate auf die Depolymerisierung durchgeführt. Ferner gelang es, eine Korrelation zwischen der Depolymerisierung der Lignosulfonate und den sekretierten ligninolytischen Enzymen aus *I. consors* aufzuzeigen. Die Reinigung einer versatilen Peroxidase aus Kulturüberständen von *I. consors* verlief erfolgreich. Peptidfragmente des gereinigten Enzyms konnten mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) sequenziert und anhand von Datenbankabgleich identifiziert werden. Die isolierte versatile Peroxidase aus *I. consors* wurde kloniert und die codierende cDNA-Sequenz charakterisiert.

Zur Steigerung der Anzahl der phenolischen Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten wurde ein Screening mit 20 Basidiomyceten durchgeführt. Mit den im Screening identifizierten Braunfäulepilzen *Antrodia serialis* und *Gloeophyllum trabeum* gelang eine deutliche Erhöhung der Konzentration an phenolischen Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate. Die Steigerung konnte mit Hilfe der Extinktionszunahme in den UV-Differenzspektren eindeutig nachgewiesen werden. Weitere Versuche zeigten, dass *G. trabeum* bei höheren Konzentrationen an Lignosulfonaten ähnliche Modifikationen bewirkte. Schließlich konnte die Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate durch *G. trabeum* im größeren Maßstab in einem Rührreaktor (15 L) reproduziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden 29 Basidiomyceten zur Erzeugung von Bodenmetaboliten des Herbizids Dimethenamid-P (DMTA-P) in Oberflächen- und Flüssigkulturen gescreent. Der Basidiomycet *I. consors* war in der Lage, 70% des eingesetzten DMTA-P ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) in Flüssigkulturen in einem synthetischen Minimalmedium innerhalb von 6 Tagen umzusetzen. Bei der Umsetzung des DMTA-P konnten 9 Transformationsprodukte mittels LC-MS identifiziert werden. Ferner wurden die vier Hauptmetabolite aus dem Kulturüberstand isoliert und deren Struktur mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie und

Kernspinresonanz-Spektroskopie eindeutig aufgeklärt werden. Der Metabolit **M1** wurde als S-Oxid des DMTA-P identifiziert, bei Metabolit **M2** war ein Methyl-Substituent des DMTA-P monohydroxyliert. Die beiden Metaboliten **M3A** und **M3B** waren chemisch identisch, obwohl sie chromatographisch vollständig getrennt werden konnten. Es handelte sich bei den Metaboliten um Thiolactone, die vermutlich aus einer initialen Hydroxylierung des Thiophenrings hervorgingen. Zudem wurde ein Screening zur Umsetzung des DMTA-P-Derivates M27 mit einem weiten Spektrum an Basidiomyceten durchgeführt. Durch gleichzeitige Supplementierung des Kulturmediums mit M27 und Weizenstroh wurde ein vollständiger Abbau des Herbizid-Derivates durch *I. consors* und *G. trabeum* erzielt. Nach Inklusion des Strohs und des Myzels von *I. consors* in einer Natrium-Alginat Matrix wurde der chlorierte Metabolit **M27Cl** mittels LC-MS und NMR-Spektroskopie eindeutig identifiziert.

Abstract

Based on previous studies, the basidiomycete *Irpex consors* was shown to reduce the average molecular weight of lignosulfonates from spent sulfite liquors significantly in submerged cultures. Further studies were carried out to examine the influence of the concentration of the lignosulfonates on the depolymerization. A strong correlation between the depolymerization of the lignosulfonates and the responsible secreted ligninolytic enzymes of *I. consors* has been shown. A versatile peroxidase was purified from the culture supernatants of *I. consors*. The purified enzyme was subjected to LC-MS/MS analyses, and the obtained peptide fragments were compared to databases. By means of these data, the cDNA encoding the isolated versatile peroxidase was cloned in various steps and characterized.

A second screening including 20 basidiomycetes was carried out to increase the number of phenolic OH-groups of the lignosulfonates. The basidiomycetes *Antrodia serialis* and *Gloeophyllum trabeum* significantly raised the content of phenolic OH-groups of the lignosulfonates as indicated by UV-difference-spectroscopy. The increase of the phenolic OH-groups of the lignosulfonates by *G. trabeum* was reproduced in an upscaling experiment using a stirred-tank bioreactor (15 L).

In the second part of this work, twenty-nine basidiomycetes were screened in surface and liquid cultures for their capability to biotransform the chloroacetamide herbicide Dimethenamid-P (DMTA-P). The basidiomycete *I. consors* converted 70% of the herbicide (0.5 g L^{-1} DMTA-P) in liquid cultures within 6 days, applying a synthetic minimal medium. Nine transformation products of DMTA-P were identified by liquid chromatography–mass spectrometry (MS) analysis of the culture supernatants. The four main metabolites were isolated and subjected to gas chromatography–MS analysis and nuclear magnetic resonance–spectroscopy. The analyses revealed that the thiophene ring was oxidized at three different positions. Metabolite **M1** was identified as the S-oxide which was isolated and comparatively stable at room temperature. In metabolite **M2**, the methyl substituent of the thiophene ring was monohydroxylated. The two metabolites **M3A** and **M3B** were chemically identical, although being fully separated by HPLC.

Here, oxidation of the aromatic proton resulted in tautomerization and formation of the corresponding thiolactone.

Moreover, a screening with a broad spectrum of basidiomycetes was conducted for the biotransformation of the DMTA-P derivative M27. By simultaneous supplementation of the minimal medium with M27 and wheat straw, the herbicide derivative was fully degraded by the basidiomycetes *I. consors* and *G. trabeum*. An encapsulation of the wheat straw and the mycelia of *I. consors* in a sodium alginate matrix resulted in a chlorinated metabolite **M27Cl** which was characterized by LC–MS/MS analyses and NMR-spectroscopy.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABSTRACT.....	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	XVII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Lignosulfonate: Herstellung und Anwendungen	1
1.2 Chloracetamide und deren Verbleib in der Umwelt	3
1.3 Basidiomyceten: zwischen Industrie und Umwelt.....	5
1.4 Zielsetzungen	8
2 ERGEBNISSE.....	9
2.1 Depolymerisierung von Lignosulfonaten durch <i>Irpex consors</i>	9
2.1.1 Gel-Permeations-Chromatographie zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung	9
2.1.2 Korrelation zwischen extrazellulären Enzymaktivitäten und der Molekulargewichtsverteilung	11
2.1.3 Einfluss der Lignosulfonat-Konzentration auf die Molekulargewichtsverteilung	13
2.2 Modifizierung von Lignosulfonaten zur Erhöhung des Gehalts an phenolischen Hydroxy-Gruppen	16
2.2.1 Screening von Holzfäulepilzen zur Erhöhung des Gehalts an phenolischen Hydroxy-Gruppen.....	16
2.2.2 Einfluss verschiedener Parameter auf die Flüssigkultivierung von <i>Gloeophyllum trabeum</i>	22
2.2.3 Fermentativer Ansatz zur Herstellung von modifizierten Lignosulfonaten	24

2.3	Isolierung und Klonierung einer putativen versatilen Peroxidase aus <i>Irpex consors</i>	26
2.3.1	Reinigung mittels <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC) und isoelektrischer Fokussierung.....	26
2.3.2	Sequenzierung und Homologievergleich der Peroxidase.....	28
2.3.3	Klonierung einer putativen versatilen Peroxidase aus <i>Irpex consors</i>	30
2.3.3.1	Ableitung der Primer	30
2.3.3.2	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	32
2.3.3.3	Klonierung und Identifizierung der Peroxidase aus <i>Irpex consors</i> ..	34
2.3.3.4	Homologie und phylogenetische Einordnung der putativen versatilen Peroxidase.....	37
2.4	Biotransformation des Herbizides Dimethenamid-P durch Basidiomyceten..	38
2.4.1	Screening von Basidiomyceten zur Umsetzung von Dimethenamid-P... 38	
2.4.2	Biotransformation von Dimethenamid-P in Flüssigkultur.....	42
2.4.3	Identifizierung der Hauptmetabolite von Dimethenamid-P	44
2.4.3.1	Untersuchung der Kulturüberstände mittels LC-MS.....	44
2.4.3.2	Isolierung der Hauptmetabolite mittels präparativer HPLC	45
2.4.3.3	Gaschromatographische Untersuchung der isolierten Metabolite mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC-MS).....	46
2.4.3.4	Strukturaufklärung der Hauptmetabolite	50
2.4.4	Biotransformation von C-13 markiertem Dimethenamid-P	56
2.4.5	Weitere Versuche zur Umsetzung des Dimethenamid-P durch <i>Irpex consors</i>	58
2.5	Biotransformation des Dimethenamid-P-Sulfonsäure-Derivates M27 durch Basidiomyceten.....	59
2.5.1	Weizenstroh induzierter Abbau von M27	59
2.5.2	Umsetzung von M27 durch Alginat-Inklusion von <i>Irpex consors</i> und <i>Gloeophyllum trabeum</i>	61

3 DISKUSSION.....	66
3.1 Methoden zur Modifizierung von Lignosulfonaten	66
3.2 Modifizierung von Lignosulfonaten durch den Weißfäulepilz <i>Irpex consors</i> ..	67
3.2.1 Ligninolytische Enzyme von Weißfäulepilzen.....	67
3.2.2 Reduzierung des Molekulargewichts von Lignosulfonaten durch..... <i>Irpex consors</i>	69
3.3 Modifizierung von Lignosulfonaten durch den Braunfäulepilz	
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	73
3.3.1 Mechanismus der Braunfäule.....	73
3.3.2 Steigerung der phenolischen Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate	75
3.3.3 Fermentativer Ansatz zur Steigerung der phenolischen Hydroxy-Gruppen.....	78
3.4 Isolierung und Klonierung einer putativen versatilen Peroxidase aus	
<i>Irpex consors</i>	79
3.4.1 Enzymisolierung aus dem Kulturüberstand von <i>Irpex consors</i>	79
3.4.2 Molekularbiologische Charakterisierung der putativen versatilen Peroxidase	80
3.5 Biotransformation von Dimethenamid-P durch <i>Irpex consors</i>	85
3.5.1 Biotransformationen von Pestiziden durch Basidiomyceten.....	85
3.5.2 Screening zur Biotransformation von Dimethenamid-P.....	86
3.5.3 Biotransformation von Dimethenamid-P durch <i>Irpex consors</i>	88
3.5.4 Untersuchungen zu den beteiligten Enzymen von <i>Irpex consors</i>	93
3.6 Biotransformation des Dimethenamid-P-Sulfonsäure-Derivates M27 durch <i>Irpex consors</i>	94
3.6.1 Sulfonsäure-Derivate von Chloracetamiden.....	94
3.6.2 Versuche zur Biotransformation des Metaboliten M27 durch Basidiomyceten.....	95
3.6.3 Alginat-Inklusion von Pilzmyzel zur Umsetzung von M27	96

4	AUSBLICK	99
5	MATERIAL UND METHODEN	101
5.1	Materialien.....	101
5.1.1	Mikroorganismen.....	101
5.1.2	Chemikalien und Substrate	101
5.1.3	Geräte und sonstige Hilfsmittel	104
5.2	Mikrobiologie	106
5.2.1	Verwendete Kulturmedien	106
5.2.1.1	Nährmedien für die Transformation	106
5.2.1.2	Vorkulturmedien.....	107
5.2.1.3	Screening-Medien.....	108
5.2.1.4	Hauptkulturmedien.....	109
5.2.2	Kulturführung	111
5.2.2.1	Stammhaltung.....	111
5.2.2.2	Vorkulturen.....	111
5.2.2.3	Vorscreening.....	112
5.2.2.4	Submers-Screening	112
5.2.2.5	Hauptkulturen für die Modifizierung von Lignosulfonaten	112
5.2.2.6	Hauptkulturen für die Umsetzung von DMTA-P und M27	112
5.2.3	Bestimmung der Kulturparameter	113
5.2.3.1	pH-Wert	113
5.2.3.2	Biotrockenmasse	113
5.2.3.3	Glucose-Gehalt.....	113
5.3	Modifizierung von Lignosulfonaten durch Basidiomyceten.....	114
5.3.1	Molekulargewichtsverringerng von Lignosulfonaten durch Flüssigkulturen von <i>Irpex consors</i>	114
5.3.2	Erhöhung der Anzahl an phenolischen Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten.....	114

5.3.2.1	Screening von Basidiomyceten	114
5.3.2.2	Variation der Kulturparameter	116
5.3.2.3	Kultivierung von <i>G. trabeum</i> im Bioreaktor.....	116
5.3.3	Kulturbegleitende Analytik.....	117
5.3.3.1	Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von Lignosulfonaten mittels Gel-Permeations-Chromatographie.....	117
5.3.3.2	Bestimmung der phenolischen Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten mittels UV-Differenzspektroskopie.....	119
5.3.3.3	ABTS-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität.....	120
5.4	Isolierung und Klonierung einer versatilen Peroxidase aus <i>I. consors</i>	122
5.4.1	Kulturente und Konzentrierung	122
5.4.2	Ultrafiltrationseinheiten.....	122
5.4.3	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC)	122
5.4.3.1	Ionenaustauschchromatographie (IEX).....	123
5.4.3.2	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	124
5.4.4	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	125
5.4.4.1	Kolloidale Coomassie-Färbung.....	125
5.4.4.2	ABTS-Aktivitätsfärbung.....	126
5.4.5	Enzym-Sequenzierung.....	126
5.4.6	Isolierung genomischer DNA.....	127
5.4.7	RNA-Isolierung.....	128
5.4.8	cDNA-Synthese.....	128
5.4.9	Verwendete Primer.....	128
5.4.10	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	129
5.4.11	Agarose-Gelelektrophorese.....	132
5.4.12	DNA-Fragmentisolierung	133
5.4.13	Klonierung der cDNA in <i>E. coli</i> TOP10	133
5.4.13.1	Ligation	133
5.4.13.2	Transformation in <i>E. coli</i> TOP10.....	134
5.4.13.3	Selektion positiver Transformanten.....	134

5.4.13.4 Kolonie-PCR	135
5.4.13.5 Plasmidisolierung.....	135
5.4.13.6 Restriktionsverdau	135
5.4.14 Sequenzierungen	136
5.4.15 Bioinformatik.....	137
5.5 Biotransformation eines Herbizids und Herbizid-Derivates durch Basidiomyceten.....	137
5.5.1 Biotransformation des Herbizids DMTA-P.....	137
5.5.1.1 Emers-Screening von Basidiomyceten zur Biotransformation von DMTA-P	137
5.5.1.2 Biotransformation von DMTA-P in Submerskultur.....	139
5.5.1.3 Biotransformation von ¹³ C-markiertem DMTA-P	139
5.5.1.4 Involvierte Enzyme der Umsetzung des DMTA-P.....	139
5.5.2 Weizenstroh induzierter Abbau von M27 in Submerskultur.....	140
5.5.2.1 Submers-Screening von Basidiomyceten zur Biotransformation von M27	140
5.5.2.2 Alginat-Inklusion von Pilzmyzel zur Biotransformation von M27 ...	141
5.5.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zur Kontrolle der Biotransformationen von DMTA-P und M27.....	141
5.5.3.1 Analyse der Biotransformation von DMTA-P	141
5.5.3.2 Analyse der Umsetzung von M27	143
5.5.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Massenspektrometrie-Kopplung zur Metabolit-Analyse	143
5.5.5 Isolierung der Metabolite aus Flüssigkulturen	145
5.5.5.1 Extraktion der Metabolite von DMTA-P aus dem Kulturüberstand	145
5.5.5.2 Aufarbeitung des Kulturüberstandes der Umsetzung von M27 durch <i>Irpex consors</i>	145
5.5.5.3 Auftrennung der Metabolite mittels präparativer RP-HPLC.....	145
5.5.6 Analytik der isolierten Metabolite von DMTA-P und M27	147

5.5.6.1 Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS).....	147
5.5.6.2 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR).....	147
5.5.6.3 Infrarotspektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion (ATR-IR).....	148
5.5.6.4 ESI-MS/MS-Analyse der isolierten Metabolite.....	148
LITERATURVERZEICHNIS	149
A ANHANG	175

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
aa	Aminosäuren
bp	Basenpaare
CAZY	<i>Carbohydrate active enzymes</i>
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cDNA	komplementäre DNA
CLA	Cellulase
COSY	<i>correlation spectroscopy</i>
cps	<i>counts per second</i>
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DEPT	<i>distortionless enhancement by polarization transfer.</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FF	<i>fast flow</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
gDNA	genomische DNA
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HCA	Hemicellulase
HMBC	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>

HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HSQC	<i>heteronuclear single bond correlation</i>
IAAC	Institut für Anorganische und Analytische Chemie, Justus-Liebig-Universität Gießen
kb	Kilobasenpaare
LAC	Laccase
LCB	Institut für Lebensmittelchemie und –biotechnologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
LiP	Lignin-Peroxidase
LRET	<i>longe-range electron transfer</i>
MnP	Mangan-Peroxidase
mRNA	Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NIST	Nationales Institut für Standards und Technologie
NOESY	<i>nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POX	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RP	Umkehrphase
SNL	Standard-Nährlösung
sRNA	<i>small RNA</i>
TAE	Tris Base, Essigsäure und EDTA.
Tris Base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)

VP	versatile Peroxidase
Vol	Volumen
vvm	Volumen pro Volumen pro Minute
w/w	Masse pro Masse (bei Prozentangaben)

1 Einleitung

1.1 Lignosulfonate: Herstellung und Anwendungen

Lignin stellt die größte natürliche Ressource an polymeren, aromatischen Verbindungen dar (Jäger und Büchs 2012). Es liegt in Form von Lignocellulose vor, in der es mit Cellulose und Hemicellulose eine robuste Matrix und den Hauptbestand von verholzten Pflanzen bildet (Eriksson *et al.* 1990). Das dreidimensionale aromatische Lignin-Polymer besteht aus 3 Phenylpropan-Untereinheiten (Coniferylalkohol, *p*-Coumarylalkohol und Sinapylalkohol), die über eine Vielzahl möglicher Bindungen kovalent miteinander verknüpft sind. Cellulose und Hemicellulose werden in der Zellstoffindustrie durch verschiedene Aufschlussverfahren vom Lignin getrennt (Lin 1992). Bei dem sogenannten Sulfit-Verfahren handelt es sich um ein wichtiges Aufschlussverfahren, mit einem jährlichen Volumen von ungefähr 7 Mio. Tonnen (Sixta 2006). Hierbei fallen durch den Aufschluss der Lignocellulose mit wässrigen Lösungen von Sulfit-Salzen (Natrium, Ammonium, Calcium, Magnesium) bei 140 – 170 °C (pH 2–12) Lignosulfonate als Nebenprodukte an (Lora 2008, Abbildung 1.1).

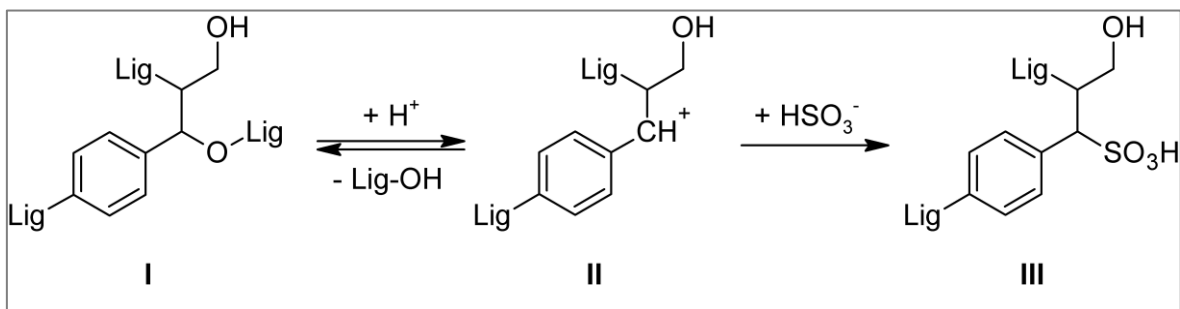


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hauptreaktion des Sulfit-Verfahrens (nach Gierer 1982). Lig = kovalent verknüpftes Lignin-Polymer.

Beim sauren Aufschluss des Lignins I kommt es zu Bildungen von Carbenium-Zwischenstufen II, die irreversibel mit dem Hydrogensulfit-Ion zum entsprechenden Lignosulfonat III reagieren. Alternativ können die hochreaktiven Carbenium-Ionen auch mit anderen, sich im Aufschluss befindenden Lignin-Resten wieder kondensieren. Die daraus resultierende Polydispersität ist eine der charakteristischen Eigenschaften von Lignosulfonaten:

- wasserlöslich
- polydispers
- polyelektrolytisch

Aufgrund dieser Eigenschaften finden Lignosulfonate in vielen Bereichen Anwendungen. Sie stellen mit einem jährlichen Volumen von 1 Mio. Tonnen den größten Anteil der kommerziell weiterverarbeiteten Lignine (Strassberger *et al.* 2014). Der weitaus größte Teil der aller technischen Lignine (>95%) wird allerdings zur energetischen Nutzung verwendet (Wünning 2001). Die stoffliche Nutzung des Lignins gerät aufgrund des Nachhaltigkeits-Aspektes vermehrt in den Fokus von Industrie und Forschung (Gasser *et al.* 2012; Strassberger *et al.* 2014; Zakzeski *et al.* 2010). Lignosulfonate verhalten sich in Lösungen als zufällig verzweigte Polyelektrolyte was sie zu hervorragenden Dispergierungs-, Binde- und Komplexmierungsmitteln macht (Myrvold 2008). So werden Lignosulfonate als Additive zum Dispergieren für Beton- und Zement-Mischungen oder Gips verwendet. Des Weiteren finden sie Anwendungen als Klebstoffe, als Bindemittel beim Pelletieren von Tierfutter oder auch beim Gerben von Leder (Faix 1992; Ringena 2006; Wünning 2001). Ein Nachteil für die stoffliche Nutzung von Lignosulfonaten stellt deren teure, schwierige Aufarbeitung und Isolierung dar. Die Lignosulfonate liegen in der Sulfitablauge als komplexe Produktgemische vor, die meist nicht komplett von Hemicellulose-Resten befreit sind (Strassberger *et al.* 2014). Die Sulfitablauge beinhaltet neben den polydispersen Lignosulfonaten auch eine große Menge an wasserlöslichen reduzierenden Zuckern (bis zu 35%, w/w), sowie anorganische Reste aus dem Sulfit-Aufschluss. Die aufwendige Isolierung, gepaart mit der Komplexität des vorliegenden Sulfit-Aufschlusses, erschwert Modifizierungen des Lignosulfonat-Polymers für Anwendungsoptimierungen (Duval *et al.* 2015; Lora 2008). Modifizierungen der Lignosulfonate, beispielsweise durch Basidiomyceten, unter Verwendung der Sulfitablauge als Ausgangssubstrat stellen deshalb einen praktischen Lösungsansatz dar.

1.2 Chloracetamide und deren Verbleib in der Umwelt

Herbizide aus der Familie der Chloracetamide werden weltweit in sehr großen Mengen ($>20.000 \text{ t a}^{-1}$ in den USA) in landwirtschaftlichen Betrieben bei der Zucht von Soja, Mais und Reis verwendet (Grube et al. 2011; Jablonkai 2003). Sie gehören zur Gruppe der K3-Herbizide, die die Synthese von langkettigen Fettsäuren (*very long chain fatty acids*, VLCFA) bei breitblättrigen Unkräutern und annuellen Gräsern unterdrücken (Babczinski 2012). Zu den bekanntesten Vertretern zählen Alachlor, Acetochlor, Dimethenamid-P (DMTA-P), Metolachlor und Propachlor (Abbildung 1.2).

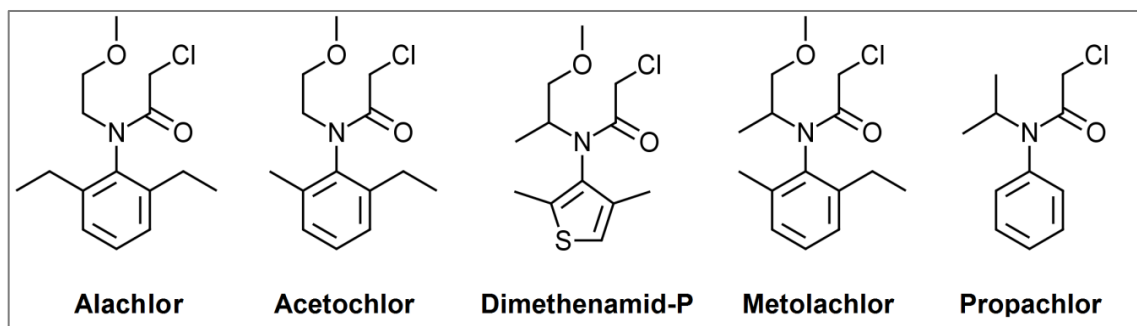


Abbildung 1.2: Strukturen der bekanntesten Chloracetamide.

Der sehr effektive Wirkungsmechanismus zielt auf die Inhibierung der für die VLCFA-Synthese zuständigen Fettsäure-Elongasen ab, die unter anderem zur Ausbildung der Kutikula benötigt werden (Babczinski 2012). Die Inhibierung der Fettsäure-Elongase erfolgt durch die kovalente Bindung des Chlor-Substituenten-tragenden, elektrophilen Kohlenstoffs an einen Cystein-Schwefel im aktiven Zentrum (Böger *et al.* 2000). Das Aufbringen der Herbizide findet meist durch Besprühung der Herbizid-Formulierung auf den Boden statt. Der bei weitem größte Teil der aufgetragenen Pestizide erreicht allerdings nicht den Wirkungsort, sondern gelangt auf verschiedenen Wegen in die Umwelt (Racke 2003). Hierzu zählt neben dem Oberflächenabfluss und der Verflüchtigung vor allem die Versickerung im Boden (Gao *et al.* 2012). Die Pestizide werden dabei im Verlauf ihres Verbleibes in der Umwelt auf verschiedenartige Weise transformiert:

- chemisch: Oxidation durch Metallionen oder saure/basische Hydrolyse
- physikalisch: Sonnenlicht induzierter, photokatalytischer Abbau
- biologisch: Biotransformationen durch im Boden lebende Mikroorganismen

Die Biotransformation stellt den größten Teil an Umwandlungen der Pestizide in der Umwelt dar (Kearney und Roberts 1998). Dies liegt vor allem an der Vielfalt und Vielzahl der Mikroorganismen in landwirtschaftlichen Böden. Laut Anderson (1989) kommen auf 1 cm³ Boden 6–10 Millionen Bakterien und 1–2 km Pilzhyphen. Die erzeugten Bodenmetabolite sind in der Regel schwerer abbaubar und meist polarer als die Ausgangsverbindungen (Sandín-España und Sevilla-Morán 2012). Dadurch vergrößern sich ihre Halbwertszeiten (als Maß für die Persistenz) im Boden. Zudem gelangen sie leichter ins Grundwasser und somit in den Nahrungskreislauf (Aga und Thurman 2001; Huntscha *et al.* 2008). In den letzten Jahrzehnten ist der Verbrauch von Pestiziden aufgrund neuartiger, effizienterer Wirkstoffe zwar von kg ha⁻¹ auf g ha⁻¹ gesunken und zugleich deren Abbaubarkeit gestiegen, allerdings stellen die anfallenden Abbauprodukte ein Problem dar (Hladik *et al.* 2005a; Richardson 2012; Vasiljević *et al.* 2012). Wie von Richardson und Ternes (2005) gezeigt, lag der Fokus vorangegangener Arbeiten zu sehr auf den Wirkstoffen selber und weniger auf der Bewertung der erzeugten Metabolite. Richardson und Ternes (2005) benutzten in diesem Zusammenhang den Begriff *emerging contaminants* (zu Deutsch: aufkommende Schadstoffe), um auf diesen Sachverhalt hinzuweisen. Hinsichtlich der Chloracetamide wurden deren Hauptmetabolite, das Ethansulfonsäure- (ESA) und das Oxanilinsäure-Derivat (OA) in einer Vielzahl von Grundwasseruntersuchungen, hauptsächlich in den USA, gefunden (Kalkhoff *et al.* 1998; Kolpin *et al.* 2000; Rebich *et al.* 2004, Abbildung 1.3).

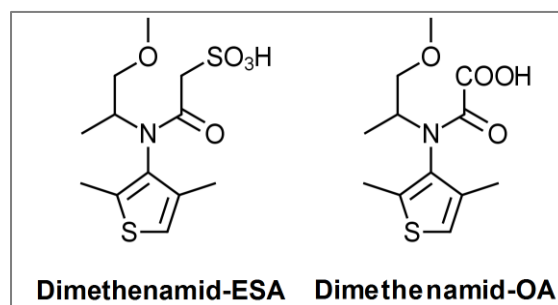


Abbildung 1.3: ESA- und OA-Metaboliten des Chloracetamids Dimethenamid-P.

Teilweise lagen die Werte ein Vielfaches über dem Erlaubten, und teilweise waren die Ausgangsverbindungen selbst nicht mehr nachweisbar (Kolpin *et al.* 2000). Erste Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass die beiden Metabolite ESA und OA wahrscheinlich keine toxischen und genotoxischen Wirkungen bei Mäusen und

Ratten aufweisen (Heydens *et al.* 1996; 2000). Da für die Zulassung bzw. Wiedenzulassungen von Pestiziden die Evaluierung aller relevanten Bodenmetabolite mitberücksichtigt werden muss (Art. 56 Abs. 1 der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009), ist ein genereller Bedarf an Forschung in diesem Bereich notwendig. Diese kann beispielsweise auf die gezielte Generierung von Bodenmetaboliten unter Laborbedingungen mit speziellen Bodenorganismen, wie Basidiomyceten sie darstellen, abzielen.

1.3 Basidiomyceten: zwischen Industrie und Umwelt

Basidiomyceten sind die am weitesten entwickelten Pilze, von denen über 30.000 Arten bekannt sind (Kirk und Ainsworth 2008). Sie verfügen aufgrund ihrer unterschiedlichen Lebensräume (Hölzer, Böden, Insekten-assoziiert) und Lebensweisen (Mykorrhiza, Saprobionten, Symbionten) über sehr vielseitige Enzymsysteme (Blackwell und Spatafora 2004). Durch ihre einzigartige Fähigkeit des Abbaus von toten und lebenden Hölzern und Pflanzenresten sind Basidiomyceten für den Kohlstoffkreislauf der Erde essentiell (Eriksson *et al.* 1990). Speziell der enzymatische Lignocelluloseabbau durch Weiß- und Braunfäulepilze stand dabei im Fokus vieler Forschungsarbeiten (Mäkelä *et al.* 2014; Ruiz-Dueñas *et al.* 2009; Pollegioni *et al.* 2015). Basidiomyceten bedienen sich diverser extrazellulärer Enzyme zum effizienten Aufschluss der Lignocellulose. Zu den cellulolytischen und ligninolytischen Enzymen, die direkt am Abbau beteiligt sind, zählen Cellulasen (CLA, EC 3.2.-.-), Hemicellulasen (HCA, EC 3.2.-.-), Peroxidasen (POX, EC 1.11.1.-) und Laccasen (LAC, EC 1.10.3.2). Hinzu kommen verschiedene Hilfsenzyme, wie zum Beispiel, Glucose-Oxidasen (EC 1.1.3.4) oder Pyranose-2-Oxidase (EC 1.1.3.10), Arylalkohol-Oxidasen (EC 1.1.3.7), lytische Polysaccharid Monooxygenasen (*Auxiliary Activity Family 9*, www.cazy.org) und diverse Esterasen (EC 3.1.-.-). Cellulolytische und ligninolytische Enzyme sind wegen ihres breiten Substratspektrums vielseitig einsetzbar und finden deshalb bereits Anwendung in verschiedenen Industriezweigen (Mendonça Maciel *et al.* 2010; Polaina und MacCabe 2007; Polizeli und Rai 2013; Regalado *et al.* 2004; Singh und Singh 2014; Widsten und Kandelbauer 2008; Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Beispiele für derzeitige Anwendungen für Enzyme aus Basidiomyceten (CLA, HCA, LAC, POX).

Industriezweig	Anwendungsbeispiele	Enzyme
Chemie	Organische Synthese	LAC, POX
Futtermittel	Vorbehandlung von Silage und Korn	CLA, HCA
Holzverarbeitung	Färbung; Bindemittel; Veredelung	LAC, POX
Lebensmittel	Klärung; Konservierung; Färbung; Entfärbung	CLA, HCA, LAC, POX
Pharmazeutik, Kosmetik	Diagnose-Kits; Immunoassays; Hautaufhellung	LAC, POX
Regenerative Energien	Bioethanol-Herstellung; Bioraffinerien	CLA, HCA, LAC, POX
Textilien, Waschmittel	Behandlung von Baumwolle; Waschmittelzusatz	CLA, HCA, LAC, POX
Zellstoffindustrie	Behandlung (<i>Biopulping</i>) und Bleichung (<i>Biobleaching</i>) von Aufschlüssen	CLA, HCA, LAC, POX
Sonstiges	Biosensoren	LAC, POX

Neben den ökonomischen stehen auch ökologische Aspekte im Fokus der Anwendungen. Die Bekämpfung von Umweltverschmutzungen durch verschiedene Einträge von Chemikalien oder Schwermetallen ist mit herkömmlichen Methoden wegen der immensen Kosten nicht mehr zu meistern (Reddy und Mathew 2001). Neben den Kostenersparnissen liegen die Vorteile beim Gebrauch von Basidiomyceten vor allem in der Toleranz hoher Substratkonzentrationen und dem breiten Substratspektrum. Durch ihr filamentöses Wachstum gelangen sie zu den relevanten Bereichen mit hohen Substratkonzentrationen in Böden (Reddy und Mathew 2001). Daher können Basidiomyceten nicht nur in Flüssigkulturen, sondern auch emers in Festbettkulturen eingesetzt werden. Diverse Übersichtsartikel haben die Möglichkeiten der Anwendung von Basidiomyceten zur biologischen Aufbereitung/Sanierung von Umweltschadstoffen diskutiert (Adenipekun 2012; Gadd 2001; Kulikova *et al.* 2011; Pointing 2001; Tortella *et al.* 2005, Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Beispiele für die Anwendung von Basidiomyceten zur Bekämpfung von Umweltschadstoffen.

Anwendungsgebiet	Beispiele
Biologische Sanierung von belasteten Böden	Pestizidrückstände; Schwermetallrückstände; polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
Aufbereitung von Industrieabwässern	Farbstoff-haltige Abwässer; Abwässer aus der Chlorbleichung und Olivenöl-Herstellung; Melassen
Abbau von persistenten Xenobiotika	(chlorierte) aromatische Verbindungen; synthetische Polymere; Munitionsabfälle

1.4 Zielsetzungen

Im ersten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der Modifizierung von Lignosulfonaten einer Sulfitablaue aus der Zellstoffindustrie durch Basidiomyceten. Das Hauptaugenmerk sollte dabei zunächst auf der Reduzierung des Molekulargewichts der Lignosulfonate liegen. Ein vorangegangenes Screening zeigte, dass der Weißfäulepilz *Irpex consors* in der Lage ist, Lignosulfonate zu depolymerisieren. Diese Modifizierung des Molekulargewichts der Lignosulfonate sollte in Submerskulturen näher untersucht werden. Ferner sollten die Depolymerisierung und die Sekretion der dafür verantwortlichen Enzymaktivität von *I. consors* korreliert werden. Für die Depolymerisierung relevante Enzyme sollten gereinigt und molekularbiologisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte eine Steigerung der phenolischen Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate erzielt werden. Hierfür sollten verschiedene Basidiomyceten emers und submers auf bzw. in Lignosulfonat-haltigen Medien gescreent werden. Die Anzahl der phenolischen Hydroxy-Gruppen wurde dabei mittels UV-Differenzspektroskopie ermittelt. Die Steigerung der Anzahl an Hydroxy-Gruppen in Flüssigkulturen sollte anschließend optimiert und im größeren Maßstab durchgeführt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten Bodenmetabolite des Herbizids DMTA-P sowie dessen Derivats M27 durch Biotransformation mit Basidiomyceten in Flüssigkulturen erzeugt werden. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum verschiedener Basidiomyceten aus der Stammsammlung des LCB auf Herbizid-haltigen Agar-Platten untersucht. Basidiomyceten, die Wachstum auf dem Screening-Agar zeigten, wurden anschließend in Flüssigkulturen kultiviert. Die Kulturüberstände wurden mittels HPLC-UV auf Biotransformationsprodukte überprüft. Gebildete Metabolite sollten schließlich aus den Kulturen isoliert und deren Strukturen mit Hilfe von Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie identifiziert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Depolymerisierung von Lignosulfonaten durch *Irpex consors*

Bei einem vorangegangenen Screening mit 17 Basidiomyceten auf mit der Sulfitablauge (Bretax Cl)-supplementierten Agar-Platten zeigte nur der Weißfäulepilz *Irpex consors* eine Bleichung der dunkel gefärbten Platte. Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollten nun die Molekulargewichtsverteilungen der Lignosulfonate in Flüssigkulturen mit *I. consors* untersucht werden.

2.1.1 Gel-Permeations-Chromatographie zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung

Aus dem oben erwähnten Screening wurden *I. consors* und fünf weitere Basidiomyceten ausgewählt (*Auricularia mesenterica*, *Dichomitus squalens*, *Lentinus squarrosulus*, *Marasmius cohortalis*, *Trametes hirsuta*) und in Flüssigkulturen mit der Sulfitablauge (0,5%, w/w; 5.2.1.4) kultiviert (5.2.2.5). Lediglich *I. consors* zeigte, wie im Emers-Screening, eine Aufhellung des Kulturmediums nach zweiwöchiger Kultivierung. Hierbei färbte sich das Medium zunächst dunkler, bevor es im Verlauf der Kultivierung sichtbar wieder aufhellte (Abbildung 2.1).



Abbildung 2.1: Verfärbung des Lignosulfonat-haltigen Kulturmediums im Verlauf der Kultivierung mit *I. consors*. Blindwert (Tag 0, links), Tag 2 (Mitte), Tag 21 (rechts).

Die Molekulargewichtsverteilung der Lignosulfonate im Verlauf der Kultivierung wurde im nächsten Schritt mittels Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) analysiert. Nach 16 Tagen wurde mit *I. consors* eine Depolymerisierung der

Lignosulfonate detektiert (Abbildung 2.2). Im Gegensatz dazu kam es bei den anderen 5 Basidiomyceten ausschließlich zu einer Polymerisation der Lignosulfonate, beispielhaft dargestellt anhand des GPC-Chromatogramms von *Trametes hirsuta* (Abbildung 2.2).

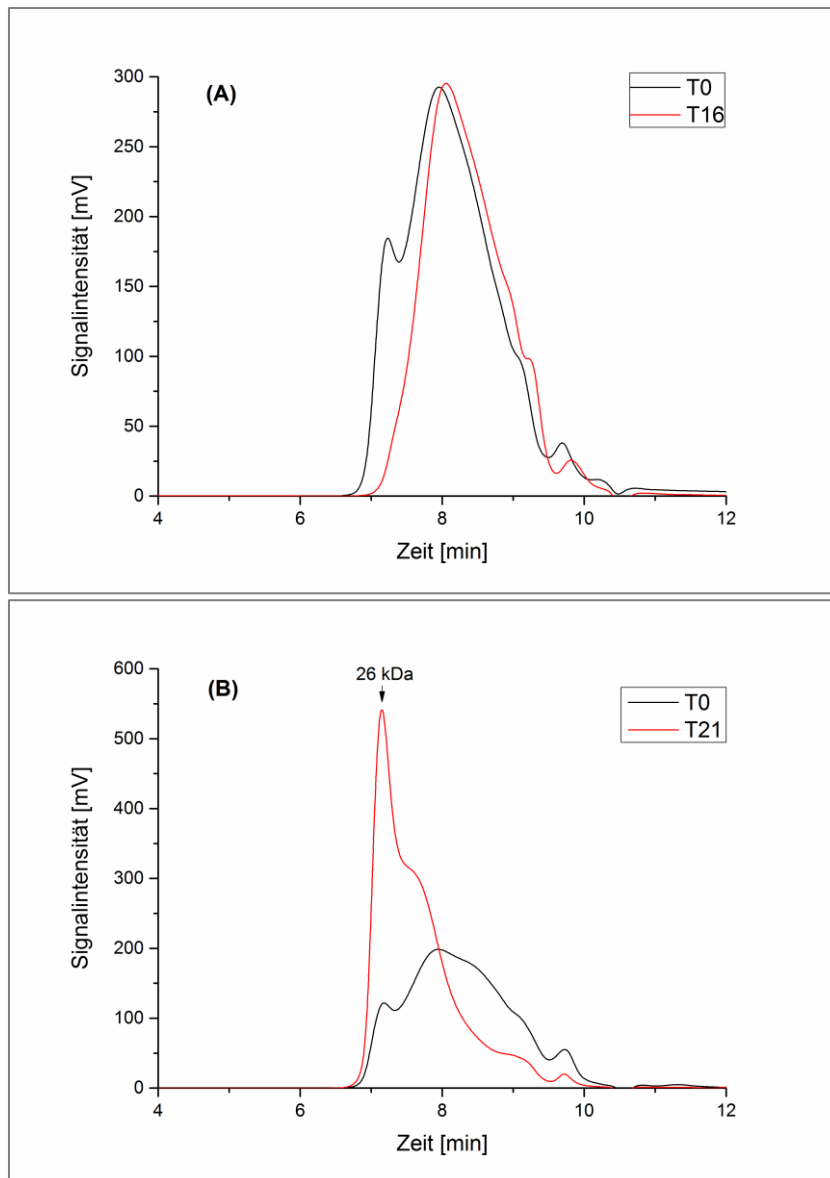


Abbildung 2.2: GPC-Chromatogramm der Lignosulfonate nach der Kultivierung mit *I. consors* (A) und *T. hirsuta* (B) nach 16 bzw. 21 Kulturtagen.

Unter der Zielsetzung der Verringerung des Molekulargewichts wurde in den folgenden Experimenten mit *I. consors* weiter gearbeitet. Hierfür wurden die Veränderungen der Molekulargewichtsverteilung über den Kulturzeitraum von 16 Tagen beobachtet (Abbildung 2.3).

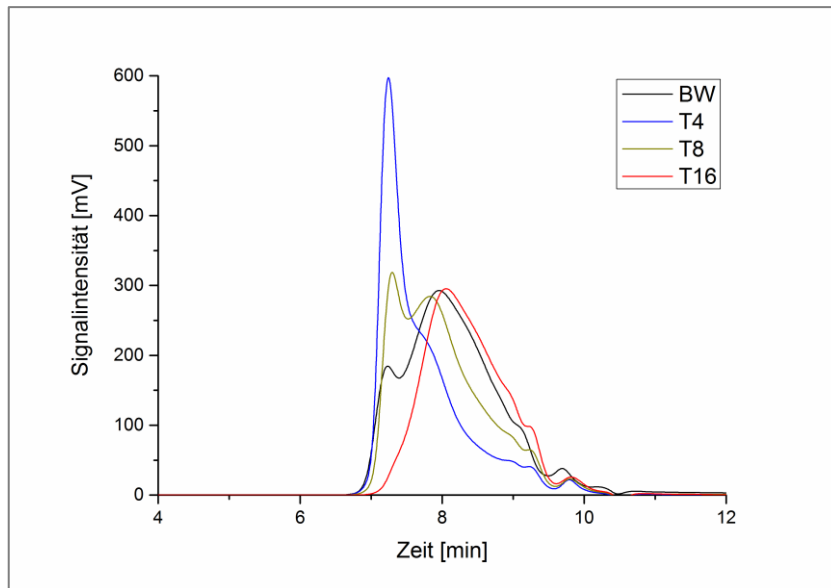


Abbildung 2.3: Ausschnitte aus GPC-Chromatogrammen der Lignosulfonate nach der Kultivierung mit *I. consors* im Verlauf der Kultivierung. BW = Blindwert.

Mittels GPC wurde gezeigt, dass *I. consors* während der ersten Kulturstage eine Polymerisation der Lignosulfonate katalysiert. Diese wurden dann im weiteren Kulturverlauf kontinuierlich depolymerisiert.

2.1.2 Korrelation zwischen extrazellulären Enzymaktivitäten und der Molekulargewichtsverteilung

Aus biotechnologischer Sicht sind die für die Depolymerisierung der Lignosulfonate verantwortlichen Enzyme von Interesse. Zur Quantifizierung von Laccase- und Peroxidase-Aktivität diente der ABTS-Assay (5.3.3.3). Bei einer Messung beider Aktivitäten musste für die Laccase-Aktivität gewährleistet sein, dass kein Wasserstoffperoxid im Kulturüberstand mehr vorhanden war. Durch Katalase-Zugabe zum Assay wurde ausschließlich Laccase-Aktivität erfasst. Diesbezüglich sollte zunächst der Einfluss der Katalase-Konzentration auf die Laccase-Aktivität im ABTS-Assay untersucht werden. Hierfür wurde die Enzymaktivität einer isolierten Laccase aus *Coprinopsis cinerea* (Rühl 2009) unter Zugabe verschiedener Konzentrationen einer kommerziellen Katalase gemessen (Abbildung 2.4).

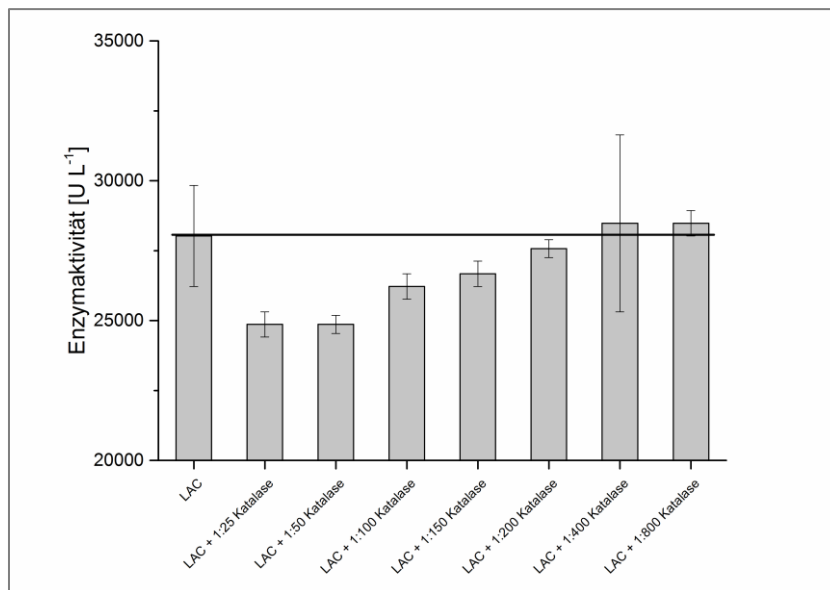


Abbildung 2.4: Einfluss der Katalase-Konzentration auf die Enzymaktivität der Laccase (LAC) aus *Coprinopsis cinerea*. X-Achse: Verdünnung der Katalase-Stammlösung.

Hohe Katalase-Konzentrationen bewirkten eine Verringerung der gemessenen Laccase-Aktivität. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurden die weiteren ABTS-Assays mit 1:200 Verdünnungen der Katalase-Stammlösung ($\sim 282 \text{ U mL}^{-1}$) durchgeführt, weil die gemessenen Werte am nächsten an der tatsächlichen Laccase-Aktivität lagen.

Nach der Optimierung der Zugabemenge an Katalase wurden die Enzymaktivitäten über den Verlauf der Kultivierung hinweg untersucht. Um Hemmung der Peroxidase durch zu hohe Wasserstoffperoxid-Konzentrationen auszuschließen, wurden verschiedene Konzentrationen ($3,5 \mu\text{mol}$, $18,0 \mu\text{mol}$, $35,0 \mu\text{mol}$) beim Enzym-Assay verwendet. Die ermittelten Peroxidase-Aktivitäten berechneten sich aus der Differenz der höchsten gemessenen Peroxidase-Aktivität und der Laccase-Aktivität bei Katalase-Zugabe. Die höchsten Peroxidase-Aktivitäten wurden stets mit $3,5 \mu\text{mol}$ Wasserstoffperoxid gemessen (Abbildung 2.5).

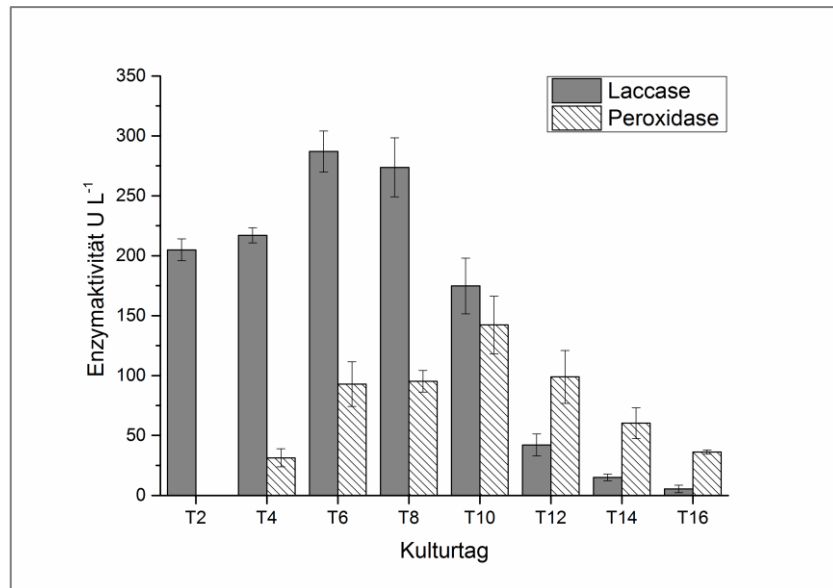


Abbildung 2.5: Laccase- und Peroxidase-Aktivitäten (3,5 μmol Wasserstoffperoxid) in den Kulturüberständen von *I. consors* mit Bretax CI (0,5%, w/w) während der Kultivierung.

I. consors sekretierte zu Beginn Laccase-Aktivitäten mit bis zu 200 U L^{-1} . Diese Laccase-Aktivitäten korrelieren mit der in 2.1.1 gezeigten Polymerisation der Lignosulfonate. Ab Kulturtag 4 wurden höhere Peroxidase-Aktivitäten von $> 100 \text{ U L}^{-1}$ detektiert, die ihr Maximum an Kulturtag 10 erreichten. Zwischen den Kulturtagen 4 und 10 war die Depolymerisierung am effizientesten, was gut mit den detektierten Peroxidase-Aktivitäten korrelierte. In der zweiten Kulturwoche sank die Laccase-Aktivität deutlich, während die Peroxidase-Aktivitäten bis zum Kulturende an Tag 16 deutlich langsamer abnahmen.

2.1.3 Einfluss der Lignosulfonat-Konzentration auf die Molekulargewichtsverteilung

Die Konzentration der Lignosulfonate in der Sulfitablauge Bretax CI (Massenanteil w/w) wurde von 20 mL L^{-1} (0,5%, w/w) auf 40 mL L^{-1} (1,0%, w/w) bzw. 80 mL L^{-1} (2,0%, w/w) gesteigert. Eine tiefschwarze Farbe aller Kulturmedien bereits nach den ersten Kulturtagen deutete auf einen starken Polymerisationsgrad der Lignosulfonate hin. Dies wurde durch GPC-Messungen der Kulturüberstände bestätigt (Abbildung 2.6).

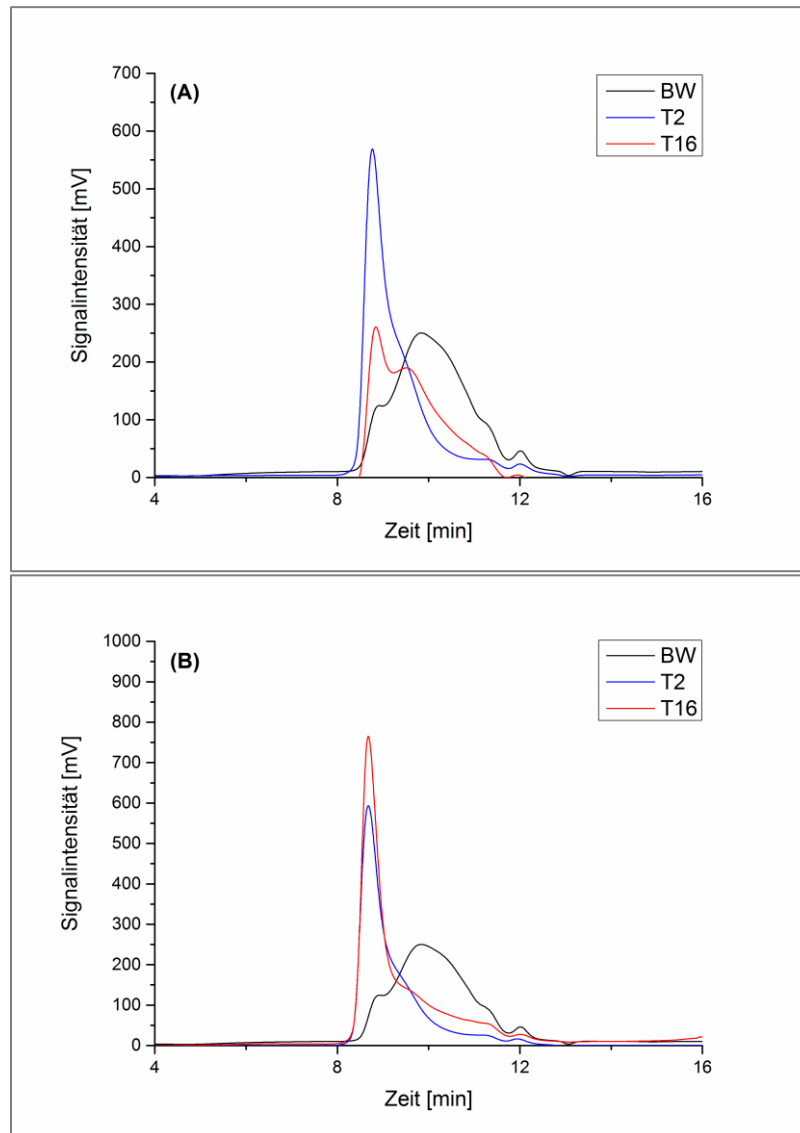


Abbildung 2.6: GPC-Chromatogramme der Lignosulfonate aus Kulturen von *I. consors* an verschiedenen Kulturtagen. 40 mL L⁻¹ Bretax CI (A), 80 mL L⁻¹ Bretax CI (B).

Sowohl bei 40 mL L⁻¹ als auch bei 80 mL L⁻¹ Bretax CI kam es in den ersten Kulturtagen zu einer starken Polymerisation der Lignosulfonate. Bei 40 mL L⁻¹ Bretax CI wurden die hochmolekularen Fraktionen teilweise abgebaut, allerdings wurde nicht die gleiche Verringerung des Molekulargewichts wie bei 20 mL L⁻¹ Bretax CI erreicht werden. Kulturbegleitend wurden die Laccase- und Peroxidase-Aktivitäten in den Kulturüberständen bestimmt (5.3.3.3, Abbildung 2.7).

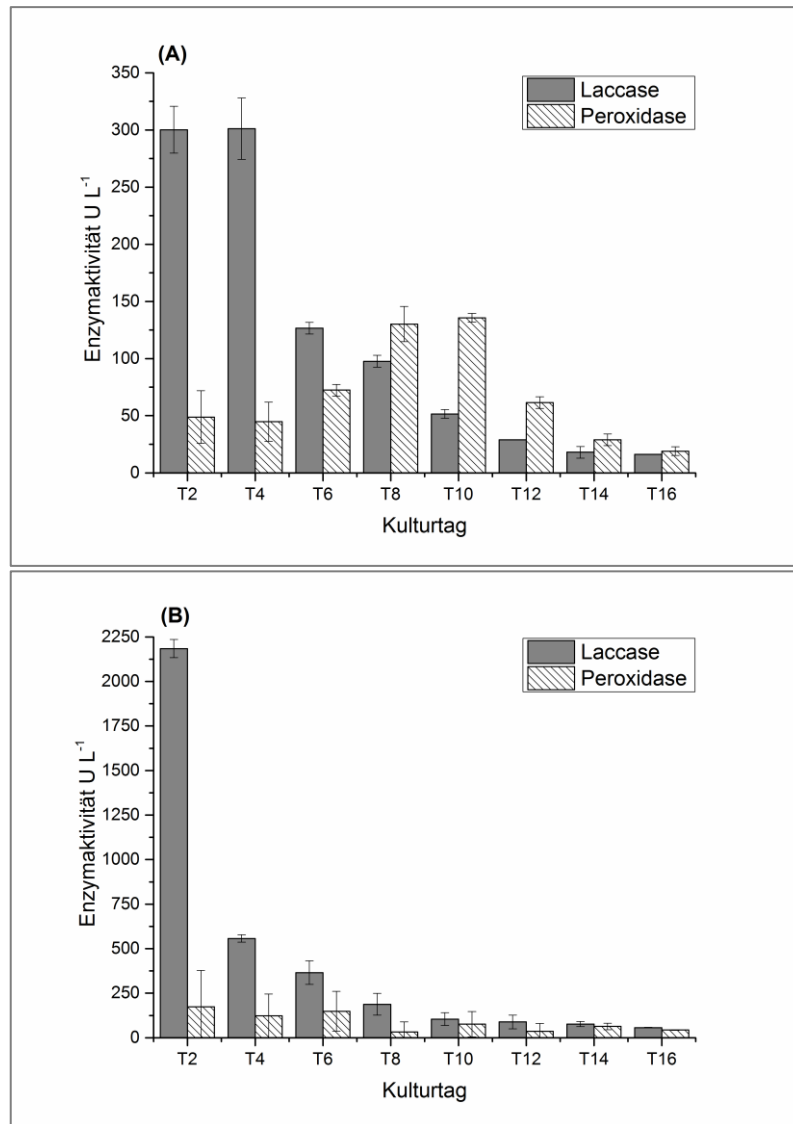


Abbildung 2.7: Laccase- und Peroxidase-Aktivitäten (3,5 μmol Wasserstoffperoxid) in den Kulturüberständen von *I. consors* (A, 40 mL L^{-1} Bretax CI, 2,3%, w/w) und (B, 80 mL L^{-1} Bretax CI, 4,9%, w/w) während des Kulturverlaufs.

Die Laccase-Aktivitäten betragen in den ersten Kulturtagen $\sim 300 \text{ U L}^{-1}$ (40 mL L^{-1} Bretax CI) bzw. $> 2.000 \text{ U L}^{-1}$ (80 mL L^{-1} Bretax CI). Die Peroxidase-Aktivitäten waren an den Kulturtagen 8 und 10 mit Werten bis zu 150 U L^{-1} am höchsten (40 mL L^{-1} Bretax CI). Bei einer Lignosulfonat-Konzentration von 80 mL L^{-1} Bretax CI wurden in der ersten Kulturwoche Peroxidase-Aktivitäten von $> 100 \text{ U L}^{-1}$ detektiert, welche wie die Laccase-Aktivitäten im Verlauf der Kultivierung abnahmen.

2.2 Modifizierung von Lignosulfonaten zur Erhöhung des Gehalts an phenolischen Hydroxy-Gruppen

Die in Sulfitablaugen enthaltenen Lignosulfonate sollten durch Kultivierung mit Basidiomyceten chemisch modifiziert werden. Das Ziel war dabei die Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen.

2.2.1 Screening von Holzfäulepilzen zur Erhöhung des Gehalts an phenolischen Hydroxy-Gruppen

Anhand eines Screenings in Emers-Kultur (5.2.2.3) wurde geprüft, welche Pilze (Tabelle 5.18) auf einem Bretax CI-haltigem Screening-Agar (Tabelle 5.9) Wachstum zeigten. Diese Pilze sollten im Anschluss in Flüssigkultur auf ihr Potential zur Demethylierung von Methoxy-Gruppen untersucht werden. Sieben der 20 getesteten Pilze zeigten innerhalb von zwei Wochen gutes, 11 Pilze moderates und zwei Pilze kaum Wachstum auf den Screening-Platten. Vereinzelt wurden dunkle Verfärbungen des Mediums unter dem Myzel der eingesetzten Weißfäule-Pilze beobachtet (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Wachstum der untersuchten Basidiomyceten und Verfärbung der Agar-Platten ; BF = Braunfäule, WF = Weißfäule.

Pilz	Schadbild	Wachstum auf Screening-Medium*	Dunkelfärbung
<i>Agrocybe aegerita</i>	WF	0	ja
<i>Antrodia serialis</i>	BF	0	nein
<i>Antrodia xantha</i>	BF	+	nein
<i>Coprinellus micaceus</i>	WF	0	ja
<i>Coprinus xanthothrix</i>	-	0	nein
<i>Daedalea quercina</i>	BF	+	nein
<i>Fomitopsis cajanderi</i>	BF	-	nein
<i>Fomitopsis pinicola</i>	BF	+	nein
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	BF	0	nein
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	BF	0	nein
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	BF	0	nein

Pilz	Schadbild	Wachstum auf Screening-Medium*	Dunkelfärbung
<i>Laetiporus sulphureus</i>	BF	0	nein
<i>Lenzites betinula</i>	WF	+	ja
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	BF	0	nein
<i>Piptoporus betulinus</i>	BF	+	nein
<i>Porostereum spadiceum</i>	WF	+	ja
<i>Postia caesia</i>	BF	-	nein
<i>Trametes hirsutum</i>	WF	0	ja
<i>Trametes suaveolens</i>	WF	0	ja
<i>Wolfiporia cocos</i>	BF	+	nein

*(+) = gutes Wachstum, (0) = moderates Wachstum, (-) = schlechtes Wachstum

Im nächsten Schritt wurden die 20 Basidiomyceten in Flüssigmedien (Tabelle 5.9) kultiviert (5.2.2.4). Alle Pilze zeigten sichtbares Myzel-Wachstum in den Medien. Bei den Weißfäulepilzen wurde eine Dunkelfärbung des Mediums beobachtet. Die Braunfäulepilze bewirkten hingegen überwiegend eine Aufhellung des Mediums. In Abbildung 2.8 sind beispielhaft die GPC-Chromatogramme von *Trametes suaveolens* (TSU, Weißfäule) und *Piptoporus betulinus* (PBE, Braunfäule) an Kulturtag 46 gezeigt.

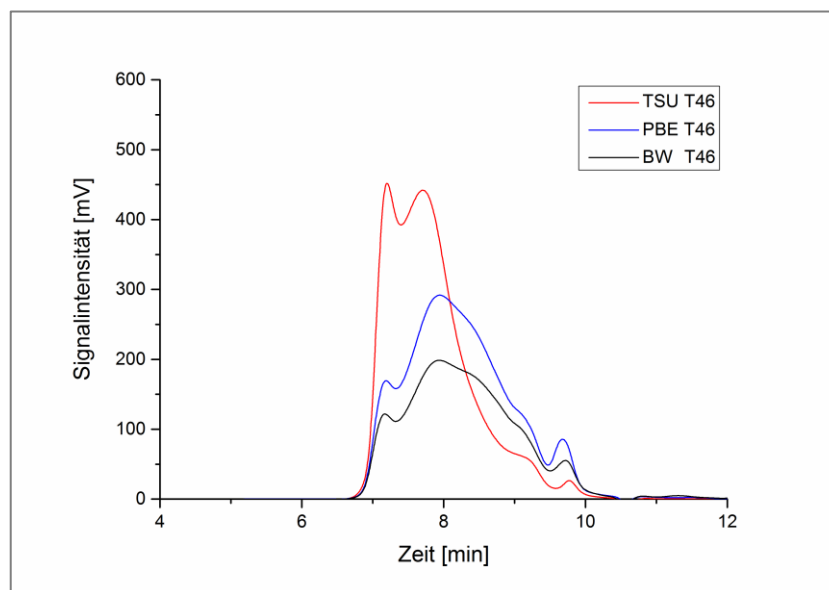


Abbildung 2.8: GPC-Chromatogramme der Kulturüberstände eines Weißfäulepilzes (TSU) und eines Braunfäulepilzes (PBE) an Tag 46. BW = Blindwert.

Bei den Weißfäulepilzen (Abbildung 2.8, TSU) kam es zu einer Polymerisation der Lignosulfonate, während sich deren Molekulargewichtsverteilung bei den Braunfäulepilzen (Abbildung 2.8, PBE) kaum veränderte. Die Analyse der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate erfolgte unter Verwendung der UV-Differenzspektroskopie (5.3.3.1). Die deprotonierten Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate besitzen unter diesen Bedingungen zwei Absorptionsmaxima bei ~ 250 nm und ~ 300 nm. Für das Screening wurde zunächst nur das Maximum bei 300 nm betrachtet. Abbildung 2.9 zeigt beispielhaft Ausschnitte aus UV-Differenzspektren der Kulturüberstände von *Antrodia serialis* an verschiedenen Kulturtagen.

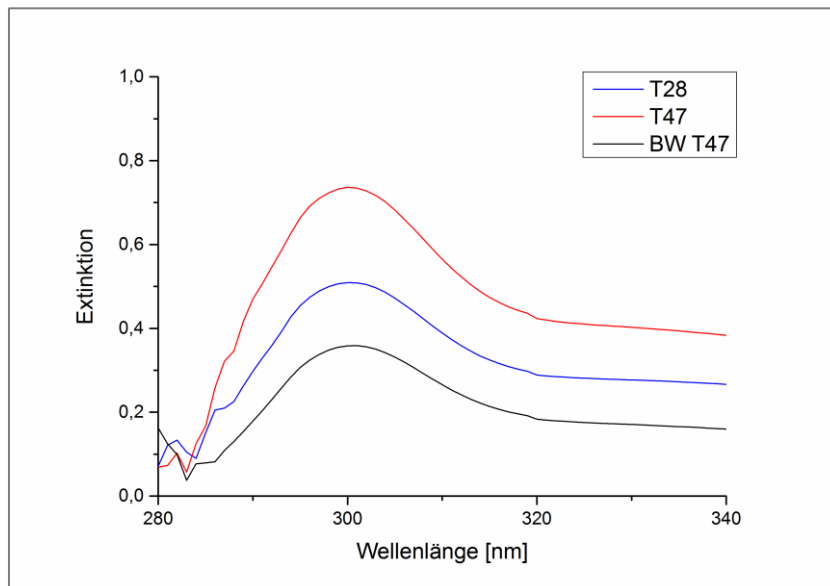


Abbildung 2.9: Ausschnitte aus UV-Differenzspektren der Kulturüberstände von *A. serialis* an verschiedenen Kulturtagen. BW = Blindwert.

Die Extinktionsdifferenzen bei 300 nm ($\Delta E_{300 \text{ nm}}$) in den Differenzspektren der Lignosulfonate nach 47 Tagen Kultivierung sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.2: Liste der untersuchten Basidiomyceten geordnet nach absteigendem $\Delta E_{300 \text{ nm}}$. BF = Braunfäule, WF = Weißfäule. Für weitere Screening verwendete Basidiomyceten (fett).

Pilz	Schadbild	Dunkelfärbung	$\Delta E_{300 \text{ nm}}$ nach 47 Kulturtagen
<i>Antrodia serialis</i>	BF	nein	0,736
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	BF	nein	0,727
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	BF	nein	0,674
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	BF	nein	0,670
<i>Fomitopsis pinicola</i>	BF	nein	0,630
<i>Coprinellus micaceus</i>	WF	ja	0,597
<i>Postia caesia</i>	BF	nein	0,575
<i>Fomitopsis cajanderi</i>	BF	nein	0,575
<i>Piptoporus betulinus</i>	BF	nein	0,551
<i>Laetiporus sulphureus</i>	BF	nein	0,517
<i>Wolfiporia cocos</i>	BF	nein	0,482
<i>Antrodia xantha</i>	BF	nein	0,477
<i>Daedalea quercina</i>	BF	nein	0,472
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	BF	nein	0,462
<i>Coprinus xanthothrix</i>	-	nein	0,408
<i>Agrocybe aegerita</i>	WF	ja	0,348
<i>Lenzites betulina</i>	WF	ja	0,348
<i>Trametes hirsutum</i>	WF	ja	0,348*
<i>Porostereum spadiceum</i>	WF	ja	0,277*
<i>Trametes suaveolens</i>	WF	ja	0,232*
Blindwert	-	-	0,358

*nach 35 Kulturtagen

Die niedrigen Extinktionsdifferenzen bei den Weißfäulepilzen waren indirekt proportional zu den in den Überständen gemessenen Laccase-Aktivitäten (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: Laccase-Aktivitäten in den Kulturüberständen ausgewählter Pilze.

Pilz	Laccase-Aktivität [U L ⁻¹]			Peroxidase-Aktivität [U L ⁻¹]			
	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 7	Tag 14	Tag 21	
TSU	36,2	1,8	10,9	0,0	7,2	0,0	Weißfäulepilze
CMI	0,0	0,0	0,0	10,9	12,7	8,7	
LBE	18,1	7,2	2,2	0,0	5,4	8,7	
THI	18,1	12,7	2,2	0,0	0,0	6,5	
PSPA	28,9	9,0	10,9	7,3	1,8	2,2	
AXA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Braunfäulepilze
FPI	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
GTR	0,0	0,0	0,0	10,9	3,6	4,3	
ASER	0,0	0,0	0,0	7,3	5,4	4,3	
PBE	0,0	0,0	0,0	10,9	5,4	4,3	

Bis auf *Coprinellus micaceus* (CMI) waren bei allen Weißfäulepilzen Laccase-Aktivitäten messbar. Bei den Braunfäulepilzen hingegen führte erst eine H₂O₂-Zugabe zu messbaren Aktivitäten (3.3.1). Wie bereits in 2.1.1 gezeigt, katalysierten die Weißfäulepilze durch ihre Laccase-Aktivität eine Polymerisation der Lignosulfonate im Kulturüberstand (Abbildung 2.10).

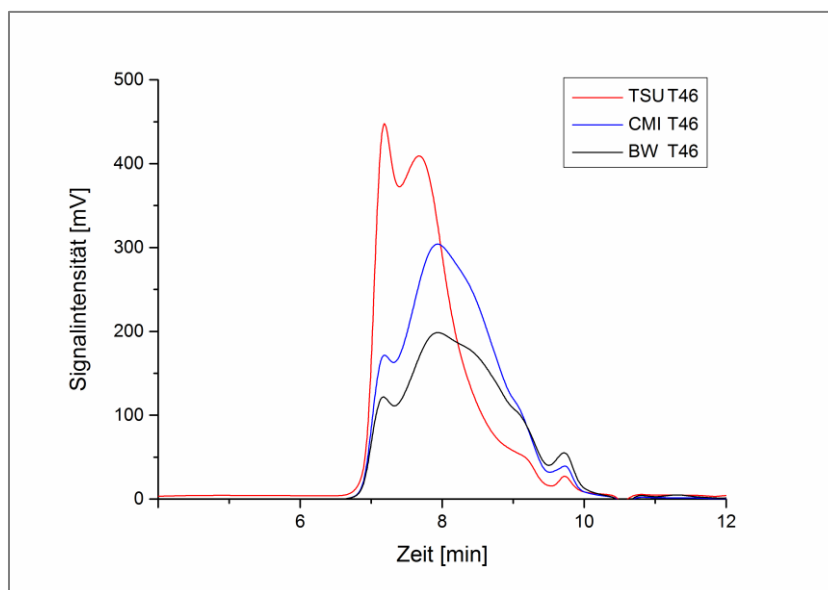


Abbildung 2.10: GPC-Chromatogramme der Kulturüberstände eines Weißfäulepilzes (TSU) und eines Braunfäulepilzes (CMI) an Tag 46. BW = Blindwert.

Die in Tabelle 2.2 hervorgehobenen neun Basidiomyceten wurden erneut in Flüssigkulturen untersucht. In diesem Ansatz wurden die entsprechenden Medien im Unterschied zum Screening mit ME-Flüssigkultur (5.2.2.5) und nicht mit den Emers-Vorkulturen inokuliert (5.2.2.4). Die Zunahme der Extinktionsdifferenzen (gegenüber dem Blindwert) der verschiedenen Kulturüberstände im Verlauf der Kultivierung ist in Abbildung 2.11 dargestellt.

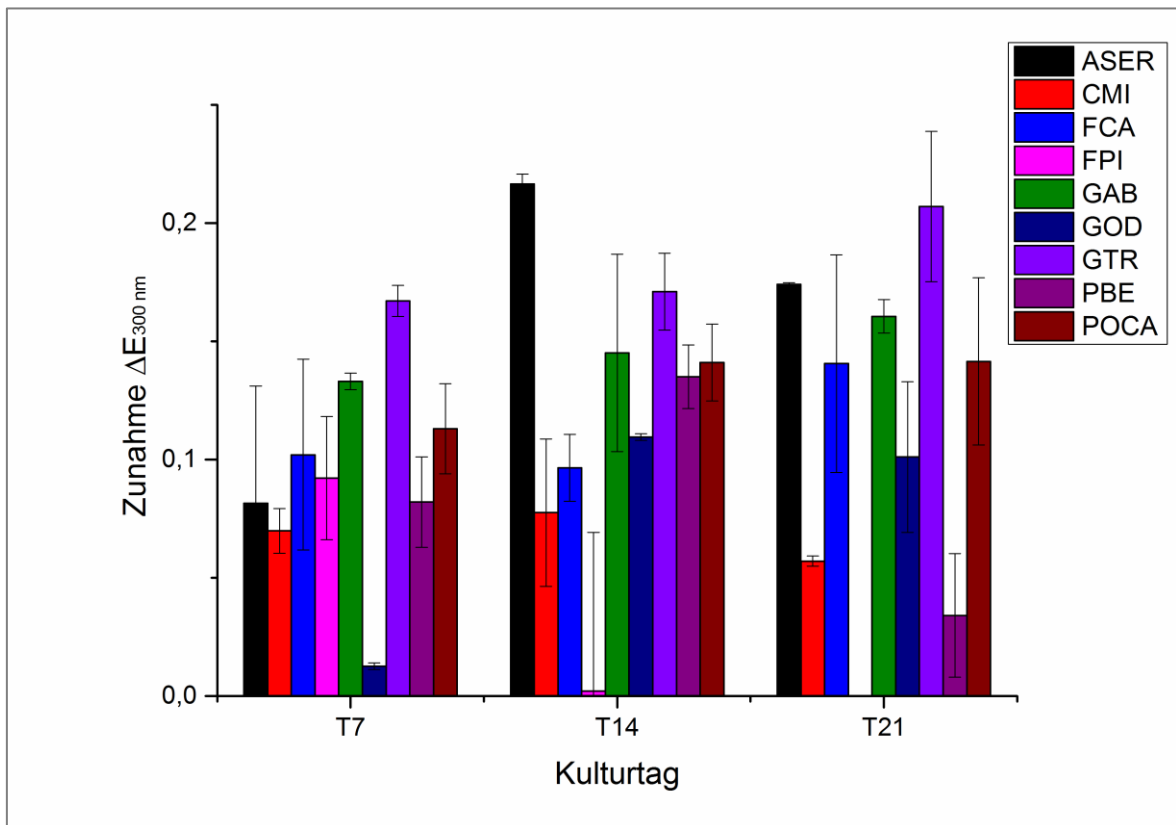


Abbildung 2.11: Zunahme der Extinktionsdifferenzen $\Delta E_{300 \text{ nm}}$ der Lignosulfonate, modifiziert durch verschiedene Pilze im Kulturverlauf bezogen auf den Kulturblindwert.

Erneut zeigten die Kulturen der Braunfäulepilze *A. serialis* und *G. trabeum* die größten Extinktionsdifferenzen. Diese waren mit Ausnahme bei *F. pinicola* bei allen Basidiomyceten ähnlich hoch (0,45 – 0,6). Die Maxima der Extinktionsdifferenzen waren (mit Ausnahme von *G. trabeum*) bereits nach 14 Kulturtagen erreicht.

2.2.2 Einfluss verschiedener Parameter auf die Flüssigkultivierung von *Gloeophyllum trabeum*

Wie in 2.1.1 gezeigt, verursachten die Braunfäulepilze *A. serialis* und *G. trabeum* die stärkste Zunahme an phenolischen Hydroxy-Gruppen bei den Lignosulfonaten. Aufgrund des schnelleren Wachstums in der Vorkultivierung wurde *G. trabeum* in den Folgeversuchen verwendet. Durch die Änderung verschiedener Kulturparameter (5.3.2.2) sollte die Steigerung des Gehalts an phenolischen Hydroxy-Gruppen optimiert werden. Hierfür wurde *G. trabeum* drei Wochen unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und die Kulturüberstände mittels UV-Differenzspektroskopie und Gel-Permeations-Chromatographie untersucht (Abbildung 2.12).

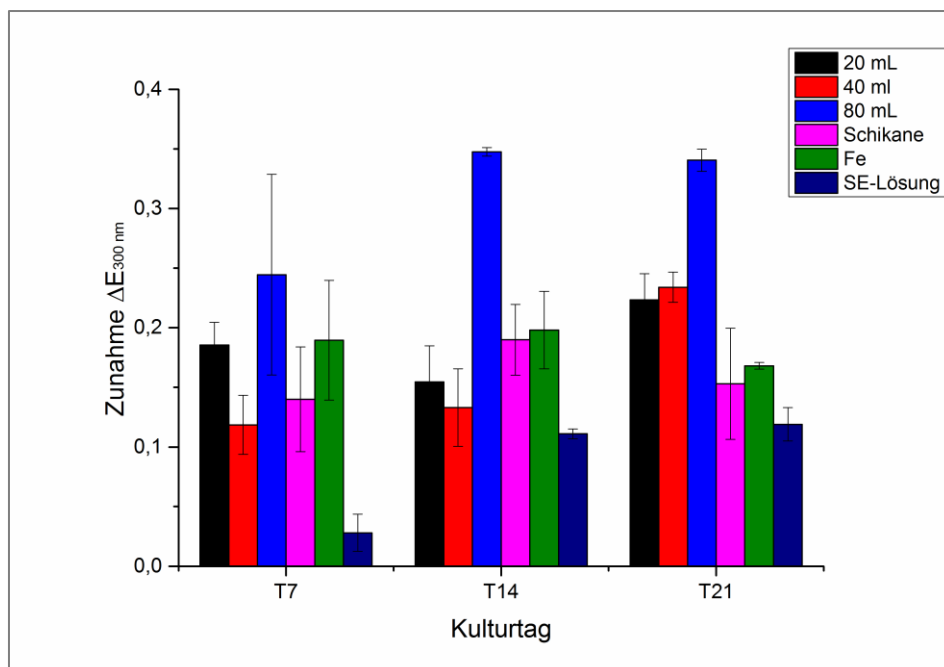


Abbildung 2.12: Zunahme der Extinktionsdifferenzen $\Delta E_{300 \text{ nm}}$ der Kulturüberstände von *G. trabeum* bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen bezogen auf den Kulturblindwert. Fe = Zugabe $8,0 \text{ g L}^{-1} \text{ Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, SE-Lösung = ohne Spurenelementlösung.

Die Verwendung eines Schikane-Kolbens sowie eine Zugabe von $8,0 \text{ g L}^{-1} \text{ Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ hatten keinen bemerkbaren Einfluss auf die Anzahl an Hydroxy-Gruppen im Vergleich zu den Standardbedingungen (20 mL L^{-1} Bretax CI). Das Weglassen der Spurenelemente hingegen bewirkte eine Abnahme der Steigerung im Vergleich zu den Normalbedingungen. Eine Erhöhung der Bretax CI Konzentration auf 40 bzw. 80 mL L^{-1} führte zu einem Anstieg der Extinktionsdifferenzen (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4: Extinktionsdifferenzen $\Delta E_{300 \text{ nm}}$ (*G. trabeum*) bei verschiedenen Konzentrationen an Bretax Cl.

Bretax Cl [mL L ⁻¹]	$\Delta E_{300 \text{ nm}}$ (Tag 0)	$\Delta E_{300 \text{ nm}}$ (Tag 21)	Anteil Bretax Cl an Trockenmasse* [%]	Zunahme $\Delta E_{300 \text{ nm}}$ [%]
20	0,390 ± 0,077	0,609 ± 0,022	63	56
40	0,499 ± 0,007	0,733 ± 0,013	78	47
80	0,535 ± 0,018	0,876 ± 0,009	87	63

*bezogen auf 3 g L⁻¹ anorganische Salze und eine Trockenmasse Bretax Cl von 26% (w/w)

Die absolute gemessene Extinktionszunahme unterschied sich in Folge des zunehmenden Anteils an Lignosulfonaten im Lyophilisat. Die relative Zunahme der Extinktionszunahme lag hingegen bei den eingesetzten Konzentrationen in der Regel zwischen 50% und 60%. *G. trabeum* war zudem in der Lage, die hochmolekularen Anteile der Lignosulfonate partiell abzubauen, wobei die Konzentration des Bretax Cl keinen entscheidenden Einfluss auf den Abbau hatte (Abbildung 2.13).

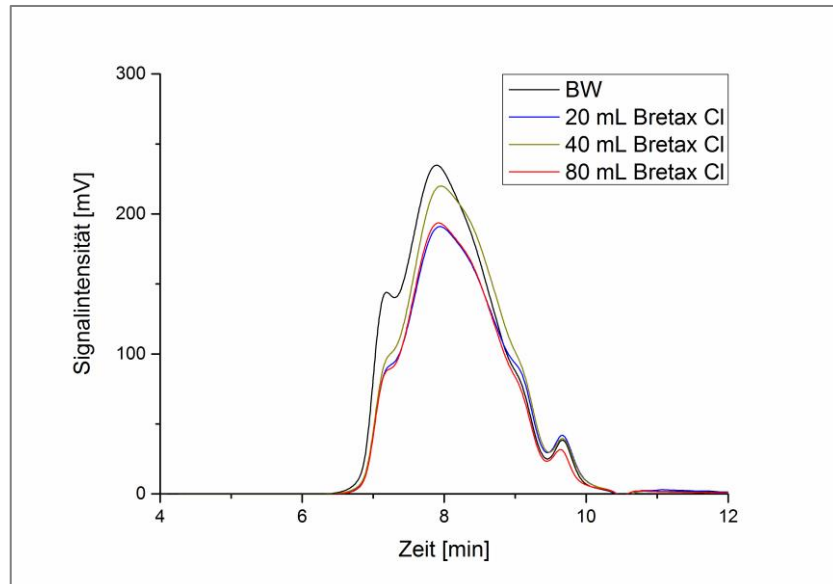


Abbildung 2.13: Ausschnitte aus den GPC-Chromatogrammen der Kultivierung von *G. trabeum* mit verschiedenen Konzentrationen an Bretax Cl an Kulturtag 21. BW = Blindwert.

Zusammengefasst hatte eine Erhöhung der Konzentration keinen negativen Einfluss auf die Modifizierung der Lignosulfonate durch *G. trabeum*.

2.2.3 Fermentativer Ansatz zur Herstellung von modifizierten Lignosulfonaten

In einem abschließenden Experiment sollte die Modifizierung der Lignosulfonate durch *G. trabeum* im größeren Maßstab durchgeführt werden. Hierzu wurde die Kultivierung (40 mL L⁻¹ Bretax CI) in einem 20 L Bioreaktor angesetzt (5.3.2.3) und 14 Tage lang kultiviert (Abbildung 2.14).



Abbildung 2.14: Fermentationseinheit für die Biotransformation von Bretax CI mit *G. trabeum*.

Die Messdaten der Kultivierung wurden über den gesamten Fermentationszeitraum aufgezeichnet. Die anfänglich eingestellte Begasungsrate von 3 L min⁻¹ (0,2 vvm) erwies sich als deutlich zu gering, da der pO₂-Wert in den ersten 24 h auf 0 absank. Deswegen wurde im weiteren Kulturverlauf ein Setpoint von pO₂ = 75% gesetzt. Die Messung des pO₂-wertes war nur in der ersten Kulturwoche möglich, da es ab Kulturtag 8 zu erheblichen Schwankungen der Messwerte kam. Der Pilz adaptierte zudem den pH-Wert des Mediums auf pH = 3,5, welcher sich im weiteren Kulturverlauf nicht mehr veränderte. Die kulturbegleitenden Messungen der UV-Differenzspektren der Lignosulfonate wurden analog zu den Kulturen im Schüttelkolben durchgeführt. Diese ergaben eine gute Reproduzierbarkeit der Modifikation der Lignosulfonate durch *G. trabeum* im größeren Maßstab. Sowohl die Anzahl der Hydroxy-Gruppen als auch die Dauer bis zum Erreichen der Steigerung wurden durch

Maßstabsvergrößerung von 0,2 L auf 14,0 L nicht merklich beeinflusst (Abbildung 2.15).

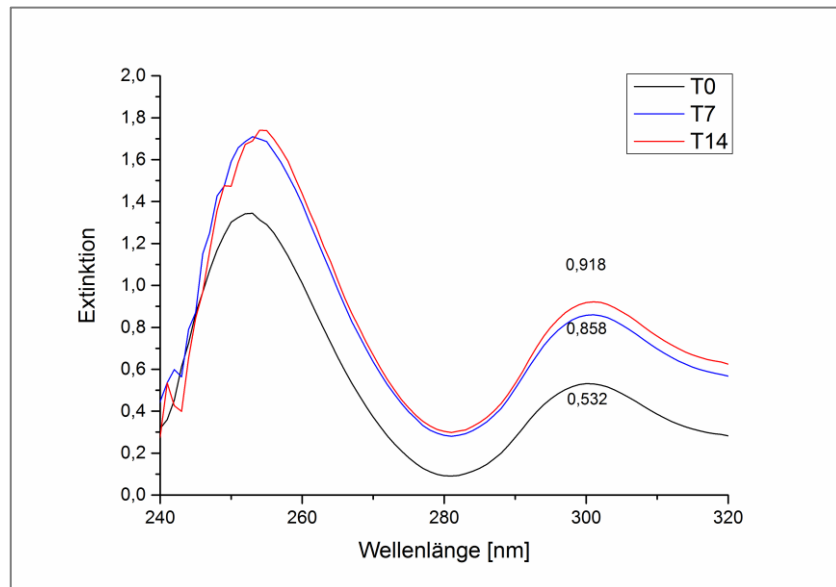


Abbildung 2.15: Extinktionszunahme der Kulturüberstände (*G. trabeum*) an verschiedenen Kulturtagen im UV-Differenzspektrum.

In dem zweiwöchigen Kulturzeitraum war eine Abnahme der hochmolekularen Fraktionen der Lignosulfonaten erkennbar. Insgesamt unterschied sich die Molekulargewichtsverteilung der Lignosulfonate im Vergleich zur Kultivierung im Schüttelkolben kaum (Abbildung 2.16).

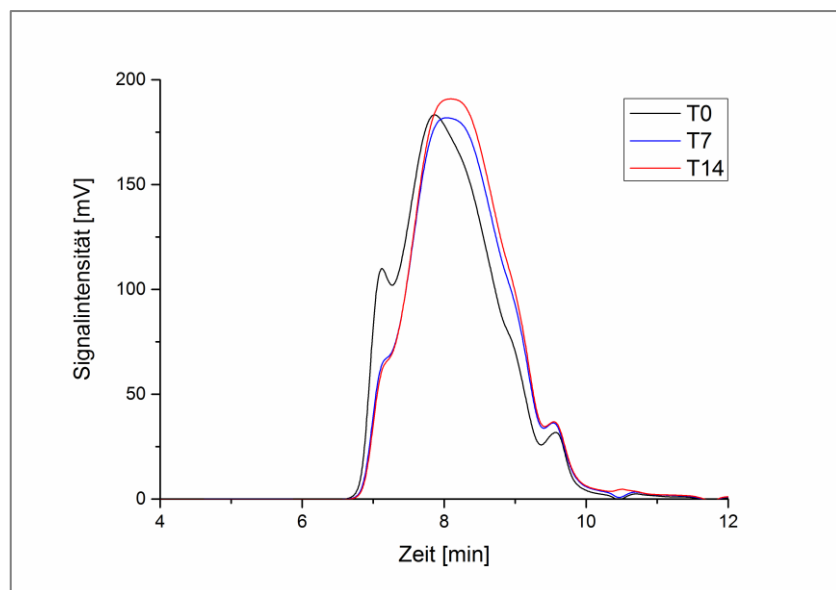


Abbildung 2.16: Ausschnitte aus den GPC-Chromatogrammen der Kulturüberstände an Tag 0, 7 und 14.

2.3 Isolierung und Klonierung einer putativen versatilen Peroxidase aus *Irpex consors*

Die detektierten Peroxidase-Aktivitäten in den Kulturüberständen von *I. consors* (2.1) und deren Korrelation mit der Depolymerisierung der Lignosulfonate machten diese für weitere Untersuchung sehr interessant. Deshalb sollten die sekretierten Peroxidase(n) aus *I. consors* aus den Kulturüberständen isoliert und charakterisiert werden.

2.3.1 Reinigung mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) und isoelektrischer Fokussierung

Die Kulturen von *I. consors* wurden am Tag mit der höchsten Peroxidase-Aktivität geerntet und das Myzel vom Kulturüberstand abgetrennt (5.4.1). Die Konzentrierung (10fach) erfolgte mittels kontinuierlicher Ultrafiltration, wobei es zu ~48% Aktivitätsverlust kam. Im nächsten Schritt wurde das Konzentrat mit einem Anionenaustauscher (DEAE FF; 5.4.3.1) unter Verwendung eines Salzgradienten aufgetrennt (Abbildung 2.17).

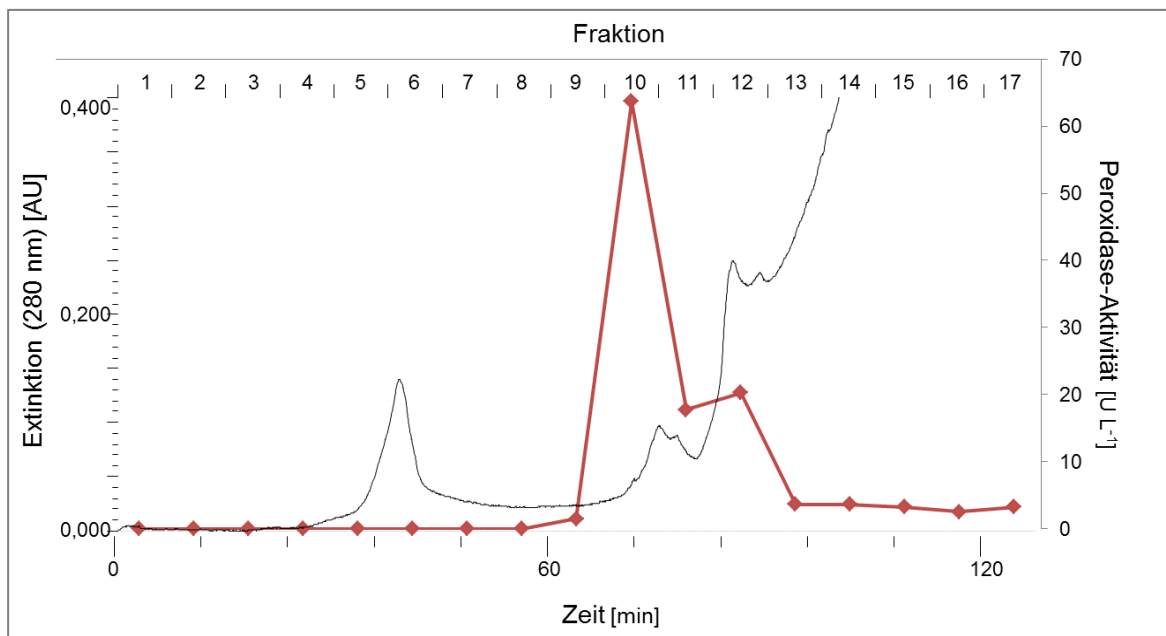


Abbildung 2.17: FPLC-Chromatogramm der Peroxidase-Isolierung (schwacher Anionenaustauscher). Extinktion (schwarz), Peroxidase-Aktivität (rot).

Die Steigung der UV-Absorption ab ca. 70 min ist auf eluierendes Lignosulfonate zurückzuführen. Eine Detektion der Peroxidase war deswegen nur anhand eines

Aktivitäts-Assays möglich. Fraktionen mit Peroxidase-Aktivität (10 – 12) wurden vereinigt und konzentriert (5.4.2). Die Lignosulfonate wurden mit dem Anionenaustauscher größtenteils abgetrennt. Der zweite Reinigungsschritt erfolgte mit Hilfe der hydrophoben Interaktionschromatographie (Phenyl FF; 5.4.3.2), da in den gepoolten Peroxidase-Fraktionen noch Laccase-Aktivität messbar war (Abbildung 2.18).

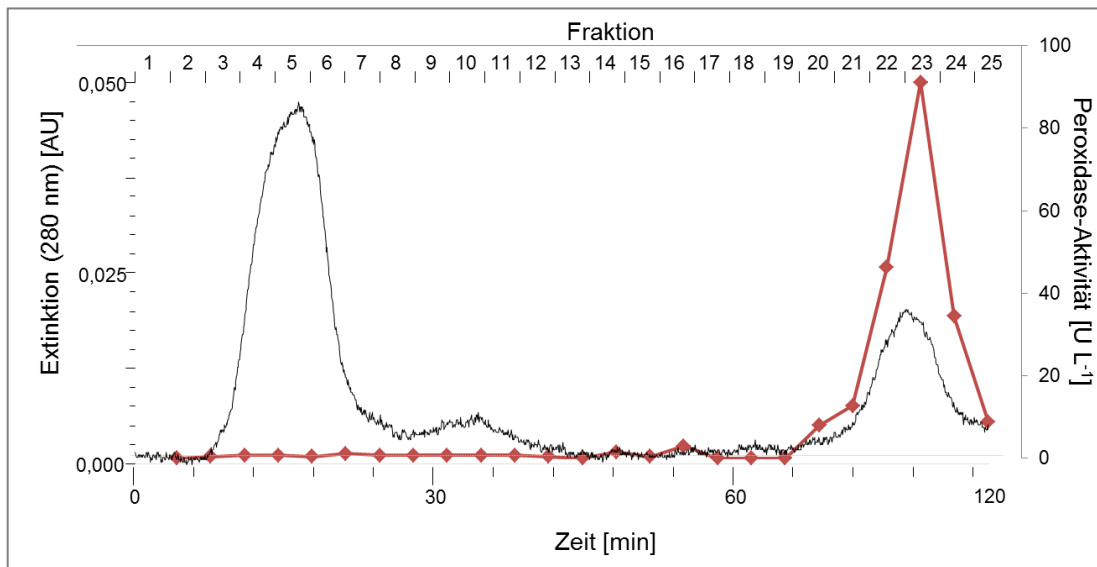


Abbildung 2.18: FPLC-Chromatogramm der Peroxidase-Isolierung mittels hydrophober Interaktion. Extinktion (schwarz), Peroxidase-Aktivität (rot).

Der Aktivitäts-Assay nach der hydrophoben Interaktionschromatographie zeigte, dass die Peroxidase in den Fraktionen 23 – 25 eluierte. Auch nach diesem Schritt wurde ein Rest an Laccase-Aktivität in den Fraktionen nachgewiesen. Das Protokoll der Reinigung der Peroxidase ist in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: Bilanzierung der gesamten Reinigung der Peroxidase.

Probe	Volumen	Laccase- und Peroxidase-Aktivität [U L ⁻¹]	Gesamt-Aktivität [U]	Ausbeute [%]
Kulturüberstand	600,0	83,2	49,9	100
konzentrierter Kulturüberstand	60,0	434,0	26,0	52,1
nach IEX	15,0	760,0	11,4	22,8
nach HIC	66,0	228,0	7,5	15,0

Mit den gepoolten und konzentrierten (5.4.2) Fraktionen wurde zur Visualisierung der Enzyme eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt (5.4.4). Nach der Fokussierung wurde das Gel geteilt und eine Hälfte mit kolloidalem Coomassie gefärbt (5.4.4.1; Abbildung 2.19).

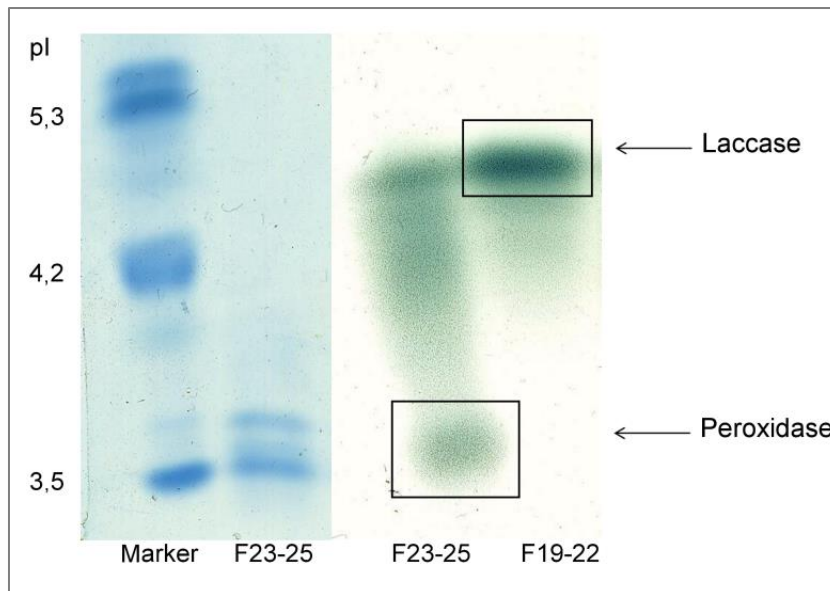


Abbildung 2.19: IEF Analyse der gepoolten FPLC-Fractionen. Kolloidale Coomassie Färbung (links), ABTS-Aktivitätsfärbung (rechts).

Die Peroxidasen wurden mittels ABTS-Aktivitätsfärbung auf der anderen Gelhälfte sichtbar gemacht (5.4.4.2). Anhand des Vergleichs der beiden Gelstücke konnten so die gesuchten Peroxidase-Banden zugeordnet werden. Die Aktivitätsfärbung wies, anders als im Coomassie-gefärbten Teil, eine Laccase-Bande auf, die ein deutliches Schmierern zeigte. Die Peroxidase-Bande erschien bei der Aktivitätsfärbung erst nach Zugabe der Wasserstoffperoxid-Lösung und konnte somit eindeutig identifiziert werden. Auf Höhe der detektierten Peroxidase-Bande waren im Coomassie-gefärbten Teil des IEF-Gels drei Banden zu erkennen.

2.3.2 Sequenzierung und Homologievergleich der Peroxidase

Die drei detektierten Peroxidase-Banden (POX1–POX3) wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und am Institut für Anorganische und Analytische Chemie (IAAC) nach Verdau mit Trypsin mittels LC-MS/MS mit Elektrospray-Ionisation (ESI) sequenziert (5.4.5; Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Gefundene Peptidfragmente in der LC-ESI-MS/MS Analyse der isolierten Peroxidase-Banden.

Peptide Fragment	POX1	POX2	POX3
VACPDGVNTATNAACCSLFALR	x	x	x
DDLQQNLFNDNGQCGEDVHESLR	x	x	x
GTLFPGTAGNQGEVESPLQGEIR	x	x	x
LPVFIGRPNNAVAPAPDK	x	x	x
TACEWQSFVNNQR	x	x	x
TVPEPFDSVDTILAR	x	x	x
KLTNRFQAVFTK	x	x	x
LQSDFELARDSR	x		
LQSDFELAR	x	x	x
FQAVFTK	x	x	x
TACEWQSFVNNQRK	x	x	

Die hohen Homologien der Ergebnisse der Sequenzierungen legen nahe, dass es sich bei den drei isolierten Peroxidase-Banden vermutlich um Isoenzyme handelt. Ferner ergab ein Datenbankabgleich (UniProt, 14.02.2013), dass die gefundenen Peroxidasen hohe Homologien (99%) zu einer Mangan-Peroxidase (MnP) aus *Spongipellis* sp. (UniProt Zugriffsnummer Q2HWK0) zeigten (Abbildung 2.20).

10	20	30	40	50	60
MAFKSLAAFL	TLAAFQVANA	ALTRRVACPD	GVNTATNAAC	CSLFALRDDL	QQNLFNDNGQC
70	80	90	100	110	120
GEDVHESLRL	TFHDAIGIGS	NGGGGADGSI	AIFEDIETAF	HANAGIDEII	NEQKPFLARH
130	140	150	160	170	180
NITVGDFIQF	AGALGVSNCP	GAPRLPVFIG	RPNNAVAPAPD	KTVPEPFDSV	DTILARFADA
190	200	210	220	230	240
GNFSTVEVVW	LLISHTIAAA	DLVDPTIPGT	PFSTPETFD	TQFFVETQLK	GTLFPGTAGN
250	260	270	280	290	300
QGEVESPLQG	EIRLQSDFEL	ARDSRTACEW	QSFVNNQRKL	TNRFQAVFTK	MTVLGNDVNS
310	320	330	340	350	
LIDCSELIPE	PPAFTGSATF	PAGFSVNDVE	QACEATPEPT	LATDGPVTS	VAPVPPS

Abbildung 2.20: N-terminale Peptidsequenz einer MnP (Zugriffsnummer Q2HWK0) aus *Spongipellis* sp. und deren Homologien zu einer Peroxidase aus *Irpex consors*. Gefundene ESI-MS/MS Peptidfragmente (rot), Signalpeptid (fett).

2.3.3 Klonierung einer putativen versatilen Peroxidase aus *Irpelex consors*

2.3.3.1 Ableitung der Primer

Die Aminosäuresequenz der Mangan-Peroxidase aus *Spongipellis* sp. (Q2HWK0) wurde mittels Datenbankabgleich (<http://www.jgi.doe.gov/>, Zugriff am 01.11.13) mit den Genomen anderer Pilze verglichen (geblastet, 5.4.14). Hierbei ergab sich eine gute Übereinstimmung ($E\text{-value } 1 \cdot 10^{-169}$) mit einer Mangan-Peroxidase (MnP) aus dem Basidiomyceten *Cerrena unicolor* (CUN), dessen Genom vollständig sequenziert ist (Abbildung 2.21).

Spongipellis_Sp._Q2HWK0	MAFKSLAAFLTLAAFQVANAALTRRVACPDGVNTATNAACCSLFALRDDLQQLFDNGQC
Cerrena_Unicolor_357111	MAFKLAAFLTLAALQVANAALTRRVACPDGVNTATNAACCSLFALRDDLQANLFDNGQC
	****.*****.*****
Spongipellis_Sp._Q2HWK0	GEDVHESLRLTFHDAIGIGSNG-----GGGADGSIAIFEDIETAFHANAGIDEI
Cerrena_Unicolor_357111	GEDVHESLRLTFHDAIGIGSNGSVLTLDVVKYSGGGADGSIAIFEDIETAFHANAGVDEI

Spongipellis_Sp._Q2HWK0	INEQKPFLARHNITVGDFIQFAGALGVSNCPGAPRLPVFIGRPNVAVAPADKTVPEPFDS
Cerrena_Unicolor_357111	INEQKPFLARHNITVGDFIQFAGALGVSNCPGAPRLPVFLGRPNATAVAPADGTVPEPFDS
	*****.*****.*****
Spongipellis_Sp._Q2HWK0	VDTILARFADAGNFSTVEVVWLLISHTIAAADLVDPTIPGTPFDSTPETFDTQFFVETQL
Cerrena_Unicolor_357111	VDSILARFADAGGFSAVEVVWLLISHTVAAADLVDPTIPGTPFDSTPDVFDTQFFVETQL
	*:*****.*:*****.*****.*****
Spongipellis_Sp._Q2HWK0	KGTLFPGTAGNQGEVESPLQGEIRLQSDFELARDSRTACEWQSFVNNQRKLTNRQAVFT
Cerrena_Unicolor_357111	KGTLFPGTAGNQGEVQSPLKGMRLQSDFELARDSRTACEWQSFVNNQNKLNRFAAFA
	*****.***.***.*****.***.***
Spongipellis_Sp._Q2HWK0	KMTVLGNDVNSLIDCSELIPEPPAFTGSATFPAGFSVNDVEQACEATPFPTLATDGPVVT
Cerrena_Unicolor_357111	KMTVLGHNAADLIDCSEVIPTPPTFTGSATFPAGFSINDVEQACAATPFPTLSTDPGPVVT
	*****:.. .*****:* **:******.***** *****:*****

Abbildung 2.21: Vergleich der Aminosäuresequenzen der MnP (357111) aus *C. unicolor* und der MnP (Q2HWK0) aus *Spongipellis* sp.

Anhand der Nukleotidsequenz der MnP aus *C. unicolor* wurden Primer im Bereich vollständig homologer Aminosäuresequenzen der beiden Enzyme für die Amplifizierung und Sequenzierung der Peroxidase aus *I. consors* abgeleitet (5.4.9; Abbildung 2.22).

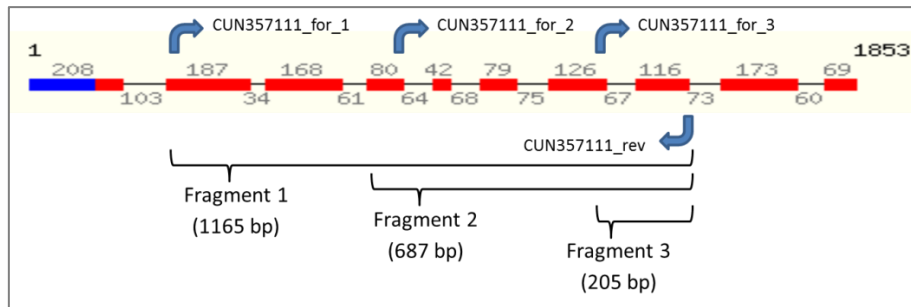


Abbildung 2.22: Lage der entworfenen Primer in der Nukleotidsequenz der MnP (357111) aus *C. unicolor*. Nicht-translatierter Bereich (blau), Exons (rot), Introns (schwarz).

In ersten Experimenten wurden die drei Primer-Paare mit isolierter gDNA (5.4.6) aus *I. consors* in PCR-Versuchen getestet (Abbildung 2.23).

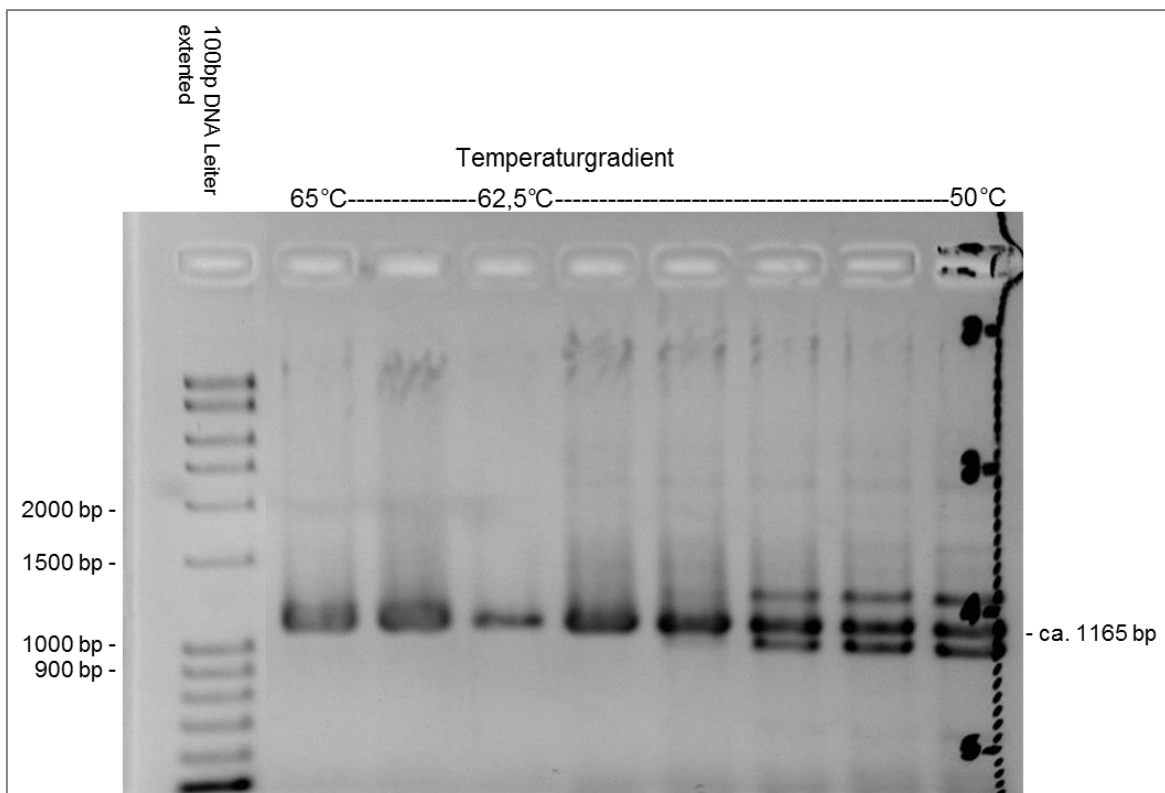


Abbildung 2.23: Gradienten-PCR der entworfenen Primer CUN357111_for1 und CUN357111_rev und gDNA aus *I. consors*.

Die Kombination der Primer CUN357111_for1 und CUN357111_rev ergab ein Fragment gewünschter Größe (1165 bp). Die Sequenzierung zeigte allerdings, dass es sich dabei um Mischsequenzen handelte. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen in 2.3.2, die auf ein Vorhandensein mehrerer Isoenzyme der Peroxidase hindeuteten.

2.3.3.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Zur Amplifizierung der cDNA-Sequenz wurde an verschiedenen Kulturtagen Gesamt-RNA (5.4.7) aus dem Pilzmyzel von *I. consors* mit hoher Peroxidase-Aktivität im Kulturüberstand (5.2.2.5) isoliert (Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Gesamt-RNA-Konzentrationen aus *I. consors* an verschiedenen Kulturtagen.

Probe	Konzentration [ng μL^{-1}]	A 260/280	A 260/230
ICO T9	300	1,8	1,0
ICO T12-1	163	1,3	0,4
ICO T12-2	169	1,3	0,4
ICO T12-3	12	2,2	1,0
ICO T12-4	15	2,2	0,6
ICO T14-1	30	2,1	1,0
ICO T14-2	30	2,3	0,5
ICO T15-1	305	2,1	0,8
ICO T15-2	361	2,0	1,3

Zur Kontrolle des Ergebnisses der RNA-Isolierung wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (3%, 5.4.11) durchgeführt. Die Existenz zweier klarer Banden an 18S-rRNA und 28S-rRNA bestätigte den Erfolg der Isolierung (Abbildung 2.24).

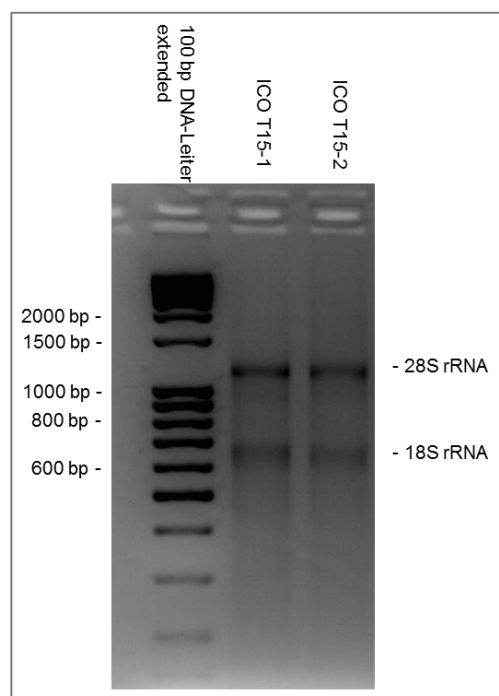


Abbildung 2.24: Agarosegel zur RNA-Qualitätskontrolle exemplarisch dargestellt für die Probe von Kulturtag 15.

Eine Untersuchung auf gDNA-Verunreinigungen in den RNA-Proben (5.4.7) fiel negativ aus. Im nächsten Schritt erfolgte die Erststrangsynthese der cDNA durch reverse Transkription mit den isolierten RNA-Proben (T9–T15) als Template (5.4.8). Nach Verdau von Rest-RNA wurde der cDNA-Erststrang als Template zur spezifischen Amplifizierung der Peroxidase-codierenden cDNA verwendet. Hierfür wurden die Primer CUN357111_for_1 und Oligo(dT)₁₂₋₁₈ eingesetzt (Abbildung 2.25).

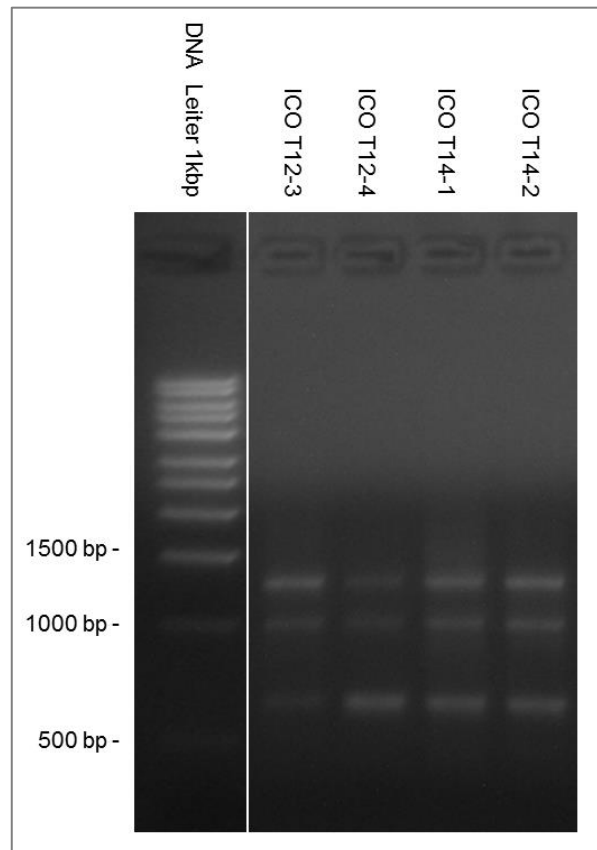


Abbildung 2.25: Kontrollgel zur spezifischen Amplifizierung der cDNA mit den Primern CUN357111_for_1 und Oligo(dT)₁₂₋₁₈.

Die Proben T12-3+4 und T14-1+2 zeigten drei Banden, die auf einer Höhe von ca. 1.300 bp, 1.100 bp und 700 bp liefen. Alle Banden gleicher Höhe wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (5.4.12). Anschließend wurden die Banden mit einer Lauflänge von ca. 1.300 bp und 1.100 bp sequenziert (5.4.14).

2.3.3.3 Klonierung und Identifizierung der Peroxidase aus *Irpex consors*

Wie bereits bei der Amplifizierung der gDNA (2.3.3.1), zeigten auch die Sequenzierungsergebnisse der beiden cDNA Banden (1300 bp und 1100 bp) Mischsequenzen. Zur eindeutigen Identifizierung wurde das cDNA-Gemisch bei ca. 1100 bp (Abbildung 2.25), mit einem Poly-A-Überhang erneut amplifiziert, in einen TOPO[®] TA Vektor kloniert und in *Escherichia coli* TOP10[™] als Wirtsorganismus transformiert (5.4.13). Die LB_{AMPX}-Platten (5.2.1.1) wurden mit unterschiedlichen Volumina des Transformations-Ansatzes beschichtet (Abbildung 2.26).

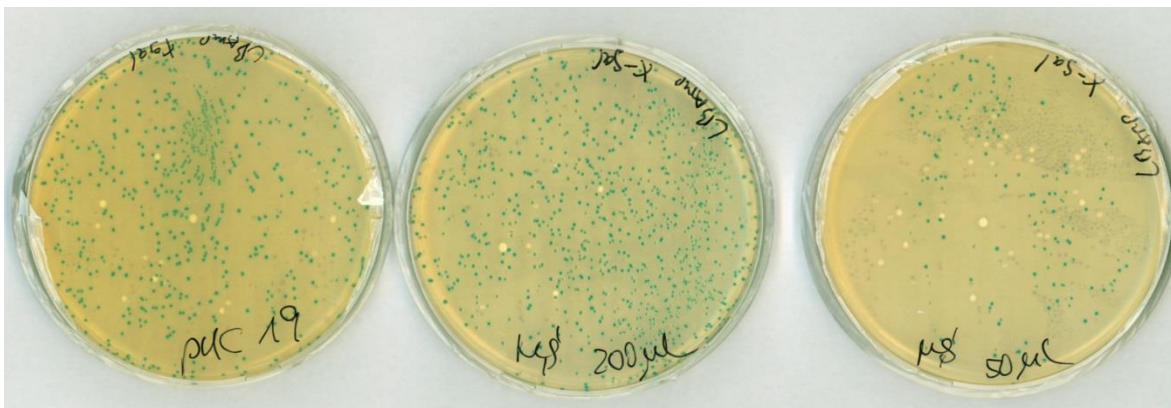


Abbildung 2.26: Transformierte *E. coli* Kultur der TOPO[®] TA Klonierung der cDNA aus *I. consors*. Kontrolle puc19 (links), 200 µl Ansatz (Mitte), 50 µl Ansatz (rechts).

Auf der rechten Platte waren einige weiße, positive Klone zu erkennen. Von diesen wurden 18 gepickt und über Nacht in LB-Medium (5.2.1.1) kultiviert. Der Restriktionsverdau mit *EcoR* I (5.4.13.6) nach der Plasmid-Isolierung (5.4.13.5) zeigte bei den Klonen 3, 8 und 11 das gesuchte Fragment bei ~1100 kb.

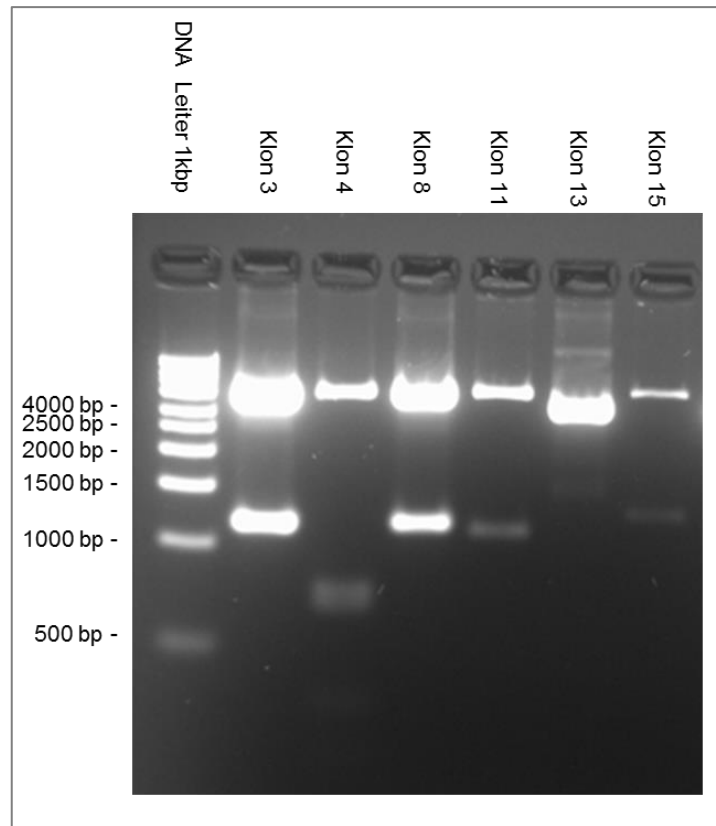


Abbildung 2.27: *EcoRI* Restriktionsverdau der Plasmid-DNA der transformierten *E. coli* Kulturen.

Die Sequenzierungen der Klone 3 und 8 waren identisch und zeigten große Homologien zu der Nukleotid-Sequenz der MnP aus *C. unicolor*. Klon 11 zeigte nur am 3'-Ende Homologien und unterschied sich sonst stärker von den anderen beiden Klonen und der Vergleichssequenz von *C. unicolor*. Mit Hilfe der Primer CUN357111_for, CUN357111_rev, sowie den Vektor-spezifischen Primern M13for/rev konnten Teilstücke der Nukleotid-Sequenz der Peroxidase aus *I. consors* sequenziert werden. Für eine vollständige Sequenzierung des Fragments und zur Identifizierung des 5'- und des 3'-Endes der cDNA wurden auf Grundlage der erhaltenen Sequenzen neue spezifische Primer abgeleitet (Abbildung 2.28).

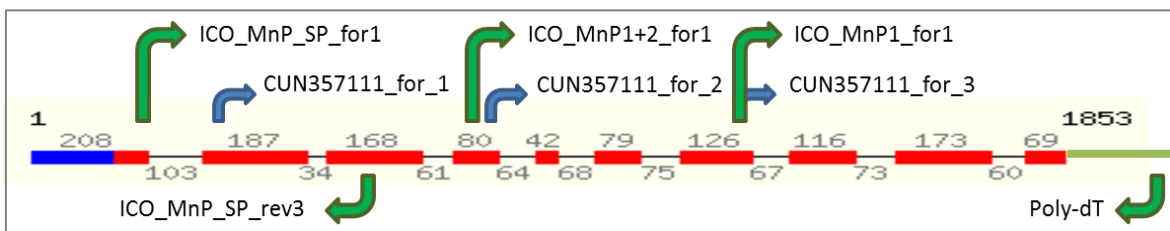


Abbildung 2.28: Lage der neuen Primer (grüne Pfeile) in der Nukleotidsequenz der MnP (357111) aus *C. unicolor*. Nicht-translatierter Bereich (blau), Exons (rot), Introns (schwarz).

Der *forward*-Primer ICO_MnP_SP_for1 wurde auf Grundlage der übersetzten Signalpeptid-Aminosäuresequenz von *Spongipellis* sp. entwickelt. Der dazu generierte *reverse*-Primer ICO_MnP_SP_rev3 liegt in dem bereits sequenzierten Bereich. Mit Hilfe dieses Primer-Paares sollte nun das noch fehlende 5'-Ende amplifiziert und sequenziert werden. Die PCR-Reaktion (5.4.10) und die anschließende Sequenzierungen lieferten ein Fragment (~370 bp), das nahtlos an die bereits vorhandene Sequenz anknüpfte. Für die Amplifizierung des 3'-Endes wurde der Primer ICO_MnP1_for1 auf Grundlage der bereits erhaltenen Sequenzen entworfen. Mit der Kombination der Primer ICO_MnP1_for1/Poly-dT konnte das gesuchte Fragment des 3'-Endes (~600 bp) amplifiziert (5.4.10) und mittels *blunt-end* Ligation in *E. coli* zwischenkloniert werden (5.4.13). Die Sequenzen der Amplifikate konnten aus den isolierten Plasmiden (5.4.13.5) nach Restriktionsverdau (5.4.13.6) und anschließender Sequenzierung bestimmt werden. Diese zeigten erneut hohe Homologien zu der Peroxidase aus *C. unicolor*. Auf Grundlage der neu gewonnenen Informationen aus den zusammengesetzten Sequenzen wurde schließlich das Primer-Paar ICO_MnP_complete_for1/rev1 abgeleitet. Das Primer-Paar deckte die komplette codierende Sequenz der Peroxidase ab. Die zugehörige PCR-Reaktion mit diesen Primern lieferte ein Fragment von ~1.100 bp. Die PCR-Produkte wurden mittels *blunt-end* Ligation in *E. coli* zwischenkloniert (5.4.13) und mittels Kolonie-PCR (5.4.13.4) auf positive Klone geprüft (Abbildung 2.29).

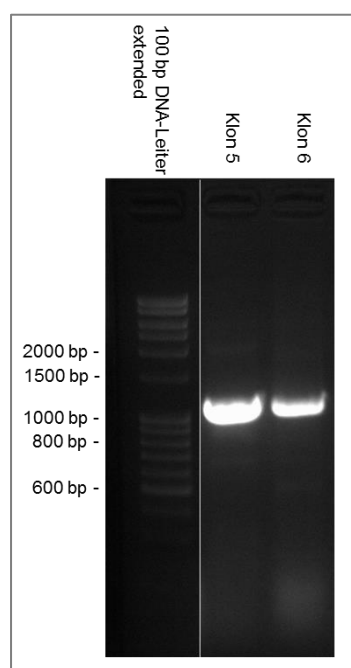


Abbildung 2.29: Kolonie-PCR der Transformanten des ICO_MnP_complete_for1/rev1 Fragments.

Die Klone 5 und 6 zeigten das gesuchte Fragment bei ~1.100 bp. Die Plasmide beider Klone wurden isoliert (5.4.13.5) und das klonierte Fragment durch die Firma Eurofins MWG Operon sequenziert (5.4.14). Die vollständige codierende Nukleotidsequenz der klonierten Peroxidase aus *I. consors* ist in Abbildung 2.30 dargestellt.

```
GTTGCTTGCCCAGATGGCGTCAACACTGCGACCAACGCAGCCTGCTGCTCTTTGTTGCTCTCCGTGATGATCTCCAACAGAACCTCTTCG
ACAACGGACAATGTGGTGAAGATGTCCACGAATCCCTTCGCTCACCTCCACGATGCTATCGGTATCGGCTCAAACGGTGGTGGAGGTGC
CGACGGTTCTATCGCCATTTTCGAAGACATCGAAACCGCCTCCACGCGAACCGTGGTATTGACGAAATTCAATGAGCAGAAGCCCTTC
CTTGCTAGGCACAACATCACGGTTGGTGACTTCATTCAATTCGCTGGTGTCTTTGGTGTGAGCAACTGCCCTGGTGTCTCTCGTTTGCCTG
TCTTCATCGGTGCTCCCAACGCCGTGCCCCCGCTCCCGACAAGACTGTCCCCGAACCATTGATAGTGTGACACTATTCTTGCTCGTTT
CGCCGATGCTGGTAACTTACGACCCGTGGAAGTCGCTGCTGCTCATCTCTCACACGATCGCGGCAGCCGATCTTGTCGACCCTACCATT
CCTGGAACACCCCTTTGACTCTACCCCCGAGACTTTCGACACTCAATCTTTCGTCGAGACCCAGTTAAAGGGAACGCTCTTCCCCGGAACCG
CTGAAACCAAGGCGAGGTCGAGTCCCCCTTGCAGGGTGAATTCGCTCTCAATCCGACTTTGAGCTCGCACGAGACAGCAGGACCGCATG
TGAATGGCAATCGTTCGTCACAACCAACGCAAACCTACCAACCGATTCCAAGCGTCTTACCAAGATGACCGTGTGGGTAAACGACGTC
AACAGCCTCATTGATGCTCCGAGCTCATCCCTGAGCCACCCGCCTTCACTGGTTACGCGACTTTCCTGTGGGTCTCTGTCAACGATG
TTGAGCAAGCTTGGCAGGCTACGCCATTCCTCCACTCTCGCACTGATCCCGGTCCGGTCACTTCTGTCGCTCTGTCCCCCTTCGTAA
999 bp
```

Abbildung 2.30: Vollständige cDNA-Sequenz der klonierten, putativen versatilen Peroxidase aus *I. consors*.

Die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des prozessierten Proteins hat eine Länge von 332 Aminosäuren bei einem berechneten Molekulargewicht von 35,2 kDa. Die übersetzte Aminosäuresequenz der Peroxidase aus *I. consors* zeigte eine 100%ige Übereinstimmung zu der MnP aus *Spongipellis* sp. (Q2HWK0, Abbildung 2.21).

```
VACPDGVNTATNAACCSLFLRDDLQONLFDNGQCGEDVHESLRLTFHDAIGIGSNGGGGADGSIAIFEDIETAFHANAGIDEIINEQKPF
LARHNITVGDFIQFAGALGVSNCPGAPRLPVFIGRPNVAVAPAPDKTVPEPFDSVDTILARFADAGNFSTVEVVWLLISHTIAAADLVDPTI
PGTTPFDSTPETFDTQFFVETQLKGLTFPGTAGNQGEVESPLQGEIRLQSDFELARDSRTACEWQSFVNNQRKLTNRFAQVFTKMTVLGNDV
NSLIDCSELIPEPPAFTGSATFFPAGFSVNDVEQACEATPFPTLATDPGPVTSVAVPPPS
332 aa
```

Abbildung 2.31: Vollständige Aminosäuresequenz der klonierten, putativen versatilen Peroxidase aus *I. consors*.

Die identifizierte Peroxidase stellt eines der 3 gefundenen Isoenzyme dar (2.3.2). Die Identifizierung der anderen beiden Enzyme wurde bis dato nicht verfolgt.

2.3.3.4 Homologie und phylogenetische Einordnung der putativen versatilen Peroxidase

Die vollständige Nukleotidsequenz der putativen versatilen Peroxidase aus *I. consors* wurde mittels BLAST-Suche in der GenBank®-Datenbank (5.4.15) nach homologen Peroxidasen untersucht. Daraus resultierten zahlreiche Homologien zu Peroxidasen aus anderen Basidiomyceten. Aus diesen Ergebnissen wurden Vertreter mit hoher Homologie ausgewählt, die alle zu den Enzymklassen

EC 1.11.1.13 (MnP) und EC 1.11.1.16 (versatile Peroxidase) gehörten. Anhand dieser Nukleotidsequenzen und den daraus abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen wurde die putative versatile Peroxidase aus *I. consors* unter Verwendung der Software MEGA 4.0 (*Neighbor-Joining* Methode, *p-distance* als Abschätzungsmodell, paarweises Löschen von Lücken) phylogenetisch eingeordnet. Als *Outgroup* wurde eine Lignin-Peroxidase (EC 1.11.1.14) verwendet (Abbildung 2.32).

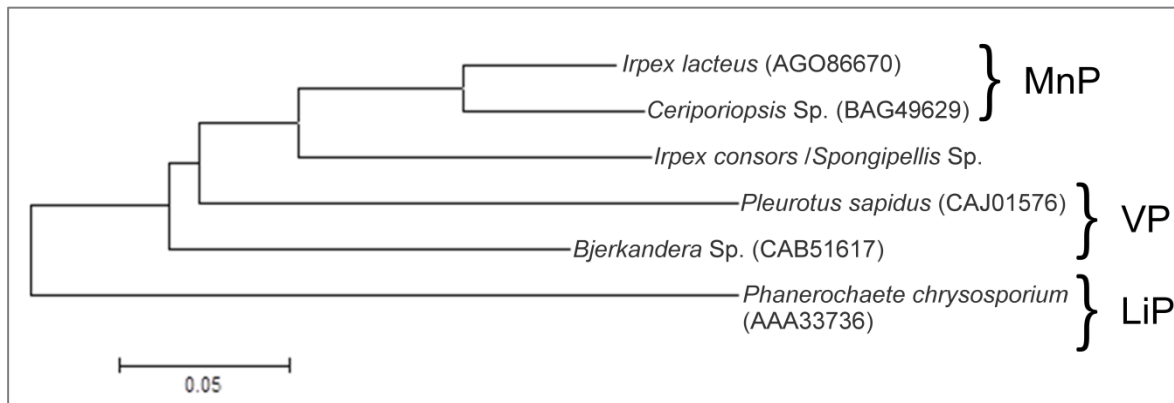


Abbildung 2.32: Phylogenetischer Baum des Alignments der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen.

2.4 Biotransformation des Herbizides Dimethenamid-P durch Basidiomyceten

2.4.1 Screening von Basidiomyceten zur Umsetzung von Dimethenamid-P

Durch Basidiomyceten sollten Bodenmetabolite des Herbizides DMTA-P und seines Derivates M27 generiert werden. Dafür wurde zunächst ein Emers-Screening mit einem breiten Spektrum (verschiedene Familien und Gattungen) von 29 verschiedenen Basidiomyceten (5.5.1.1) durchgeführt. Als Referenz-Medium diente ein Minimalmedium mit $1,5 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, auf dem die meisten Pilze merkliches Wachstum zeigten. Für das Screening wurde ein Minimal-Medium ($0,15 \text{ g L}^{-1}$ Glucose) mit verschiedenen Konzentrationen an DMTA-P supplementiert (5.2.1.3) und das Pilzwachstum dokumentiert (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Wachstum von Basidiomyceten auf den Screening-Platten.
 BW = Blindwert. Pilze für das Flüssig-Screening hervorgehoben.

Pilz	Wachstum nach 14 Tagen [%]*				BW
	Medium A c(DMTA-P) 0,25 g L ⁻¹	Medium B c(DMTA-P) 0,50 g L ⁻¹	Medium C** c(DMTA-P) 0,50 g L ⁻¹	Medium D c(DMTA-P) 1,00 g L ⁻¹	
<i>Agrocybe aegerita</i>	100	50	50	10	100
<i>Armillaria gallica</i>	20	5	5	0	20
<i>Ceriporiopsis resinascens</i>	0	0	0	0	0
<i>Coprinus sterquilinius</i>	0	0	0	0	50
<i>Clitocybe vibecina</i>	20	0	0	0	30
<i>Clitopilus hobsonii</i>	40	0	30	0	100
<i>Cyathus africanus</i>	50	30	30	0	70
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	20	0	10	0	100
<i>Ganoderma applanatum</i>	70	0	0	0	100
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	30	20	5	0	70
<i>Hericium erinaceus</i>	10	20	10	0	20
<i>Hypholoma sublateritium</i>	30	5	5	0	100
<i>Irpex consors</i>	100	100	70	30	100
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0	0	0	0	50
<i>Macrolepiota procera</i>	30	0	0	0	100
<i>Marasmius rotula</i>	0	0	0	0	100
<i>Mycena polygramma</i>	0	0	0	0	0
<i>Mycena pseudocorticola</i>	10	0	0	0	20
<i>Omphalotus olearius</i>	30	30	30	10	70
<i>Phallus impudicus</i>	0	0	0	0	30
<i>Phanerochaete tamariciphila</i>	30	0	0	0	100
<i>Phellinus igniarius</i>	40	5	5	0	100
<i>Pholiota aurivella</i>	50	40	40	0	100
<i>Pleurotus eryngii</i>	50	40	40	0	100

Pilz	Wachstum nach 14 Tagen [%]*				BW
	Medium A	Medium B	Medium C**	Medium D	
	c(DMTA-P) 0,25 g L ⁻¹	c(DMTA-P) 0,50 g L ⁻¹	c(DMTA-P) 0,50 g L ⁻¹	c(DMTA-P) 1,00 g L ⁻¹	
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	100	30	50	0	100
<i>Pycnoporus coccineus</i>	50	20	30	0	100
<i>Stereum sp.</i>	100	70	70	30	100
<i>Trametes suaveolens</i>	100	50	50	0	100

*100% \triangleq vollständige Bedeckung der Agar-Platte; **1,5 g L⁻¹ Glucose

Die Ergebnisse dienen zur Vorauswahl für die folgende Flüssigkultivierung. Wie Tabelle 2.8 zu entnehmen, wurde das Wachstum aller Basidiomyceten mit steigender DMTA-P Konzentration zunehmend gehemmt. Bei 16 Basidiomyceten war bei einer Konzentration von 0,5 g L⁻¹ DMTA-P kein bzw. nur noch geringes Wachstum feststellbar. Die anderen 13 der 29 Basidiomyceten zeigten relativ gutes Wachstum auf Agar-Platten mit einer DMTA-P Konzentration von 0,5 g L⁻¹. Bei 10 dieser 13 Basidiomyceten wurde das Wachstum durch 0,5 g L⁻¹ DMTA-P im Vergleich zum Blindwert um mehr als 50% gehemmt. Einzig die drei Basidiomyceten *Hericium erinaceus*, *I. consors* und *Stereum sp.* zeigten bei dieser Konzentration kaum Unterschiede im Wachstum. *I. consors* bewuchs sowohl die Referenzplatte als auch die mit 0,5 g L⁻¹ DMTA-P supplementierte Platte vollständig (Abbildung 2.33).

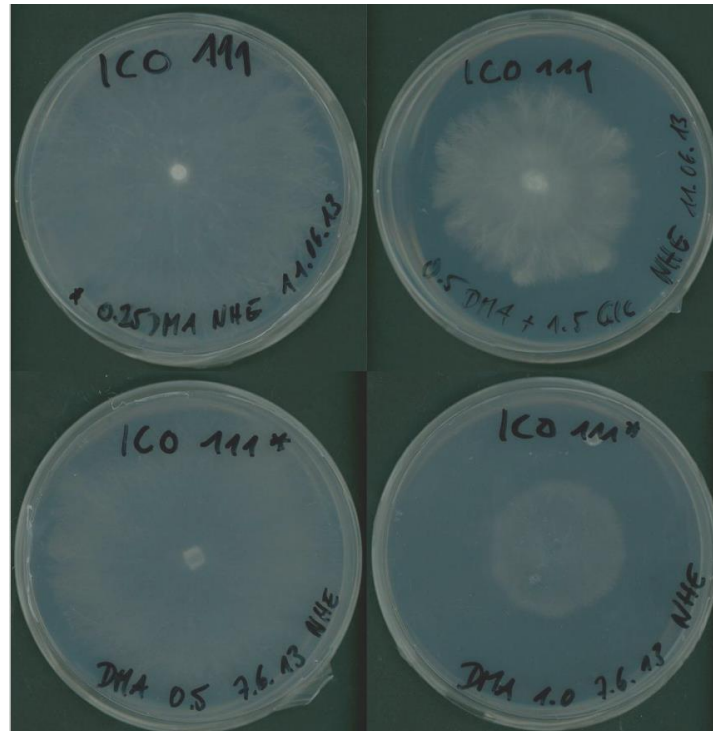


Abbildung 2.33: Screening-Agar von *I. consors* mit steigender DMTA-P Konzentration. (0,25 g L⁻¹, links oben; 0,50 g L⁻¹ + 1,50 g L⁻¹ Glucose, rechts oben; 0,50 g L⁻¹, links unten; 1,00 g L⁻¹, rechts unten).

13 Basidiomyceten (Tabelle 2.8) wurden in Flüssigkulturen auf ihr Potential zur Biotransformation von DMTA-P untersucht. Hierfür wurden die Pilze in einem chemisch definierten Medium (5.2.1.3), das nur Glucose (0,15 g L⁻¹) als C-Quelle und Ammoniumnitrat (1,0 g L⁻¹) als N-Quelle enthielt, für 14 Tage kultiviert (5.2.2.4). In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben gezogen und mit Ethylacetat extrahiert. In allen Kulturen war zwar Myzelwachstum zu beobachten, allerdings war nur bei 5 Basidiomyceten eine Abnahme der DMTA-P-Konzentration festzustellen (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Abnahme der DMTA-P-Konzentration in Flüssigkulturen nach 12 Kulturtagen.

Pilz	Abnahme c(DMTA-P)
<i>Agrocybe aegerita</i>	10%
<i>Irpex consors</i>	52%
<i>Pycnoporus coccineus</i>	31%
<i>Stereum sp.</i>	5%
<i>Trametes suaveolens</i>	89%

Aufgrund der Ergebnisse aus dem Flüssig-Screening (Tabelle 2.9) wurden die beiden Pilze *I. consors* und *T. suaveolens* für weitere Untersuchungen ausgewählt. Im Unterschied zum Screening wurden die beiden Pilze in Flüssigkulturen vorkultiviert (5.2.2.2), um eine Steigerung der eingesetzten Biomasse und eine bessere Reproduzierbarkeit zu erzielen. Der hohe Umsatz an DMTA-P durch *T. suaveolens* konnte im zweiten Flüssig-Screening nicht mehr reproduziert werden. Trotz der durch die Vorkultivierung erhaltenen höheren Mengen an Biomasse wurde ein Umsatz des DMTA-P von nur 14% erreicht. *I. consors* zeigte hingegen denselben Umsatz an DMTA-P (50%) nach 8 Kulturtagen wie im ersten Flüssig-Screening und wurde deshalb für nachfolgende Untersuchungen ausgewählt.

2.4.2 Biotransformation von Dimethenamid-P in Flüssigkultur

Trotz der Abnahme der DMTA-P-Konzentration um fast 50% konnten in den HPLC-Chromatogrammen der Umsetzung mit *I. consors* zunächst keine größeren Signale detektiert werden. In Folge dessen wurde die Glucose-Konzentration in den Flüssigkulturen von $0,15 \text{ g L}^{-1}$ auf $3,0 \text{ g L}^{-1}$ erhöht. Dies führte zu einer Steigerung der Umsetzung des DMTA-P von ~50% auf ~70%. Der Verlauf der Konzentrationen von Glucose und DMTA-P während der Kultivierung mit *I. consors* sind in Abbildung 2.34 gezeigt.

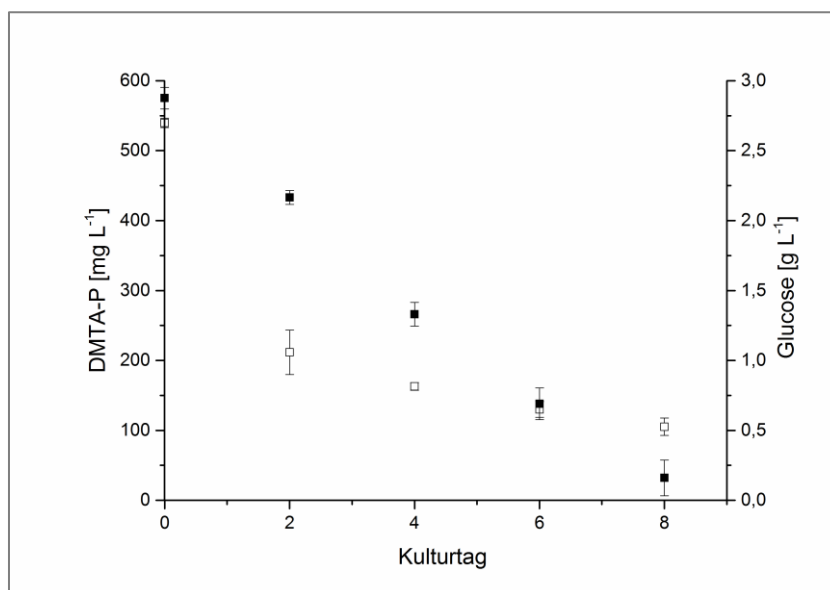


Abbildung 2.34: Abnahme der DMTA-P- (weiß) und Glucose-Konzentration (schwarz) im Verlauf der Kultivierung mit *I. consors*.

Da ab Kulturtag 6 keine bedeutsame Abnahme der DMTA-P-Konzentration mehr zu beobachten war, wurden alle weiteren Kulturen nach Kulturtag 6 beendet. Durch die Steigerung der Glucose-Konzentration war neben dem erhöhten Umsatz auch die Bildung von 4 neuen, dominierenden Signalen in den Chromatogrammen erkennbar (Abbildung 2.35).

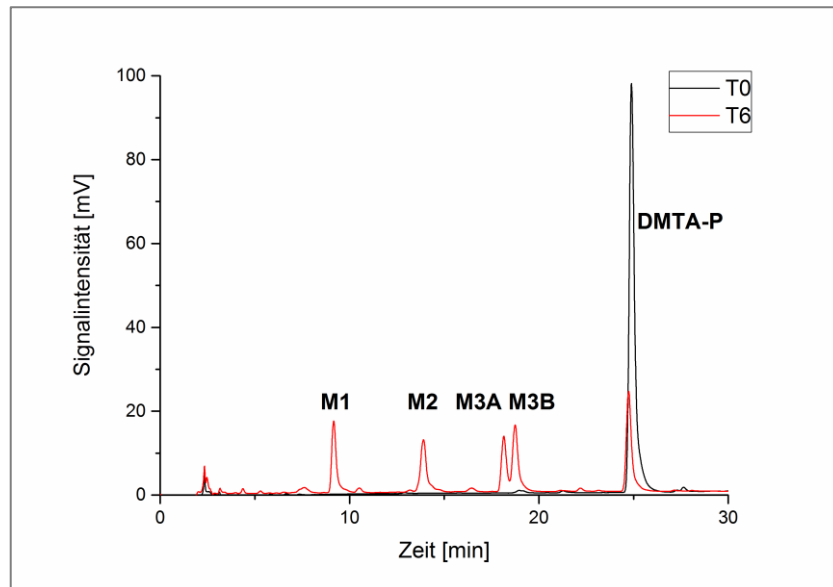


Abbildung 2.35: Ausschnitte aus den HPLC-UV-Chromatogrammen der Kulturüberstände ($0,5 \text{ g L}^{-1}$ DMTA-P, $3,0 \text{ g L}^{-1}$ Glucose) von *I. consors* an den Kulturtagen 0 und 6.

Die vier Signale (**M1**, **M2**, **M3A**, **M3B**) erschienen im Kulturverlauf simultan und waren ungefähr von gleicher Intensität. Die Retentionszeiten der neuen Signale ließen auf polarere Produkte schließen. Zur Steigerung der Umsetzung des Substrats wurde sowohl die Konzentration des Substrats als auch der Glucose variiert (Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10: Umsatz von DMTA-P durch *I. consors* in Flüssigkultur nach 6 Kulturtagen.

Konzentration DMTA-P [g L^{-1}]	Konzentration Glucose [g L^{-1}]	Umsatz DMTA-P
0,10	3,00	$78,5\% \pm 3,2\%$
0,25	3,00	$73,0\% \pm 0,8\%$
0,50	0,15	$50,4\% \pm 1,3\%$
0,50	3,00	$75,6\% \pm 1,8\%$
0,50	10,00	$86,4\% \pm 1,7\%$

Maximale Umsatzraten wurden durch Erhöhung der Glucose-Konzentration auf $10,00 \text{ g L}^{-1}$ erzielt. Die Reduzierung der DMTA-P Konzentration auf $0,25 \text{ g L}^{-1}$ und $0,10 \text{ g L}^{-1}$ hatte keinen wesentlichen Einfluss auf den Umsatz.

2.4.3 Identifizierung der Hauptmetabolite von Dimethenamid-P

2.4.3.1 Untersuchung der Kulturüberstände mittels LC-MS

Die Kulturüberstände von *I. consors* (Kulturtag 6) wurden mittels LC-MS im ESI-positiv Modus untersucht (5.5.4). Dabei unterschieden sich die Signalintensitäten der einzelnen Signale im Vergleich zu den HPLC-UV-Messungen (2.4.2), und einige weitere Nebenmetabolite wurden zusätzlich detektiert (Abbildung 2.36).

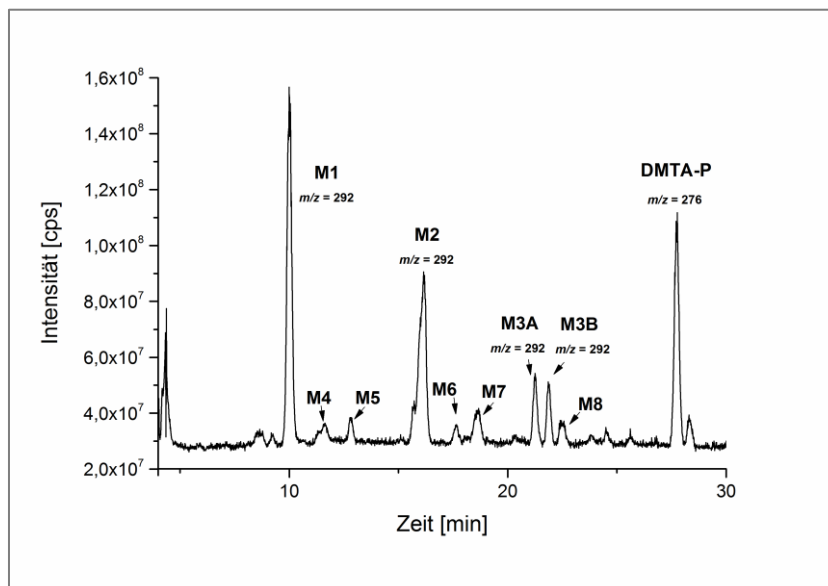


Abbildung 2.36: LC-MS-Chromatogramm des Kulturüberstandes von *I. consors* an Kulturtag 6.

Die Messungen ergaben, dass alle vier Hauptmetabolite (**M1**, **M2**, **M3A**, **M3B**) die gleichen Molekülmassen besaßen ($m/z 292 [M+H]^+$). Die Molekülmasse leitet sich aus einer Sauerstoff-Addition an das Zielmolekül DMTA-P ($m/z 276 [M+H]^+$) ab. Sowohl bei Metabolit **M4** als auch Metabolit **M5** war ebenfalls das charakteristische Molekülion $m/z 292 [M+H]^+$ zu beobachten. Die Metabolite **M6** und **M8** wiesen eine Molekülmasse von $m/z 308 [M+H]^+$ auf, die auf mögliche Dioxygenierungen hindeuteten. Bei Metabolit **M7** waren keine höheren Molekülmassen als $m/z 262 [M+H]^+$ detektierbar, was eine mögliche Dealkylierung dieser Spezies vermuten ließ.

2.4.3.2 Isolierung der Hauptmetabolite mittels präparativer HPLC

Für die vollständige Identifizierung der Metabolite sollten diese mittels präparativer HPLC (5.5.5.3) isoliert werden. Zunächst wurden die Kulturüberstände extrahiert und der Extrakt vom Lösungsmittel befreit (5.5.5.1). Der ölige Extrakt (~200 mg) wurde im Eluentengemisch aufgenommen und in mehreren Läufen auf einer C₁₈-Umkehrphase aufgetrennt (Abbildung 2.37).

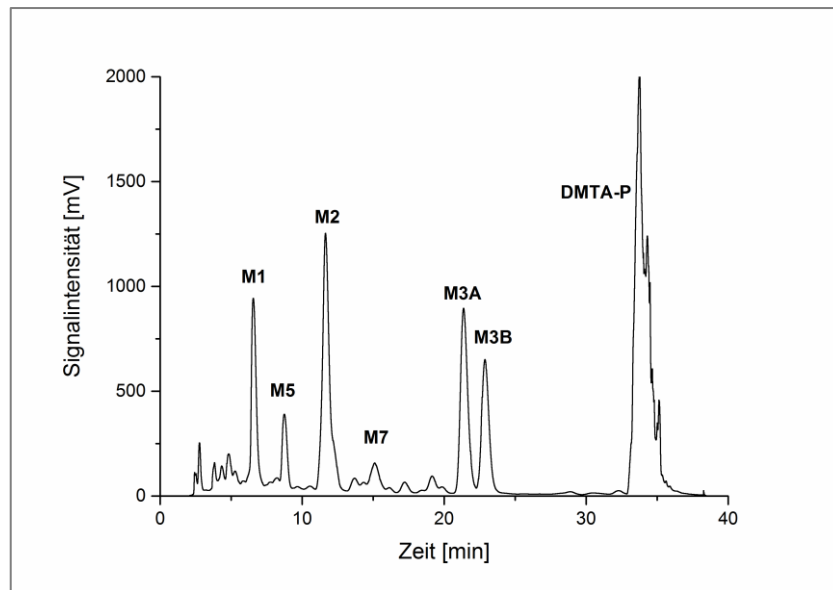


Abbildung 2.37: Ausschnitt aus einem Chromatogramm der präparativen HPLC vom Extrakt des Kulturüberstandes von *I. consors* (0,5 g L⁻¹ DMTA-P).

Durch die verwendete isokratische Trennmethode konnten die Hauptmetabolite **M1**, **M2**, **M3A** und **M3B** isoliert werden. Zudem gelang es, die weniger intensiven Signale **M5** und **M7** in ausreichender Reinheit zu isolieren. Die Isolate wurden extrahiert, vom Lösungsmittel befreit und bis zur weiteren Untersuchung bei -21 °C tiefgefroren.

2.4.3.3 Gaschromatographische Untersuchung der isolierten Metabolite mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Massen und Fragmentierungen der isolierten Metabolite (2.4.3.2) sollten durch GC-MS Analyse (5.5.6.1) ermittelt werden. Die gefundenen Massen und Fragmentierungen der Metabolite sind in Tabelle 2.11 zusammengefasst.

Tabelle 2.11: Ermittelte Massen und Fragmentierungen der isolierten Metabolite von DMTA-P.

Substanz	Mittels GC-MS detektierte Molekülionen [M ⁺] und Fragmente <i>m/z</i> , (relative Intensität)
DMTA-P	275 M ⁺ (1,5), 230 (43,1), 203 (20,8), 154 (100), 138 (10,6), 111 (4,7), 73 (3,6)
M1(<i>t_r</i> = 11,16 min)	275 M ⁺ (2,4), 230 (51,0), 203 (25,6), 154 (100), 138 (10,9), 111 (5,1), 73 (4,5)
M1(<i>t_r</i> = 14,37 min)	291 M ⁺ (1,0), 246 (1,6), 230 (44,1), 203 (23,4), 170 (4,0), 154 (100), 138 (11,2),
M2	291 M ⁺ (3,3), 246 (4,5), 203 (8,6), 202 (72,5), 166 (5,3), 152 (100), 126 (9,3)
M3A	291 M ⁺ (0,3), 246 (9,0), 192 (19,5), 170 (100), 160 (16,3), 127 (6,6), 72 (46,4)
M3B	291 M ⁺ (0,3), 246 (9,4), 192 (15,5), 170 (100), 160 (14,2), 127 (7,5), 72 (41,0)
M4	n.b.
M5	291 M ⁺ (0,4), 246 (9,2), 220 (5,3), 170 (4,7), 152 (100), 124 (2,4), 72 (13,0)
M6	n.b.
M7	261 M ⁺ (6,1), 230 (46,2), 203 (8,9), 154 (100), 138 (12,2), 126 (8,8), 111 (7,5)
M8	n.b.

Das Chromatogramm des Metaboliten **M1** wies 2 intensive Signale auf (Abbildung 2.38).

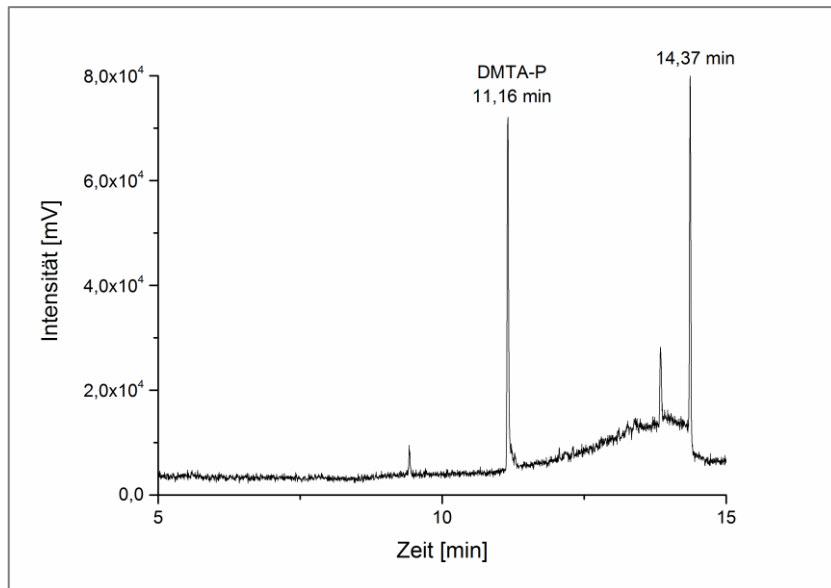


Abbildung 2.38: Ausschnitt aus dem Gaschromatogramm des isolierten Metaboliten **M1**.

Das Spektrum des Signals bei 11,16 min glich dem des DMTA-P mit einem Molekülion von m/z 275 M^{*+} und dem Hauptfragment bei m/z 154 (97% *identity*; NIST Datenbank). Das Signal bei 14,37 min zeigte das in 2.4.3.1 beobachtete Molekülion mit m/z 291 M^{*+} (Abbildung 2.39).

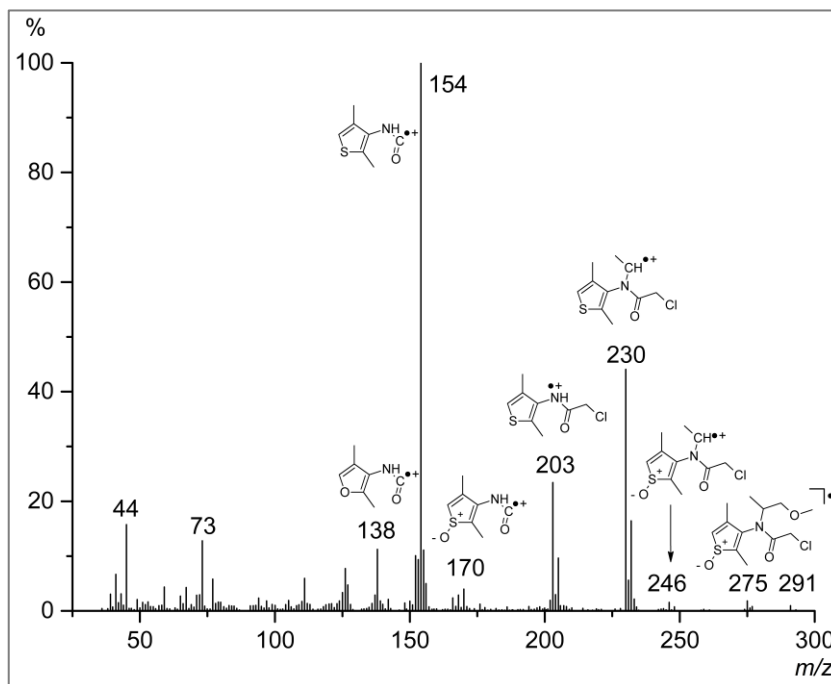


Abbildung 2.39: GC-Massenspektrum des isolierten Metaboliten **M1** mit plausiblen Fragmentationen ($t_r = 14,37$ min).

Zudem waren die gleichen Fragmente (m/z 275 und m/z 154) wie beim ersten Signal (11,16 min) erkennbar, allerdings tauchten hier zusätzlich die Fragmente m/z 246 und m/z 170 mit schwacher Intensität auf. Die Ergebnisse könnten auf ein

Hitze-instabiles Produkt (14,37 min) zurückzuführen sein, das durch die hohe Injektortemperatur von 250 °C teilweise zur Ausgangsverbindung DMTA-P zerfällt.

Metabolit **M2** wies ebenfalls das Molekölion m/z 291 $M^{\bullet+}$ auf, daneben auch das Fragmention m/z 246 von schwacher Intensität. Auffällig war, dass einige Fragmente eine um m/z 1 oder 2 geringere Masse (m/z 202 vs. 203 und m/z 152 vs. 154) im Vergleich zu **M1** aufwiesen. Das Fragmention m/z 170 wurde nicht beobachtet, was auf eine Wasser Eliminierung mit dem Produkt m/z 152 hindeutete (Abbildung 2.40).

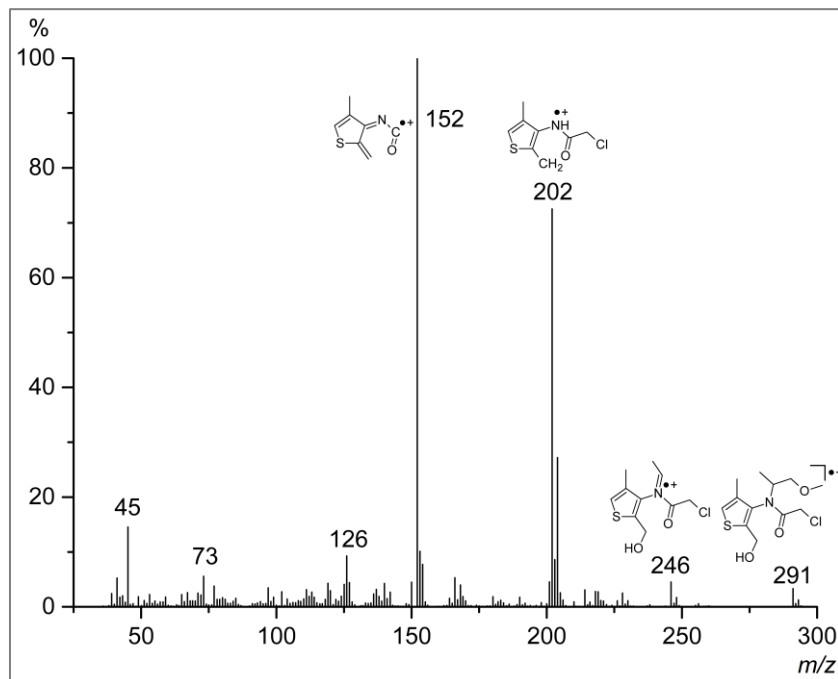


Abbildung 2.40: GC-Massenspektrum des isolierten Metaboliten **M2** mit plausiblem Fragmentionen ($t_r = 13,40$ min).

Die Fragmentierungsmuster der Metabolite **M3A** und **M3B** waren identisch und zeigten ein Molekölion von schwacher Intensität mit m/z 291 $M^{\bullet+}$. Lediglich die Retentionszeiten der beiden Metabolite **M3A** und **M3B** unterschieden sich (13,30 min bzw. 13,38 min). Die Hauptfragmentionen waren m/z 246 und m/z 170, was eindeutig auf eine Oxygenierung des Thiophenrestes hinwies, da die Massen der Fragmente m/z 230 und m/z 254 N-dealkylierte Formen des DMTA-P darstellten. In Abbildung 2.41 ist exemplarisch das Massenspektrum des Metaboliten **M3A** dargestellt.

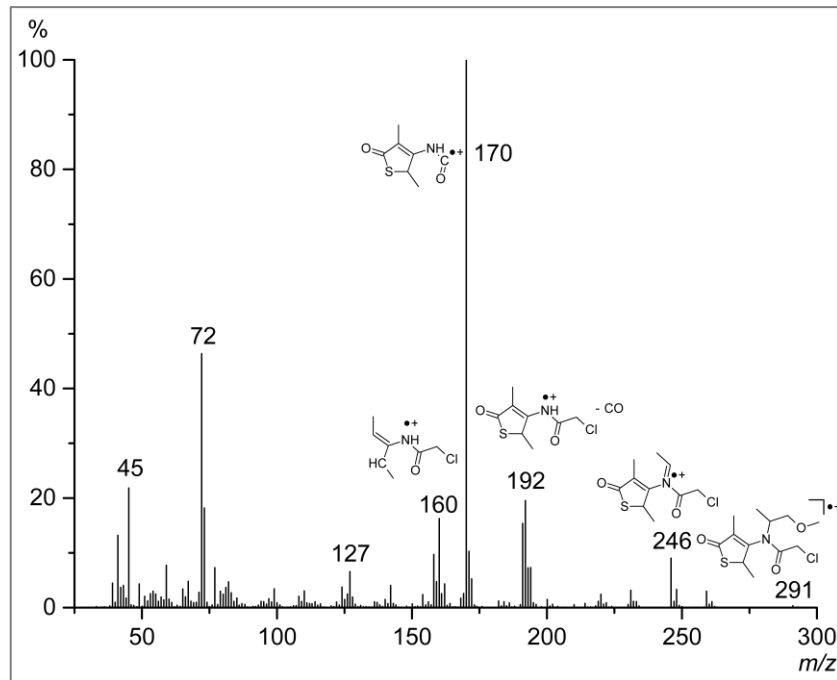


Abbildung 2.41: GC-Massenspektrum des isolierten Metaboliten **M3A** mit plausiblem Fragmentationen ($t_r = 13,30$ min).

Metabolit **M5** zeigte ein Molekülion bei m/z 291 und die Hauptfragmentationen m/z 246, 202, 170 und 152 (Abbildung 2.42).

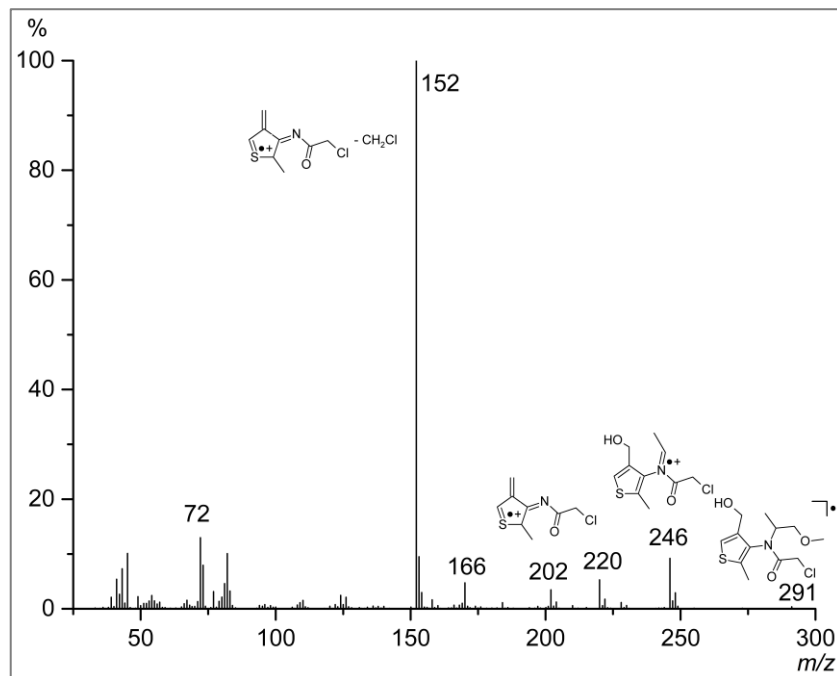


Abbildung 2.42: GC-Massenspektrum des isolierten Metaboliten **M5** mit plausiblem Fragmentationen ($t_r = 14,80$ min).

Letzteres könnte, wie bei **M2** postuliert, aus einer Wassereliminierung des Fragments m/z 170 hervorgegangen sein. Das Spektrum von **M5** glich dem Spektrum des Metaboliten **M2** sehr, weshalb hier ein oxygeniertes Regioisomer

von **M2** vermutet wurde. Bei Metabolit **M7** wurde ein Molekülion der Masse m/z 261 detektiert. Dies lässt bei sonst ähnlichen Fragmentationen wie beim Ausgangsmolekül (m/z 230, 203 und 154) auf eine O-Demethylierung des DMTA-P schließen (Abbildung 2.43).

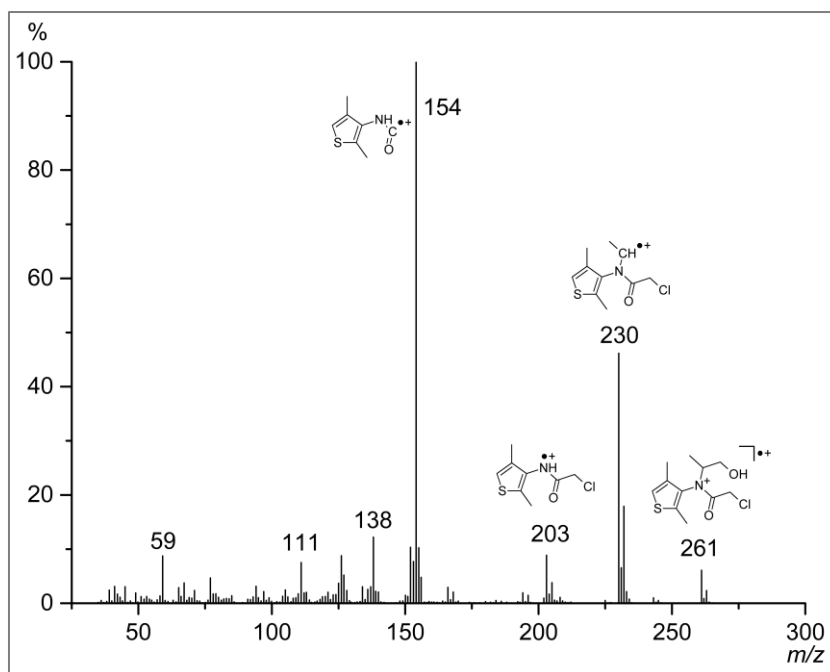


Abbildung 2.43: GC-Massenspektrum des isolierten Metaboliten **M7** mit plausiblen Fragmentationen ($t_r = 13,82$ min).

2.4.3.4 Strukturaufklärung der Hauptmetabolite

Für die vollständige Strukturaufklärung der Hauptmetabolite **M1**, **M2**, **M3A** und **M3B** war eine Analyse mittels NMR-Spektroskopie notwendig. Hierfür wurden die isolierten Metabolite in CDCl_3 gelöst und mittels 1D- und 2D-NMR Experimenten (5.5.6.2) analysiert.

Metabolit M1:

In den NMR-Spektren des Metaboliten **M1** waren Gemische aus mindestens 4 Substanzen zu erkennen, was die Strukturaufklärung des Metaboliten deutlich erschwerte (s. Anhang). Im DEPT-135-Spektrum von **M1** war keine Phasenumkehr der C-Atome beobachtbar. Das markanteste Merkmal war allerdings die starke Tieffeldverschiebung der aromatischen Kohlenstoffe im ^{13}C -Spektrum (1, 2, 3 und 4, Abbildung 2.44).

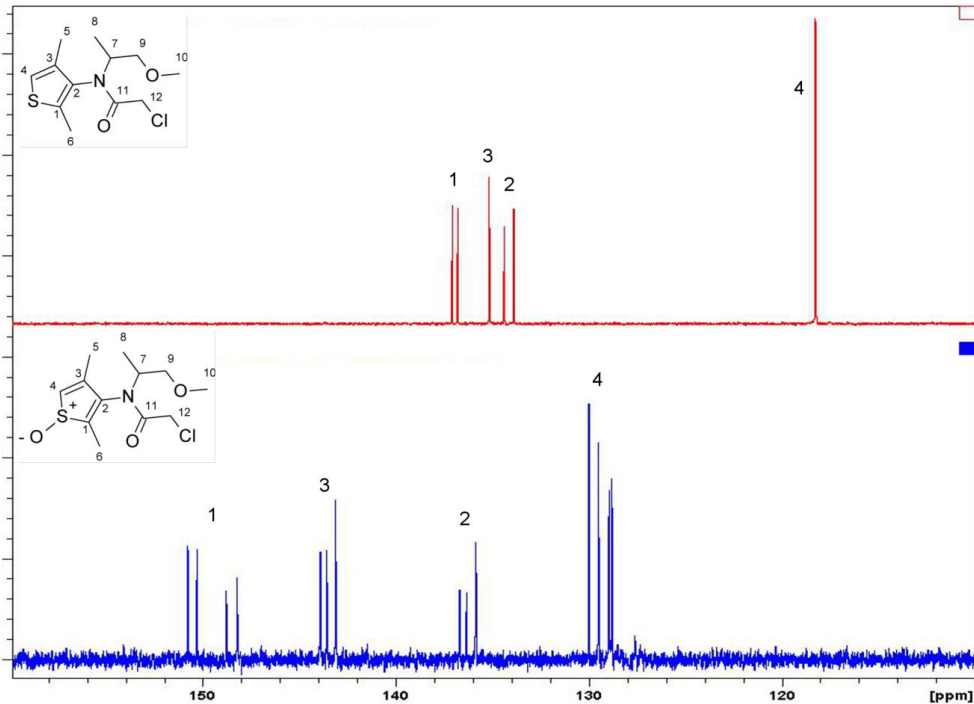


Abbildung 2.44: Ausschnitte aus den ¹³C-NMR-Spektren von DMTA-P (rot) und Metabolit **M1** (blau).

Die starke Verschiebung ist ein Indiz für die Verringerung der Elektronendichte im Thiophenring, wie sie bei Thiophen-S-Oxiden zu beobachten ist. Weitere MS/MS-Experimente (durchgeführt von Dr. Spielmeyer am LCB) wiesen eindeutig auf eine Sauerstoff-Addition an den Thiophenrest hin. Dies konnte vor allem an zwei Massenübergängen (m/z 292 \rightarrow 260, m/z 292 \rightarrow 127) gezeigt werden, bei denen das Isotopenmuster des Schwefels zu erkennen war (Abbildung 2.45).

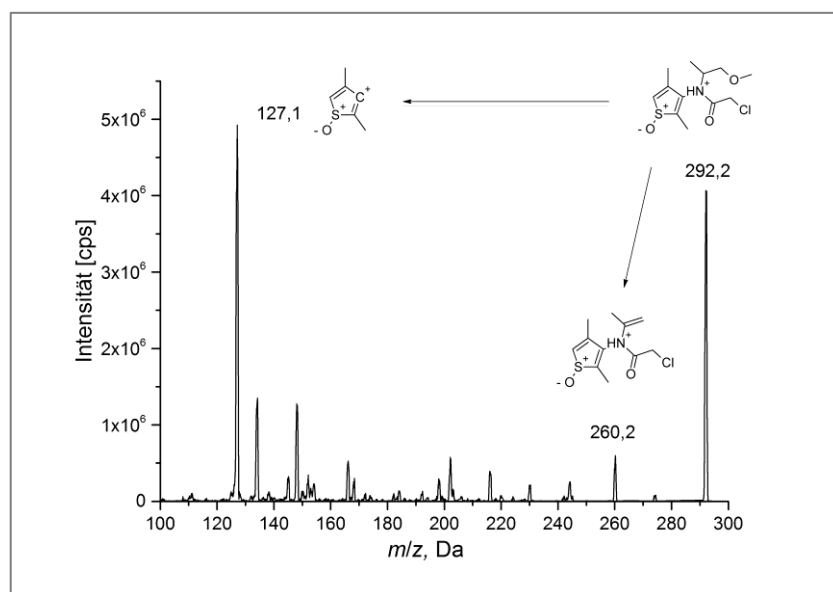


Abbildung 2.45: MS/MS-Fragmentierungsspektrum zwischen 9,7 und 10,2 min für die Masse m/z 292,2 des isolierten Metaboliten **M1**.

Zur Vervollständigung der Identifizierung wurde die Probe mittels AT-IR-Spektroskopie untersucht (5.5.6.3). Das Spektrum wies eine starke Bande bei 1041 cm^{-1} auf, welche im Bereich der S-O-Schwingung ($1060\text{--}1030\text{ cm}^{-1}$) liegt (Abbildung 2.46).

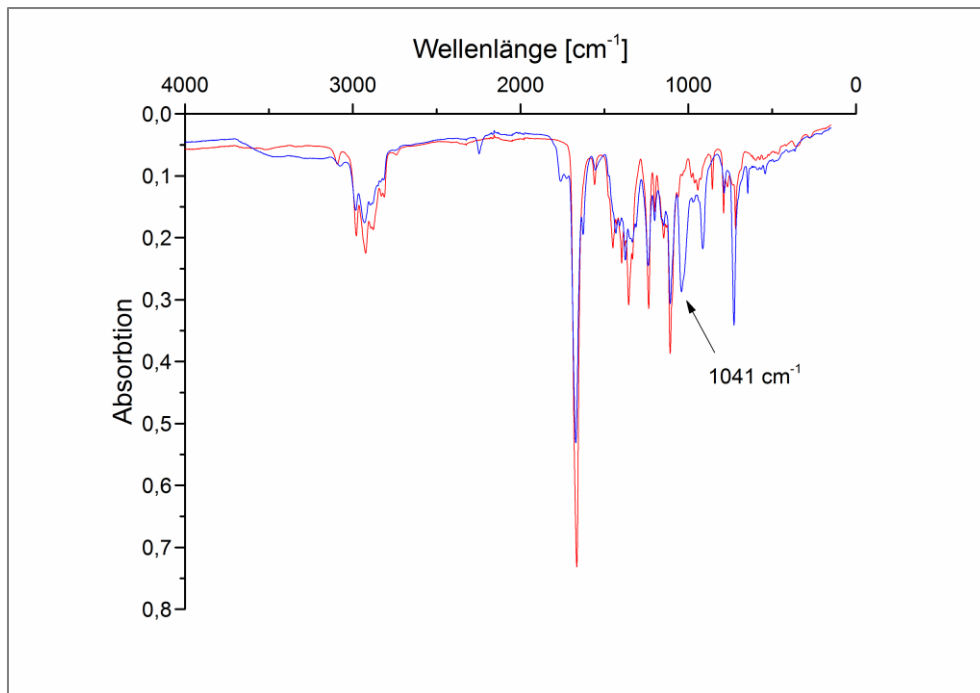


Abbildung 2.46: Ausschnitte aus IR-Spektren von DMTA-P (rot) und Metabolit **M1** (blau).

Die Kombination dieser Ergebnisse ergab eine Oxidation des Schwefels zum korrespondierenden S-Monoxid **M1** (Abbildung 2.47).

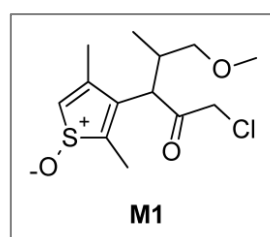


Abbildung 2.47: Struktur des isolierten Metaboliten **M1**, ein Thiophen-S-Oxid.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Beobachtungen in den GC-MS-Experimenten. Dort war bereits die Thermolabilität des Metaboliten **M1** beschrieben worden. Tatsächlich neigen Thiophen-Monoxide zum Zerfall in die Ausgangsverbindung durch Wärme- oder Lichtinduktion.

Metabolit M2:

In den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des Metaboliten **M2** zeigten die *N*-Alkylreste und *N*-Acylreste keine größeren Veränderungen im Vergleich zu DMTA-P (s. Anhang). Das auffälligste Merkmal in den ^1H -Spektren war das Verschwinden eines Methyl Singulettts der Position 6 bei gleichzeitigem Auftreten zweier Dupletts bei 4,55 ppm und 4,66 ppm der diastereotropen H-Atome (Abbildung 2.48).

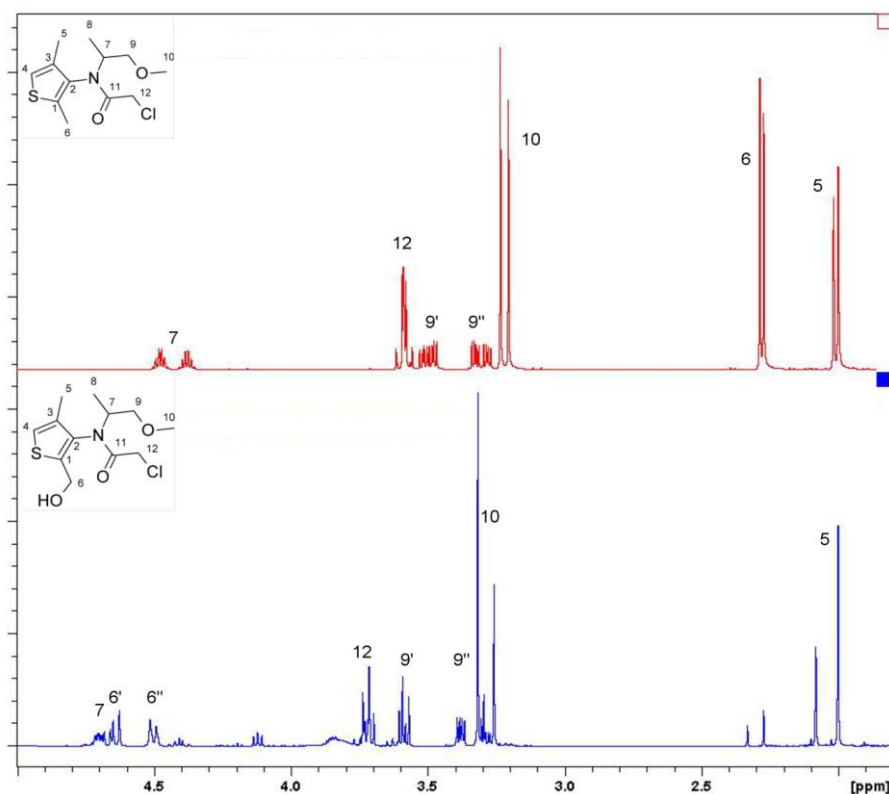


Abbildung 2.48: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren von DMTA-P (rot) und Metabolit **M2** (blau).

Wie in Abbildung 2.48 zu erkennen, waren auch in den NMR-Spektren des Metaboliten **M2** Signale von mindestens zwei weiteren Isomeren detektierbar. Es ist zudem gut zu erkennen, dass auch das ^1H -NMR-Spektrum des DMTA-P zwei Isomere enthielt. Im ^{13}C -Spektrum kam es zu einer Tieffeldverschiebung des C-6 Signals zu 56,8 ppm (s. Anhang). Gleichzeitig war eine Phasenumkehr dieses Signals im DEPT-135-Spektrum zu beobachten, was eine Hydroxylierung der Position 6 bestätigte. Eine Hydroxylierung von Position 5 konnte aufgrund der Kupplung des Methyl-Singulettts mit dem benachbarten aromatischen Proton (Position 1) ausgeschlossen werden (s. Anhang).

Metabolite M3A/M3B:

Die NMR-Analyse der Metabolite **M3A** und **M3B** ergab, dass diese chemisch identisch waren. Es handelte sich bei ihnen um ein Isomergemisch eines Thiolactons. Das charakteristischste Merkmal im ^{13}C -Spektrum des Thiolactons **M3A** bzw. **M3B** war das stark Tieffeld-verschobene Signal bei 196,0 ppm bzw. 196,1 ppm. Diese Verschiebung lag im Bereich der gewöhnlichen Carbonylkohlenstoff-Verschiebungen (230 – 180 ppm). Das gleichzeitige Verschwinden des aromatischen Protons (Position 4) bzw. Auftreten eines Quartetts bei 4,5 ppm (Position 6) im ^1H -NMR-Spektrum waren Anzeichen für eine Veränderung der DMTA-P-Grundstruktur. Die Verschiebungen der beiden anderen Stickstoffsubstituenten waren im Vergleich zur Ausgangsverbindung ähnlich. Exemplarisch ist dies am ^1H -NMR-Spektrum des Metaboliten **M3A** gezeigt (Abbildung 2.49).

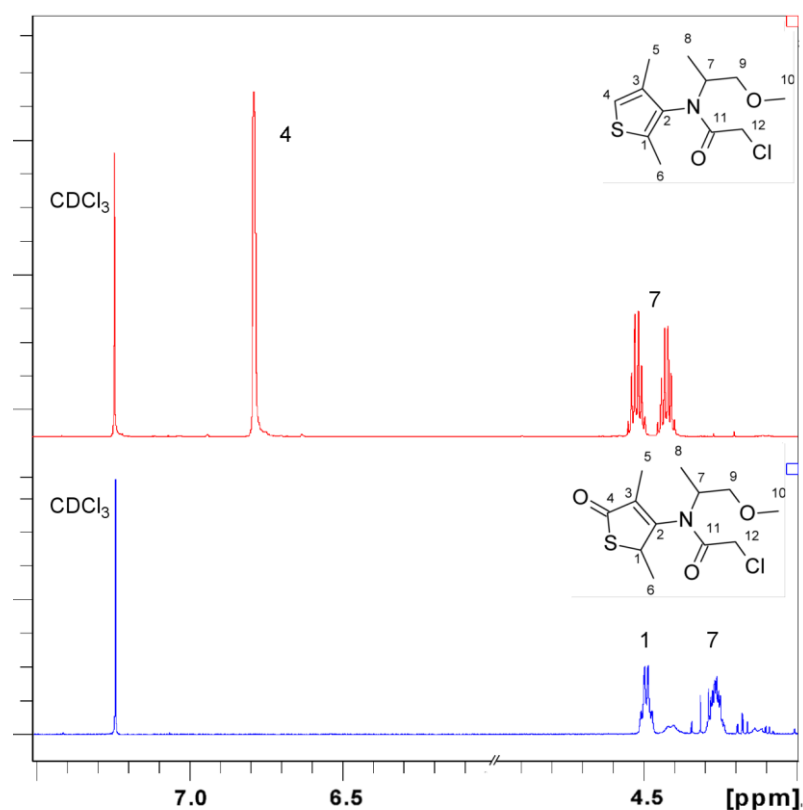


Abbildung 2.49: Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren von DMTA-P (rot) und Metabolit **M3A** (blau).

Das Thiolacton entsteht vermutlich durch eine Hydroxylierung der unsubstituierten Position des Thiophenrings. Das Intermediat **M IIIa** tautomerisiert daraufhin zur

Zwischenstufe **M IIIb**. Im letzten Schritt kommt es zu einem 1,3-H-Shift, aus dem das Endprodukt **M3A/B** hervorgeht (Abbildung 2.51).

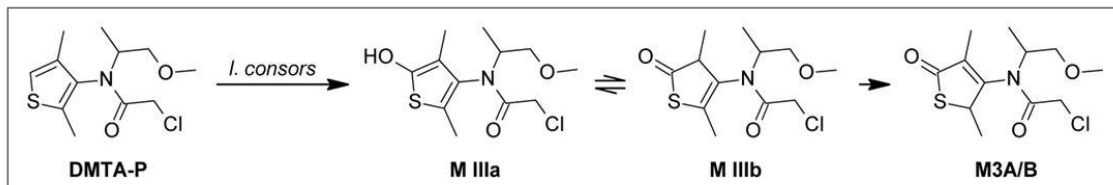


Abbildung 2.50: Möglicher Bildungsweg der Metaboliten **M3A/B**.

Zusammenfassung:

Die NMR-spektroskopischen Daten der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome der Thiophen-Einheit der Hauptisomere von **M1**, **M2**, **M3A** und **M3B** sind in Tabelle 2.12 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 2.12: Relevante ^1H - und ^{13}C -NMR Verschiebungen der Hauptisomere der isolierten Metabolite.

Metabolit	M1		M2		M3A		M3B	
	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)	$\delta(^1\text{H})$ (ppm)	$\delta(^{13}\text{C})$ (ppm)
1	-	151,8	-	141,8	4,49 (q, 1H)	45,7	4,61 (q, 1H)	46,1
2	-	136,8	-	133,4	-	160,9	-	160,1
3	-	144,2	-	135,5	-	137,3	-	138,4
4	6,75 (s, 1H)	131,0	6,97 (s, 1H)	120,7	-	196,1	-	196,0
5	2,01 (s, 3H)	14,8	2,05 (s, 3H)	14,2	1,57 (s, 3H)	19,0	1,53 (s, 3H)	18,8
6	2,27 (s, 3H)	11,1	4,66 (d, 1H) und 4,55 (d, 1H)	56,8	1,39 (d, 3H)	16,0	1,15 (d, 3H)	14,2
Struktur								

2.4.4 Biotransformation von C-13 markiertem Dimethenamid-P

In einem abschließenden Versuch sollten die in 2.4.3 ermittelten Metabolite aus ^{13}C -markiertem DMTA-P generiert werden. Dadurch sollte die finale Strukturaufklärung abgeschlossen und die Biotransformation des DMTA-P durch *I. consors* bestätigt werden. Die Kultivierung erfolgte gemäß 5.2.2.6. Hierbei wurde ein Gemisch aus DMTA-P und ^{13}C -DMTA-P (1:1, jeweils $0,25\text{ g L}^{-1}$) verwendet. Die gebildeten Hauptmetabolite (**M1**, **M2**, **M3A/M3B**) wurden isoliert (5.5.5) und massenspektrometrisch untersucht (5.5.6.1). Aufgrund der ^{13}C -Markierung der aromatischen Position des DM-TAP wurde die Isotopenmarkierung in den jeweiligen Fragmentationen der Metabolite detektiert (Abbildung 2.51 – 2.55).

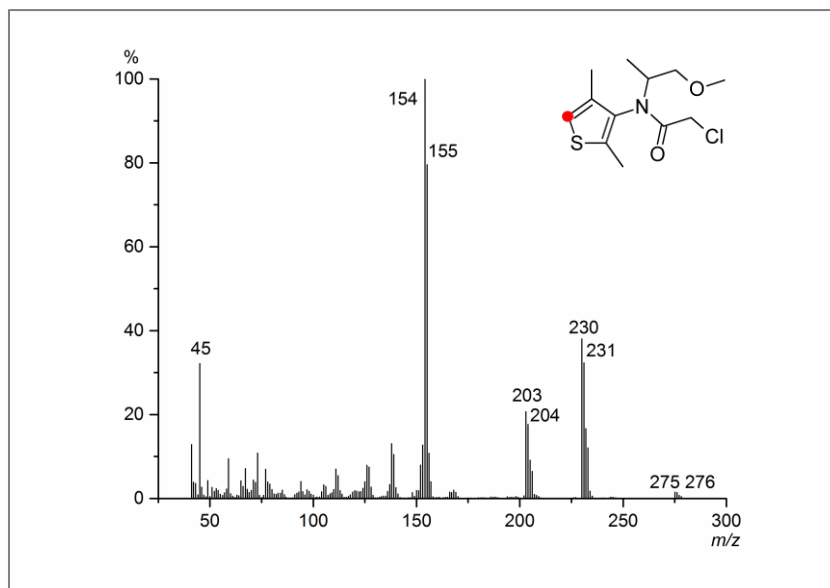


Abbildung 2.51: Struktur des ^{13}C -markierten DMTA-P und GC-Massenspektrum der Mischung (1:1) aus markierten und unmarkierten DMTA-P.

In allen Spektren waren die veränderten Masse-Ladungsverhältnisse im Vergleich zum unmarkierten DMTA-P deutlich zu erkennen. Bei Metabolit **M1** war das Molekülionensignal bei m/z 292 (M^+) zu beobachten, gepaart mit einem starken Signal bei m/z 155/154. Auch das Signal m/z 247/246, als Indiz für eine Sauerstoff-Addition, war im MS-Spektrum zu beobachten (Abbildung 2.52).

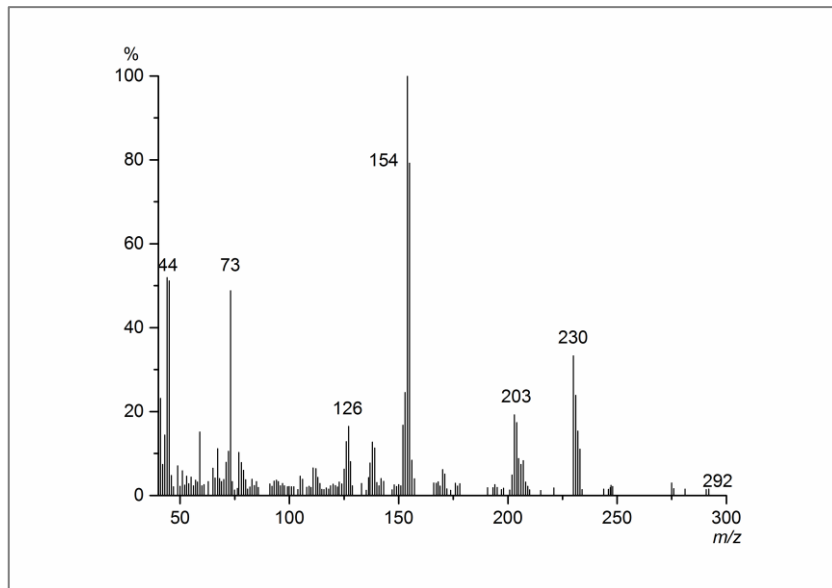


Abbildung 2.52: GC-Massenspektrum des isolierten Metaboliten **M1** mit ^{13}C -markiertem DMTA-P als Ausgangsverbindung.

Die Ergebnisse bestätigten die Position des Sauerstoffs am Thiophenring für den Metaboliten **M2** mit m/z 153/152, abgeleitet aus einer Wasser-Eliminierung aus m/z 170/171 (Abbildung 2.53).

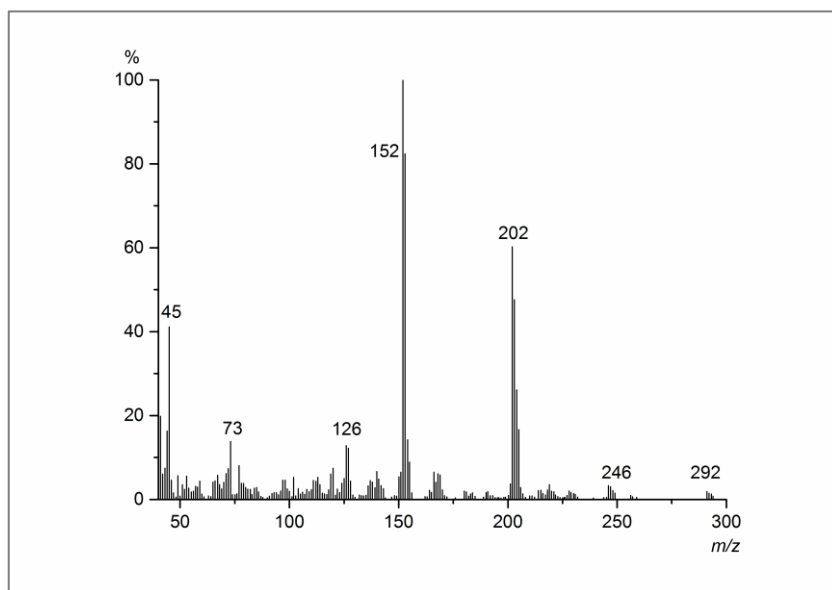


Abbildung 2.53: GC-Massenspektrum des isolierten Metaboliten **M2** mit ^{13}C -markiertem DMTA-P als Ausgangsverbindung.

Die Metaboliten **M3A** und **M3B** zeigten ein starkes Fragmentation bei m/z 171/170, was die Addition des Sauerstoffs an den Thiophenring in **M3A/B** belegte (Abbildung 2.54).

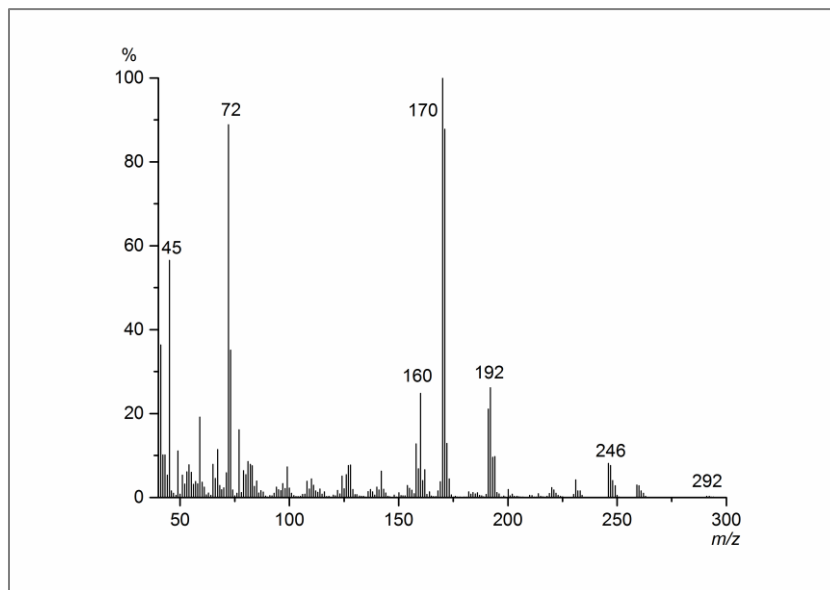


Abbildung 2.54: GC-Massenspektrum des isolierten Metaboliten **M3B** mit ^{13}C -markiertem DMTA-P als Ausgangsverbindung.

Insgesamt konnte mit Hilfe der Isotopenmarkierung des DMTAP eindeutig gezeigt werden, dass die isolierten Hauptmetabolite durch die Biotransformation von DMTAP mit *I. consors* gebildet wurden.

2.4.5 Weitere Versuche zur Umsetzung des Dimethenamid-P durch *Irpex consors*

Um erste Hinweise über die enzymatische Natur der Umsetzung zu erhalten, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt. Zunächst wurden über einen Kulturzeitraum von 12 Tagen Laccase-Aktivitäten im Kulturüberstand ($0,5 \text{ g L}^{-1}$ DMTA-P) der Umsetzung mit *I. consors* beobachtet. Die Aktivitäten schwankten jedoch innerhalb der Doppelbestimmung stark und betragen an den ersten beiden Kulturtagen (den Tagen des höchsten Umsatzes) weniger als 20 U L^{-1} . Um zu überprüfen, ob die Reaktion extra- oder intrazellulär abläuft, wurde das Pilzmyzel zum Zeitpunkt des höchsten Umsatzes vom Medium getrennt. Wie in Abbildung 2.34 gezeigt, sind die Abnahme der DMTA-P-Konzentration und die dafür verantwortliche Aktivität des Enzyms zwischen den ersten 12 h und 24 h am höchsten. Aus diesem Grund wurde eine Kultivierung von *I. consors* mit $0,5 \text{ g L}^{-1}$ DMTA-P nach 12 h unterbrochen und das Myzel abgetrennt (5.5.1.4). Gleichzeitig wurde eine hitze-inaktivierte Kontrolle von diesem Kulturzeitpunkt hergestellt und, wie die vom Myzel befreiten Kulturen, mittels HPLC-UV überprüft (Tabelle 2.13).

Tabelle 2.13: Übersicht über die DMTA-P-Konzentrationen.

Kultur	DMTA-P Konzentration			
	0 h	12 h		144 h
Standardbedingungen (Tabelle 5.15)	100%	-	81%	18%
	100%	Myzel entfernt nach 12 h	81%	76%
	100%	Myzel entfernt und Hitze-inaktiviert nach 12 h	62%*	62%

*nach Hitze-Inaktivierung gemessen.

Aus Tabelle 2.13 geht eindeutig hervor, dass durch das Entfernen des Pilzmyzels aus der Kultur nach 12 h keine merkbare Abnahme der DMTA-P-Konzentration auftrat. Die Umsetzung des DMTA-P betrug zu diesem Zeitpunkt bereits 19%. Die Abnahme von 5% über die weiteren 5 Kulturstage könnte auf mögliche Myzel-Reste im Kulturüberstand zurückzuführen sein, die durch das Zentrifugieren auf Grund ihrer geringen Dichte nicht abgetrennt wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Umsetzung des DMTA-P entweder durch intrazelluläre oder Membran-gebundene Enzyme katalysiert werde. Aus Tabelle 2.13 ist auch ersichtlich, dass durch die Hitze-Inaktivierung ein Teil des DMTA-P möglicherweise durch Zersetzung oder Addukt-Bildung verloren gegangen ist.

2.5 Biotransformation des Dimethenamid-P-Sulfonsäure-Derivates M27 durch Basidiomyceten

2.5.1 Weizenstroh induzierter Abbau von M27

In einer weiteren Versuchsreihe sollte das Sulfonsäure-Derivat M27 von DMTA-P durch Flüssigkultivierung mit Basidiomyceten transformiert werden. Die Basidiomyceten (5.5.2.1) wurden nach größtmöglicher Biodiversität (Familie, Lebensraum) ausgewählt und für das Screening (5.2.1.3) zur Biotransformation von M27 eingesetzt (5.2.2.4). Nur die Supplementierung mit Weizenstroh (20 g L⁻¹) in das M27-haltige Medium (0,1 g L⁻¹) führte zu einer vollständigen Umsetzung des Substrates. Dabei vermochten ausschließlich die Basidiomyceten *G. trabeum* und

I. consors das Substrat M27 vollständig umzusetzen. Nach 12 Kulturtagen war ein vollständiger Abbau von M27 in beiden Kulturen zu beobachten. Allerdings waren die neu gebildeten Metabolite so polar, dass sie unter den gegebenen Bedingungen nicht mit der Umkehrphase wechselwirkten und mit dem Injektionspeak eluierten (Abbildung 2.55).

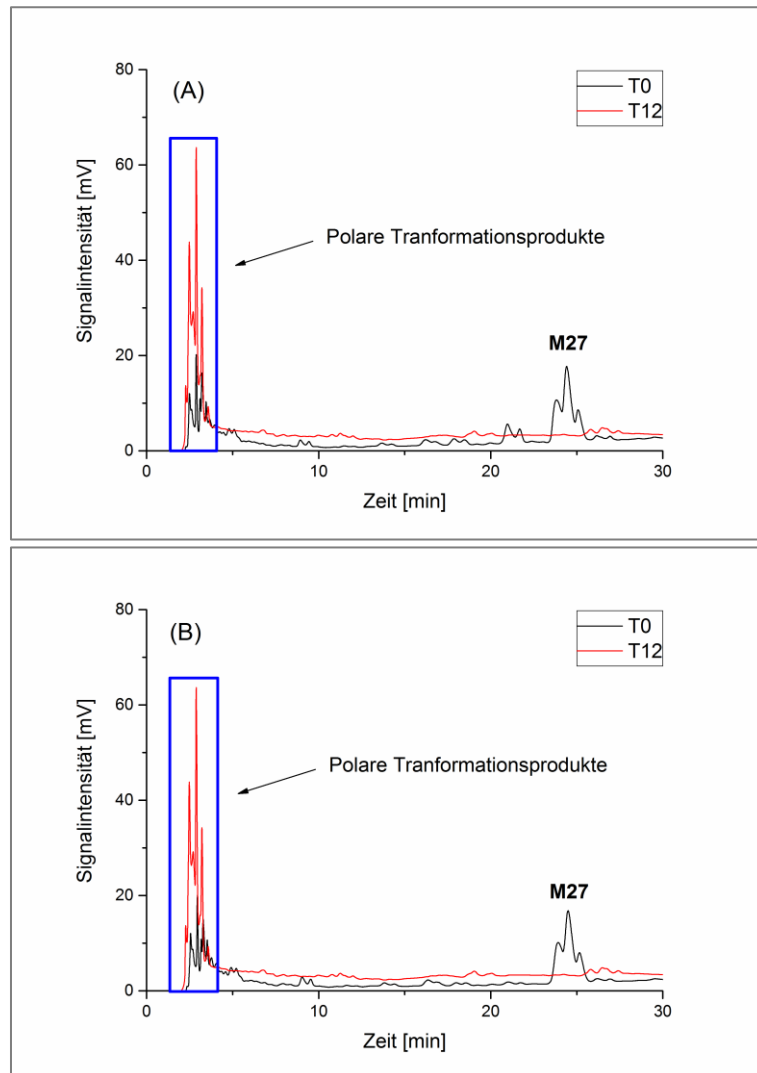


Abbildung 2.55: HPLC-UV-Chromatogramme der Kulturen mit 20 g L⁻¹ Strohzusatz mit den Basidiomyceten *G. trabeum* (A) und *I. consors* (B) an den Kulturtagen 0 und 12.

Die Detektion der gebildeten Metabolite wurde zudem durch stark polare, co-eluierende Matrixkomponenten erheblich gestört. Versuche zur Variation der chromatographischen Bedingungen (Gradienten, stationäre Phase) blieben erfolglos. Nach Reduzierung der Stroh-Zugabemenge auf 5,0 g L⁻¹ vermochte *I. consors* das Substrat M27 nur noch geringfügig umzusetzen. *G. trabeum* hingegen zeigte auch unter diesen Bedingungen eine vollständige Umsetzung von

M27, allerdings waren hier die Matrix-Effekte des Weizenstrohs nur unwesentlich geringer (Abbildung 2.56).

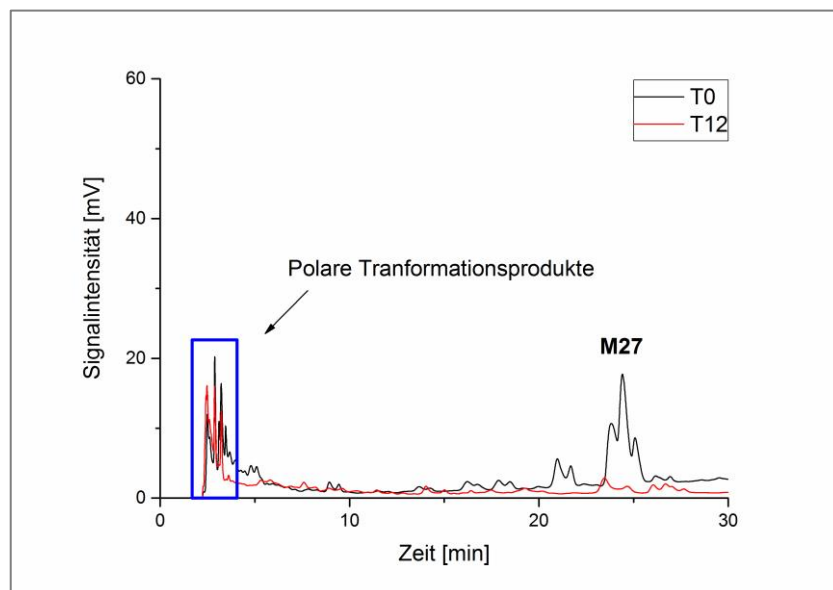


Abbildung 2.56: HPLC-UV-Chromatogramme der Kulturen mit 5,0 g L⁻¹ Strohzusatz mit dem Basidiomyceten *G. trabeum* an den Kulturtagen 0 und 12.

2.5.2 Umsetzung von M27 durch Alginat-Inklusion von *Irpex consors* und *Gloeophyllum trabeum*

In einer abschließenden Untersuchung wurden die Basidiomyceten *G. trabeum* und *I. consors* sowie das zugegebene Stroh (20 g L⁻¹) durch Alginat-Inklusion immobilisiert (5.5.2.2). Dies sollte die oben beschriebenen Matrix-Effekte des Mediums in der HPLC-Analytik (5.5.2.1) reduzieren. Die Alginatperlen wurden in ein Minimalmedium mit M27 (0,2 g L⁻¹) überführt und bei 24 °C kultiviert (Abbildung 2.57).

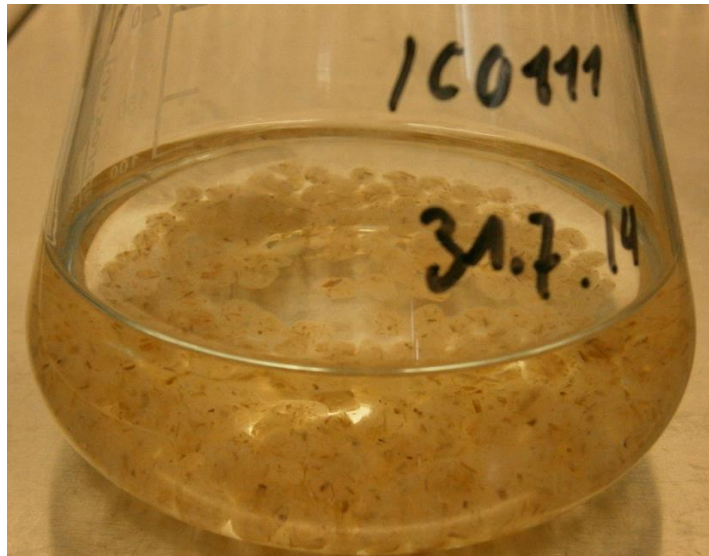


Abbildung 2.57: Alginatperlen mit inkludiertem Pilzmyzel und Weizenstroh.

Im Gegensatz zu den in 2.5.1 beschriebenen Ansätzen war bei dieser Kultivierungen mit *I. consors* bereits nach 4 Tagen ein Substratumsatz zu erkennen. Die Konzentration von M27 verringerte sich danach nur noch gering, der Umsatz nach 6 Kulturtagen betrug ~76% (Abbildung 2.58).

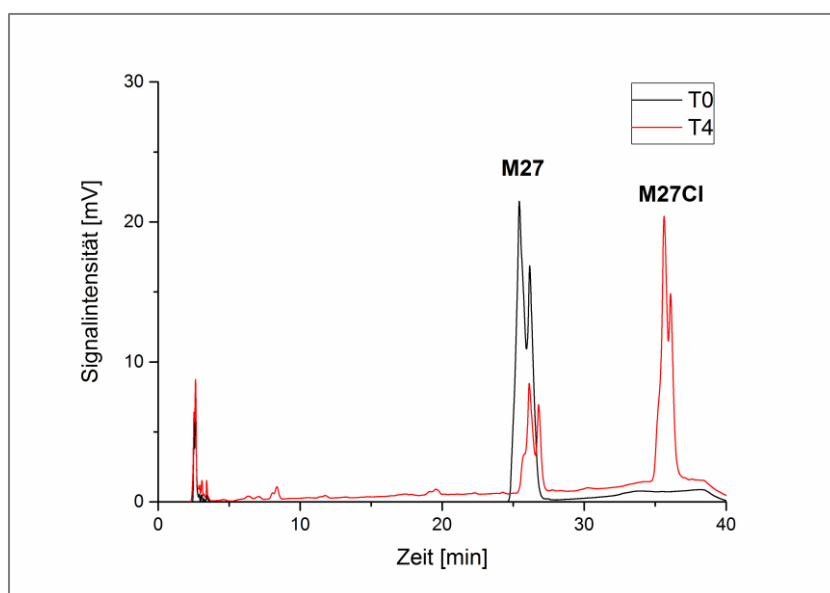


Abbildung 2.58: HPLC-UV-Chromatogramme der Kulturüberstände des Basidiomyceten *I. consors* bei Inklusion in Stroh-haltigem Alginat an den Kulturtagen 0 und 4.

Zudem war deutlich zu erkennen, dass durch die Inklusion des Strohs in das Alginat der Anteil an löslichen Matrixbestandteilen im Kulturüberstand deutlich abnahm. Das Kulturmedium mit dem Alginat-inkludierten Stroh blieb während den 12 Kulturtagen klar, während das stroh-supplementierte Kulturmedium bereits nach dem Autoklavieren dunkelbraun und trüb erschien. Auffällig war die Bildung

eines einzigen Hauptprodukts, dessen Polarität im Vergleich zu M27 geringer war. In den biotischen und abiotischen Kontrollen war keine Abnahme der M27-Konzentration zu beobachten. *G. trabeum* setzte unter den gewählten Bedingungen 35% von M27 um, wobei ein polareres Signal ($t_r = 8,4$ min) detektiert wurde (Abbildung 2.59).

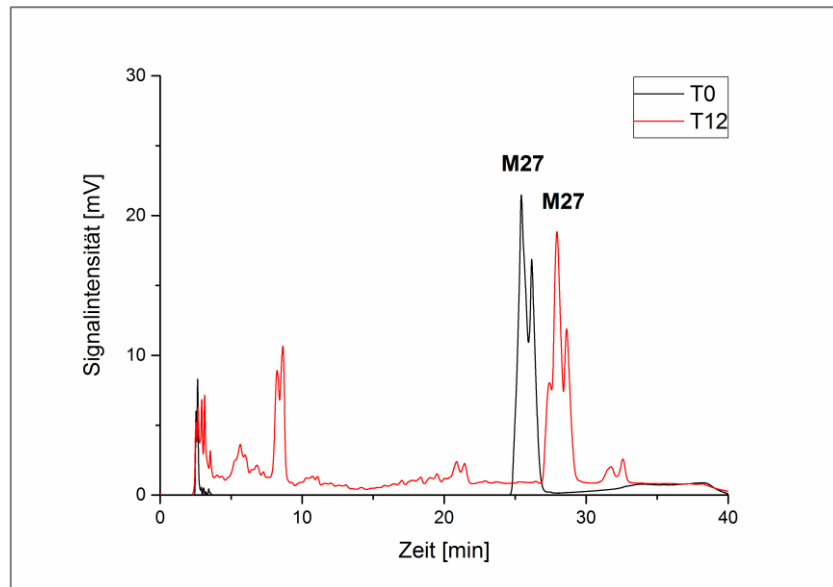


Abbildung 2.59: HPLC-UV-Chromatogramme der Kulturüberstände des Basidiomyceten *G. trabeum* bei Inklusion in Stroh-haltigem Alginat an den Kulturtagen 0 und 4.

Im nächsten Schritt sollten die neu gebildeten Produkte näher charakterisiert werden. Hierfür wurden die Kulturüberstände von *G. trabeum* und *I. consors* mittels LC-MS (5.5.4) analysiert. Im Kulturüberstand von *G. trabeum* konnten weder im ESI-Positiv- noch im ESI-Negativ-Modus neue Signale im LC-MS Spektrum eindeutig identifiziert werden. Bei *I. consors* hingegen war das bereits bei den HPLC-UV-Analysen beobachtete Signal zu detektieren ($t_r = 35$ min, Abbildung 2.60).

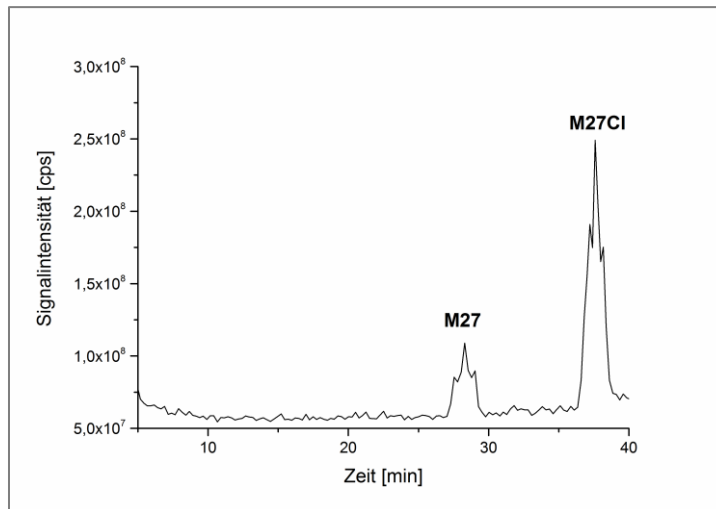


Abbildung 2.60: LC-MS-Analyse (*Total Ion Count*) des Kulturüberstandes des Alginat-inkludierten *I. consors*.

Die detektierte Masse m/z 354 $[M-H]^+$ des neugebildeten Metabolit **M27Cl** wies auf ein chloriertes Produkt hin, da das Quasimolekülion eine Differenz von m/z 34 im Vergleich zum Substrat M27 m/z 320 $[M-H]^+$ aufwies (+ ,Cl' - ,H', Abbildung 2.61).

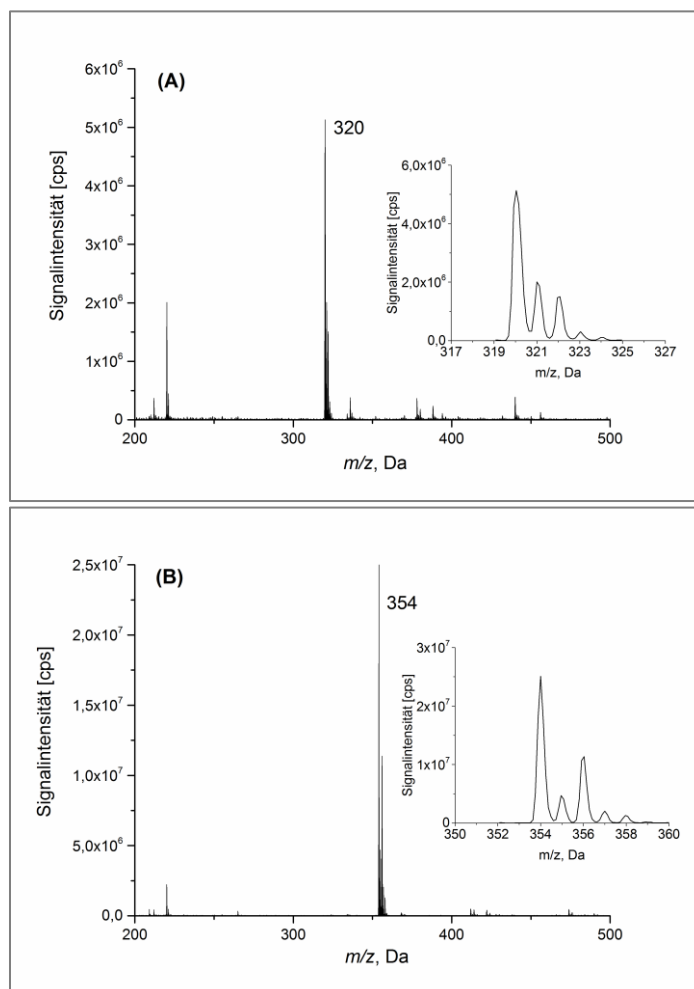


Abbildung 2.61: Massenspektren von M27 ($t_r = 28$ min, A) und dem chlorierten Metaboliten **M27Cl** ($t_r = 38$ min, B).

Wie in Abbildung 2.61 außerdem zu erkennen, wie das Quasimolekül von **M27Cl** das erwartete Isotopenmuster einer Chlorierung auf. Die Alginat-Inklusion des Strohs und des Pilzmyzels lieferte einen chlorierten Metaboliten, der anschließend mittels präparativer HPLC isoliert wurde (5.5.5). NMR-spektroskopische Untersuchungen bestätigten eine Chlorierung an der unsubstituierten Thiophen-Position. Wie auch bei den isolierten Metaboliten des DMTA-P waren in den NMR-Spektren Signale von mindestens 3 Isomeren erkennbar. Im $^1\text{H-NMR}$ verschwand das Thiophen-Proton an Position 4. (Abbildung 2.62).

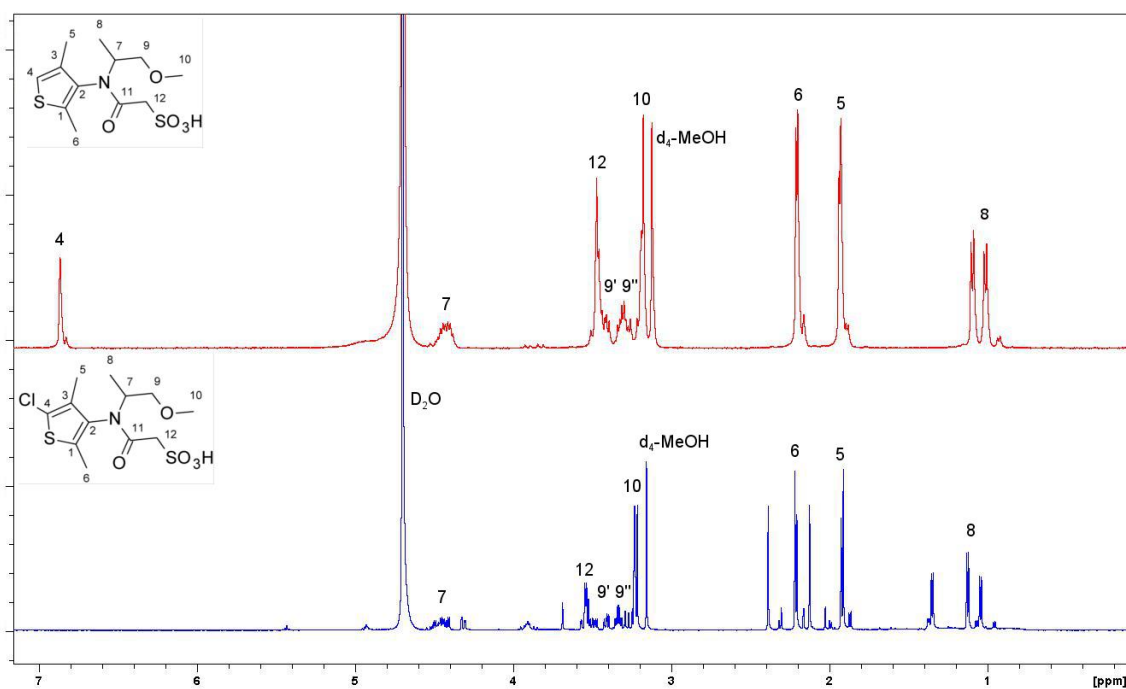


Abbildung 2.62: Ausschnitte aus den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von M27 (rot) und Metabolit **M27Cl** (blau).

Gleichzeitig kam es im DEPT-135-Spektrum zum Verschwinden des aromatischen Methinkohlenstoffs der 4-Position. Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum waren sonst keine größeren Verschiebungen zu beobachten (s. Anhang), was die Struktur von **M27Cl** endgültig bestätigte (Abbildung 2.63).

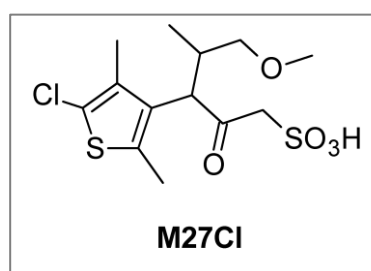


Abbildung 2.63: Struktur des isolierten Metaboliten **M27Cl**.

3 Diskussion

3.1 Methoden zur Modifizierung von Lignosulfonaten

Die Vielzahl der Anwendungen von Lignosulfonaten wurde bereits in Kapitel 1.1 besprochen. Für Lignosulfonate charakteristisch sind die hohe Polydispersität sowie die geringe Menge an phenolischen Hydroxy-Gruppen (Mansouri und Salvadó 2006). Beide Eigenschaften beeinflussen das Verhalten der Lignosulfonate bei den jeweiligen Anwendungen. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die Molekulargewichtsverteilung direkten Einfluss auf die Adsorptions- und die Dispersionsfähigkeit sowie auf die Fähigkeit der Wasserbindung der Lignosulfonate hat (Deng *et al.* 2011; Ouyang *et al.* 2006; Yang *et al.* 2007). Für die hier vorliegende Arbeit war vor allem die Reduzierung des Molekulargewichts der Lignosulfonate von Interesse. Es wurden bereits zahlreiche Versuche zur Modifizierung des Molekulargewichts von Lignosulfonaten unternommen. Ein Ansatz dabei war die Fraktionierung der Lignosulfonate nach dem Molekulargewicht mittels Ultrafiltration oder anhand ihrer Löslichkeit in Ethanol, um gezielt Fraktionen bestimmter Molekulargewichte zu erhalten (Buchholz *et al.* 1992; Duval *et al.* 2015; Ringena *et al.* 2005). Kostengünstigere Varianten stellten die Umsetzungen von Lignosulfonaten mit heterogenen Nickel-Katalysatoren, das Erhitzen im stark alkalischen Medium oder die Ozonolyse in Kombination mit Wasserstoffperoxid dar (El Mansouri *et al.* 2006; Ksenofontova *et al.* 2007; Song *et al.* 2012). Hierbei konnte das Molekulargewicht der Lignosulfonate stark reduziert werden, allerdings wurde bei der Ozonolyse das aromatische Grundgerüst teilweise zerstört.

Die Anzahl der phenolischen Hydroxy-Gruppen ist bei speziellen Anwendungen von Lignosulfonaten, wie zum Beispiel als Zusatz zu Phenolharzen oder deren Ersatz in Laminierungen oder Bindemitteln, entscheidend (Alonso *et al.* 2005; Janiga 1982; Nada *et al.* 1987). Der Gehalt an phenolischen Hydroxy-Gruppen bei Lignosulfonaten (2,0%, w/w bezogen auf die Trockenmassen) ist im Vergleich zu anderen Ligninen, zum Beispiel Kraft-Lignin (4,5%, w/w) prozessbedingt niedrig (Mansouri und Salvadó 2006). Es existieren verschiedene Möglichkeiten der chemischen Modifizierung der phenolischen Hydroxy-Gruppen. Dazu zählen die Methylierung (Reaktion einer aromatischen Einheit mit Formaldehyd), die

Phenolierung, und die Demethylierung von aromatischen Methoxy-Gruppen (Alonso *et al.* 2001). Arbeiten zur Methylierung und Phenolierung von Lignosulfonaten konnten deren Bindungsstärke hinsichtlich ihrer Anwendungen als Phenolharz verbessern (Alonso *et al.* 2004; 2005; siehe auch Kapitel 3.3). Die Aspekte der Nachhaltigkeit für die Substitution erdölbasierter Polymere durch Lignosulfonate können durch eine biotechnologische Modifikation der physikochemischen Eigenschaften noch verstärkt werden. Arbeiten hierzu wurden bereits von diversen Arbeitsgruppen getätigt und werden in den folgenden beiden Kapiteln 3.2 und 3.3 diskutiert.

3.2 Modifizierung von Lignosulfonaten durch den Weißfäulepilz *Irpex consors*

3.2.1 Ligninolytische Enzyme von Weißfäulepilzen

Im Gegensatz zu Braunfäulepilzen greifen Weißfäulepilze primär das Lignin des befallenen Holzes an. Sie sind in der Lage, das polymere Lignin für den eigenen Stoffwechsel zu nutzen und teilweise zu mineralisieren (Broda *et al.* 1994; Kirk *et al.* 1975). Unter Verwendung ihres Sekundärmetabolismus sekretieren sie ein breites Spektrum an Oxidoreduktasen und weiteren Hilfsenzymen (Alfaro *et al.* 2014; Hori *et al.* 2014). Die extrazellulären Enzyme sorgen für eine kontinuierliche Depolymerisierung des Lignin-Polymers sowie für die Metabolisierung der zugänglich gemachten Cellulose des Holzes (Kirk und Farrell 1987). Zu den prominentesten Vertretern der Enzym-Maschinerie der Weißfäulepilze zählen die Lignin-Peroxidasen (LiP, EC 1.10.1.14), die Mangan-Peroxidasen (MnP, EC 1.10.1.13) und die versatilen Peroxidasen (VP, EC 1.10.1.16). Sie gehören allesamt der Klasse II aus der Superfamilie der Pflanzen-, Bakterien und Pilz-Peroxidasen an (Welinder 1992). Die drei Enzymklassen beinhalten alle eine Häm-Einheit (Eisen(III) und Porphyrin-Ring) in ihren aktiven Zentren (Pollegioni *et al.* 2015). Der zugrundeliegende Katalysezyklus der LiP und VP ist in Abbildung 3.1 skizziert.

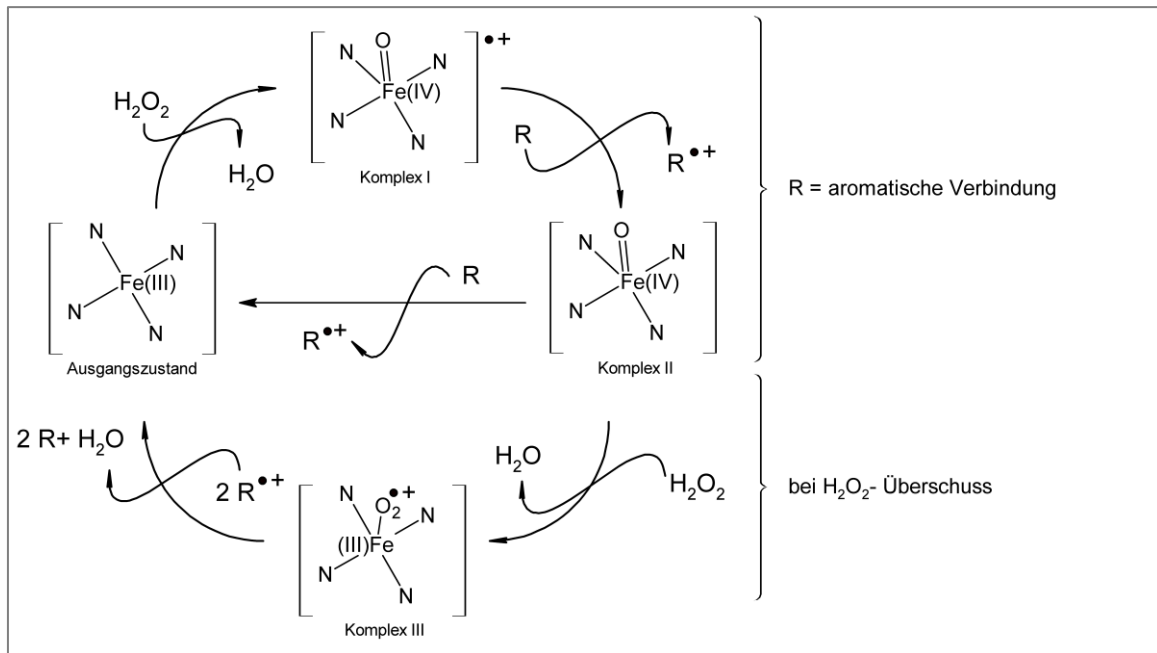


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Katalyse-Zyklus der LiP und VP (nach Wong 2009).

Aus der Zwei-Elektronen Oxidation des Ausgangszustandes durch Wasserstoffperoxid resultiert der Oxo-Komplex I. Dieser wiederum oxidiert die entsprechenden Substrate (aromatische Verbindungen bei LiP, VP) in einer zweistufigen Ein-Elektronen Oxidation. Die oxidierten Substrate dienen als Redox-Mediatoren und können anschließend dank ihrer Mobilität die verzweigten Ligninstrukturen des entsprechenden Holzes angreifen (Higuchi 1993; Paliwal *et al.* 2012; Wong 2009). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Enzymen liegen vor allem in der Fähigkeit der Substrat-Oxidation. MnP oxidieren bevorzugt chelatisierte Mn^{2+} -Ionen nach einem ähnlichen Mechanismus, während LiP dank ihrer höheren Redox-Potentiale (bis zu 1,4 V) ein breiteres Spektrum an aromatischen Verbindungen zu oxidieren vermögen (Hofrichter 2002; Wong 2009). VP wiederum verbinden die Redox-Eigenschaften der MnP und LiP, was sie für biotechnologische Anwendungen interessant macht (Regalado *et al.* 2004). Die strukturellen Ursachen und Hintergründe der Redox-Eigenschaften der drei Enzymklassen werden in Kapitel 3.3 näher diskutiert. Demgegenüber stehen die ausführlich untersuchten Multi-Kupfer-Enzyme Laccasen (EC 1.10.3.2), die in allen untersuchten Weißfäulepilzen vorhanden sind (Rivera-Hoyos *et al.* 2013). Laccasen oxidieren mit Sauerstoff als Elektronen-Akzeptor vor allem die phenolischen Einheiten des Ligninpolymers, wobei auch durch Laccase verursachte Bindungsspaltungen diskutiert werden (Munk *et al.* 2015). Wie bei den

Peroxidasen wird ihr Einwirken auf das Ligningerüst durch die Oxidation niedermolekularer Redox-Mediatoren deutlich verstärkt. Es existieren viele Arbeiten über die Beteiligung von Laccasen am Ligninabbau (zur Übersicht: Leonowicz *et al.* 2001). Laccasen gehören zu den am besten erforschten ligninolytischen Enzymen und finden bereits breite Anwendungen in verschiedenen Prozessen wie zum Beispiel in der Herstellung von Biokraftstoffen (Kudanga und Le Roes-Hill 2014) und von Holzfaserplatten (Euring *et al.* 2011) oder auch zur Detoxifizierung diverser Reststoffströme (Ba *et al.* 2013). In den letzten Jahren wurde zudem vermehrt an anderen Peroxidasen, wie zum Beispiel Dyp-Typ Peroxidasen (EC 1.10.1.19, Colpa *et al.* 2014; Hofrichter *et al.* 2010), Chloroperoxidasen (EC 1.10.1.10, Thomas *et al.* 1970) oder auch Peroxygenasen (EC 1.10.1.16, Hofrichter *et al.* 2015) geforscht, deren Bedeutung beim Lignin-Abbau bis dato noch nicht endgültig geklärt ist. Weitere wichtige Vertreter sind die Wasserstoffperoxid-produzierenden Enzyme (EC 1.1.3.-). Diese sind zum einen für die Versorgung der oben genannten Peroxidasen mit Wasserstoffperoxid essentiell, zum anderen verhindern sie möglicherweise die Repolymerisierung der beim Abbau entstehenden Lignin-Radikale (Kersten und Cullen 1993; Marzullo *et al.* 1995).

3.2.2 Reduzierung des Molekulargewichts von Lignosulfonaten durch *Irpex consors*

Als Nebenprodukte der Zellstoffindustrie eignen sich die in Sulfitablaugen vorhandenen Lignosulfonate als nachwachsender, billiger Rohstoff für verschiedene Anwendungen (s. 1.1). Ein biotechnologischer Prozess zur Reduzierung des Molekulargewichtes und den damit verbundenen Änderungen der physikochemischen Eigenschaften der Lignosulfonate (s. 3.1) ist hierbei erstrebenswert. Für das vorangegangene Screening am LCB zur Reduzierung des Molekulargewichts von Lignosulfonate wurden ausschließlich Weißfäulepilze eingesetzt. Hierfür wurden dem Kulturmedium ausschließlich Sulfitablaugen als C- und N-Quelle zugegeben, was mehrere Vorteile, wie zum Beispiel Kostenersparnisse oder Nachhaltigkeitsaspekte des Prozesses mit sich bringen würde (Eugenio *et al.* 2008; Wojtaś-Wasilewska und Trojanowski 1975). Aus dem von Riemer und Amelung durchgeführten Screening ging der Weißfäulepilz

I. consors hervor, der als einziger Pilz im Screening den Lignosulfonat-haltigen Agar nicht verdunkelte, sondern bleichte. Das Aufhellen von Lignosulfonat-haltigen Medien kann als Anzeichen eines Abbaus bzw. einer Depolymerisierung der Lignosulfonate betrachtet werden (Eugenio *et al.* 2008). Da auch in Flüssigkulturen von *I. consors* eine Aufhellung des Mediums nach 16 Kulturtagen beobachtet wurde, war eine Verringerung des Molekulargewichts der Lignosulfonate zu vermuten, wie zum Beispiel durch Ritter *et al.* (1990) diskutiert. Zur genauen Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von Lignosulfonaten war die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) die Methode der Wahl (Budin und Suša 1982; Fredheim *et al.* 2002). Die Depolymerisierung der hochmolekularen Lignosulfonat-Fractionen von 26 kDa auf bis zu 4 kDa durch die Kultivierung mit *I. consors* wurde mittels GPC bestätigt. Erste Arbeiten zur Modifizierung von Lignosulfonaten durch Basidiomyceten in Flüssigkulturen liegen bereits mehrere Jahrzehnte zurück, allerdings existieren auch neuere Arbeiten (Brunow *et al.* 2009; Hüttermann *et al.* 1977; Selin *et al.* 1975). Diese beobachteten hauptsächlich eine Polymerisierung zu hochmolekularen Lignosulfonat-Fractionen bei gleichzeitiger Abnahme der niedermolekularen Fractionen. Der dabei erhaltene Abbau der niedermolekularen Lignosulfonate war im Vergleich zur anfänglichen Polymerisierung bei allen Arbeiten vernachlässigbar.

In den eigenen Arbeiten mit *I. consors* war auffällig, dass es in der ersten Kulturwoche zunächst zu einer Polymerisierung der Lignosulfonate kam. Erst mit fortschreitender Kulturdauer wurden die Molekulargewichte der hochmolekularen Fractionen stetig reduziert. Um eine Korrelation der Enzymaktivitäten und dem Abbau der Lignosulfonate zu ermitteln, wurden Laccase- und Peroxidase-Aktivitäten in den Kulturüberständen gemessen. In den ersten Kulturtagen dominierten die gemessenen Laccase-Aktivitäten, die mit der Polymerisierung korrelierten. Dieser Effekt der Polymerisierung von Lignosulfonaten in Kulturüberständen wurde auch von Selin *et al.* (1975) bei verschiedenen Basidiomyceten beobachtet. Im Allgemeinen wird vermutet, dass die Laccase-Sekretion den Basidiomyceten zur Detoxifizierung von phenolischen Verbindungen im Kulturmedium dient und den Ligninabbau durch Demethylierung von Methoxy-Einheiten initiiert (Anastasi *et al.* 2010; Bollag *et al.* 1988; Leonowicz *et al.* 1984). Dabei wird die Laccase-Sekretion durch verschiedene phenolische

Verbindungen (wie sie in Sulfitablaugen vorkommen), Xenobiotika oder auch Kupfer-Ionen und 2,5-Xylidin induziert (D'Souza *et al.* 2006; Quaratino *et al.* 2008; Tychanowicz *et al.* 2006). Mit fortschreitender Kulturdauer nahmen die in den Kulturüberständen von *I. consors* detektierten Peroxidase-Aktivitäten zu, während die Laccase-Aktivität parallel dazu abnahm. Diese Beobachtungen korrelierten mit der ab Kulturtag 4 einsetzenden und bis zum Ende der Kultivierung anhaltenden Verringerung des Molekulargewichts der Lignosulfonate. Somit wird den Peroxidasen eine entscheidende Rolle beim oxidativen Abbau der Lignosulfonate zugesprochen. Für eine Bestätigung dieser Aussage war zunächst eine Identifizierung der für die Depolymerisierung verantwortlichen Enzyme entscheidend. Die katalysierten Reaktionen von Laccasen und Peroxidasen der Basidiomyceten werden vor allem *in vivo* von mehreren Faktoren beeinflusst. Beispielsweise hängt die Modifikation des Lignins von der Gegenwart von Oxidasen (zum Beispiel Glucose Oxidasen EC 1.1.3.4, Aryl-Alkohol Oxidasen EC 1.1.3.7) bzw. vom Vorhandensein niedermolekularer Verbindungen zur Verhinderung der Repolymerisierung ab. Ferner wird die Enzyminduktion durch die Konzentrationen externer C- oder N-Quellen beeinflusst (Buswell *et al.* 1995; Cho *et al.* 2004; Hu *et al.* 2009; Leonowicz *et al.* 1985). Ferner haben die Art des verwendeten Lignins (Lignosulfonate, Kraft-Lignin) und dessen Molekulargewichtsverteilung erheblichen Einfluss auf die Umsetzungen durch Mikroorganismen (Madad *et al.* 2013; Reid und Paice 1994; Wojtaś-Wasilewska *et al.* 1980). Eine Korrelation von Enzymaktivitäten und Abbau von Lignosulfonaten und anderen Ligninen wurde in der Literatur bereits kontrovers diskutiert (Archibald *et al.* 1997). So zeigten verschiedene Versuche mit isolierten oder kommerziellen Laccasen eher Polymerisierungen der Lignosulfonate, was mit den Beobachtungen bei *I. consors* im Einklang steht (Areskogh *et al.* 2010; Kim *et al.* 2009; Leonowicz *et al.* 1985). Der Einsatz verschiedener Peroxidasen führte hingegen zu einer, wenngleich mäßigen, Verringerung des Molekulargewichts der Lignosulfonate (Brunow *et al.* 2009; Lobarzewski *et al.* 1982). Hofrichter *et al.* (2001) konnten eine Depolymerisierung von Lignin aus Kiefernholz durch eine Mangan-Peroxidase beobachten. Wie bei *in vivo* Experimenten spielen bei *in vitro* Experimenten die Art des verwendeten Lignins und auch die Kombination von Peroxidasen mit weiteren Enzymen wie Pyranose-Oxidasen eine entscheidende Rolle (Ai *et al.* 2014; Becker und Sinitsyn 1993; Lackner *et al.* 1991; Wariishi *et al.*

1991). Synergetische Effekte der Enzyme wie Laccasen, Peroxidasen und Oxidasen könnten ebenfalls Einfluss auf die Depolymerisierung haben (Galliano *al.* 1991). Dementsprechend decken sich die Ergebnisse der Literatur mit denen der Depolymerisierung der Lignosulfonate durch Peroxidasen aus *I. consors*. Die Synergetik aus dem Zusammenspiel von Laccasen, Peroxidasen (beide gemessen) und Oxidasen (zur Bereitstellung von H_2O_2) ist auch im Kulturüberstand von *I. consors* gegeben. Weitere Versuche bekräftigten die These, dass die Laccase-Aktivität mit der Polymerisierung der Lignosulfonate zusammenhängt. So führte die Erhöhung der Konzentration der Sulfitablauge (verdoppelt bzw. vervierfacht) zu einer höheren Laccase-Sekretion bei *I. consors* in den ersten Kulturtagen, aus der eine stärkere Polymerisierung der Lignosulfonate resultierte. Die hochmolekularen Lignosulfonate vermochte *I. consors* im Verlauf der Kultivierung nicht mehr zu depolymerisieren. Die gemessenen Laccase-Aktivitäten bei einer Verdopplung der Menge an Sulfitablauge waren allerdings nur in den ersten 4 Kulturtagen höher, bevor sie kontinuierlich sanken und dabei stets unter den Werten der Standardbedingungen lagen. Die ermittelten Peroxidase-Aktivitäten unterschieden sich bei der Verdopplung der Konzentration an Sulfitablauge dabei im Vergleich zu den Standardbedingungen kaum. Dies führte zwar zu einer Abnahme der polymerisierten Fraktionen, trotzdem wurden die Lignosulfonate nicht im gleichen Maße depolymerisiert. Dagegen führte die Vervierfachung der Zugabemenge zu einem drastischen Anstieg an sekretierter Laccase in den ersten Kulturtagen ($> 2.000 \text{ U L}^{-1}$), was eine starke Polymerisierung der Lignosulfonate zur Folge hatte. Nach den ersten 4 Kulturtagen nahmen die Laccase- und Peroxidase-Aktivitäten stetig ab, und die Molekulargewichtsverteilung änderte sich danach kaum noch. Die Konzentrationsabhängigkeit der Polymerisierung durch Laccasen wurden bereits in anderen Arbeiten beobachtet (Areskogh *et al.* 2010; Tanaka *et al.* 2010). In diesen Arbeiten wurde die gezielte Polymerisierung durch kommerzielle Laccasen durch Erhöhung der Substrat-Konzentrationen (Lignosulfonate oder monomere Phenole) gesteigert.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Beobachtungen bezüglich der Molekulargewichtsverteilung der Lignosulfonate während des Kulturverlaufs mit den gemessenen Enzym-Aktivitäten in Korrelation gebracht werden konnten. Die anfängliche Polymerisierung ging mit hohen Laccase-Aktivitäten einher, was durch

die Ergebnisse der Konzentrationserhöhungen der Lignosulfonate bekräftigt wurde. Die fortschreitende Depolymerisierung der Lignosulfonate könnte demnach durch einem Zusammenspiel der gemessenen Peroxidase-Aktivitäten gepaart mit den vermuteten Oxidase-Aktivitäten herbeigeführt worden sein. Bei diesen Prozessen haben die stetig abnehmenden Laccase-Aktivitäten möglicherweise nur noch eine untergeordnete Rolle gespielt.

3.3 Modifizierung von Lignosulfonaten durch den Braunfäulepilz *Gloeophyllum trabeum*

3.3.1 Mechanismus der Braunfäule

Braunfäulepilze stehen mit ihrem speziellen Wirkmechanismus auf Lignocellulose-Materialien derzeit im Fokus der anwendungsorientierten Forschung. Dabei geht es gezielt um die Vorbehandlung von Lignocellulose durch die biomimetische Behandlung nach dem Vorbild der Braunfäule. Ziel ist die optimale Freisetzung der zu fermentierenden Saccharide aus der Lignocellulose (Jung *et al.* 2015; Monroy *et al.* 2010). Über die Wirkweise der Braunfäulepilze auf Lignocellulose wurden in den letzten Jahrzehnten viele Studien getätigt (Übersicht: Arantes *et al.* 2012). Das markanteste Merkmal der Braunfäule ist der weitgehende Abbau der Polysaccharide des befallenen Substrates (Eriksson *et al.* 1990). Die Einzigartigkeit des Mechanismus der Braunfäule liegt dabei in seiner größtenteils nicht-enzymatischen Natur. Vielmehr handelt es sich um eine Fenton-artige Reaktion, bei der durch die Reaktion von Fe(II) und Wasserstoffperoxid sehr reaktive Hydroxyl-Radikale entstehen (Goodell *et al.* 1997; Kerem *et al.* 1999, Abbildung 3.2).

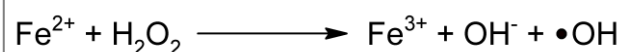


Abbildung 3.2: Die Fenton-Reaktion.

Die Hydroxyl-Radikale wiederum sorgen, neben cellulolytischen Enzymen, für die Depolymerisierung der Polysaccharide und die Modifizierung des Lignins (Arantes *et al.* 2011). Die so zugänglich gemachten depolymerisierten Saccharide können im Anschluss durch den Pilz aufgenommen und metabolisiert werden. Für diese

Art von Abbau produziert der Pilz Reduktionsmittel (niedermolekulare, aromatische Verbindungen wie beispielsweise 2,5-Dimethoxyhydrochinone) zur Erzeugung von Fe(II) und Wasserstoffperoxid für die Fenton-Reaktion (Jensen *et al.* 2001; Shimokawa *et al.* 2005). Durch ihre Mobilität gelangen die Reduktionsmittel in die S2-Schicht der Pflanzen und sorgen dafür, dass die sehr reaktiven Hydroxyl-Radikale erst am Reaktionsort entstehen. Dadurch wird gewährleistet, dass diese nicht die Pilz-Hyphen angreifen und der Pilz sich quasi selbst zersetzt (Arantes *et al.* 2009b). Die Fe-Ionen werden direkt vor Ort durch vom Pilz produzierte Oxalate aus dem Holz gelöst und chelatisiert (Xu und Goodell 2001). Das Lignin wird durch das Einwirken stark modifiziert, aber nur in sehr geringem Ausmaß mineralisiert (Goodell 2003). Hierbei kommt es hauptsächlich zu einer Demethylierung der aromatischen Methoxy-Gruppen (Filley *et al.* 2002; Jin *et al.* 1990; Niemenmaa *et al.* 2008). Weitere Arbeiten konnten zudem zeigen, dass bei der Braunfäule auch Etherspaltungen und Seitenkettenoxidationen im Ligningerüst auftreten (Koenig *et al.* 2010; Martínez *et al.* 2011). Damit einhergehend kommt es zu einer temporären Depolymerisierung des Lignins, welches im Verlauf der Braunfäule wieder repolymerisieren kann (Yelle *et al.* 2008). Die biomimetische Umsetzung von Lignin durch Fenton-artige Reaktionen wurde bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen durchgeführt (Arantes *et al.* 2009a; Gierer und Reitberger 1992). Eine Übersicht der möglichen Modifizierung des Lignins ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

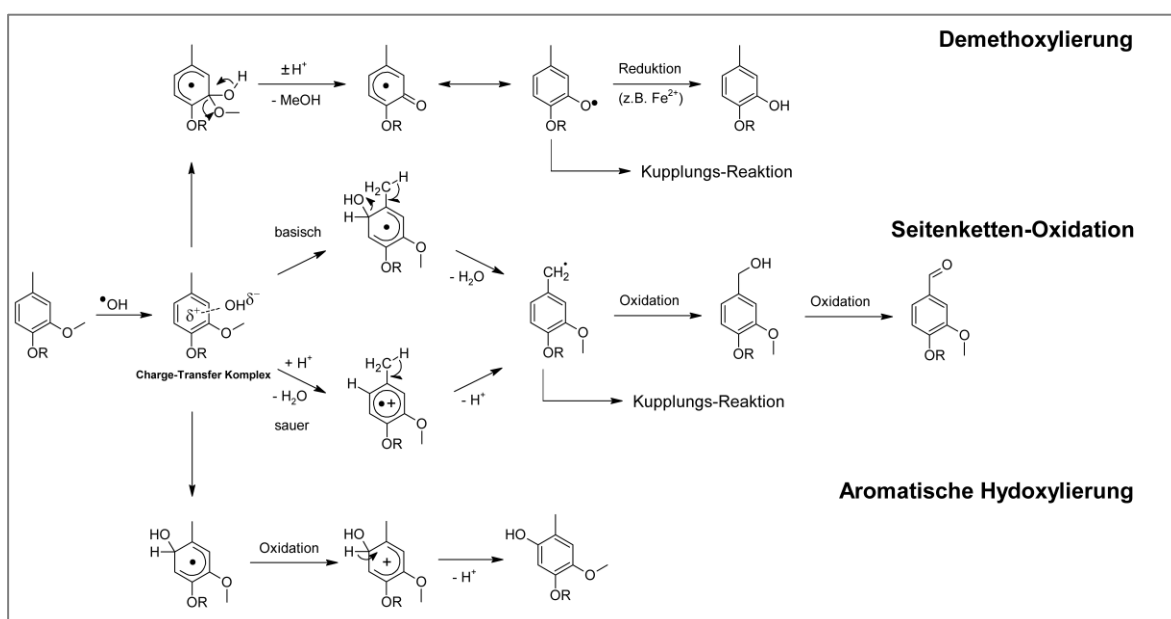


Abbildung 3.3: Mögliche Reaktionen von Hydroxyl-Radikalen mit einer aromatischen Verbindung (nach Gierer und Reitberger 1992).

Die Demethylierung des Lignins und die damit einhergehende Steigerung der Anzahl an phenolischen Hydroxy-Gruppen wird als essentieller initialer Schritt bei der Braunfäule betrachtet (Kirk 1975). Die entstandenen *ortho*-Dihydroxy-Einheiten können dann wiederum als Reduktionsmittel für die Fe(III)-Spezies dienen (Rodríguez *et al.* 2001). Die Entdeckungen extrazellulärer Alkoholoxidasen deuten zudem darauf hin, dass die Oxidation des bei der Demethylierung freigesetzten Methanols die Hauptquelle für das benötigte H₂O₂ darstellt (Arantes *et al.* 2011; Daniel *et al.* 2007). Der Braunfäule-Mechanismus stellt für den Pilz aus mehreren Gründen eine ökonomische Art des Abbaus dar:

- geringe, energieaufwendige Produktion von ligninolytischen Enzymen (Arantes *et al.* 2011)
- das benötigte Fe(III) wird durch vom Pilz produzierte Oxalate direkt vor Ort aus den Pflanzenzellen gelöst (Xu und Goodell 2001)
- mehrere Mol Fe(II) und H₂O₂ werden durch ein Mol der pilzeigenen Fe(III)-Reduktionsmittel produziert (Kerem *et al.* 1999)
- das modifizierte Lignin dient gleichzeitig als Reduktionsmittel für Fe(III), weshalb diese nur anfänglich gebildet werden müssen (Filley *et al.* 2002)

3.3.2 Steigerung der phenolischen Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate

Wie in Kapitel 3.3.1 dargelegt existieren viele Arbeiten über die Aufklärung des Braunfäulemechanismus. In der Literatur werden vor allem Umsetzungen von Holz durch Braunfäulepilze in Festbett-Kulturen betrachtet (Aguiar *et al.* 2013; Kaffenberger und Schilling 2014). Die Umsetzung von Lignosulfonaten durch Braunfäulepilze in Flüssigkulturen wurde lediglich von Selin *et al.* (1975) untersucht, wobei hier ausschließlich auf die Abnahme der Lignosulfonat-Konzentration in Lösung eingegangen wurde. In der eigenen Arbeit sollte eine Modifizierung von Lignosulfonaten durch eine Steigerung des Gehalts phenolischer Hydroxy-Gruppen erreicht werden. Eine geeignete Methode zum Nachweis phenolischer Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten ist die UV-Differenzspektroskopie (Goldschmid 1954; Wexler 1964). Die Methode macht sich den batho- und hyperchromen Effekt der phenolischen Hydroxy-Gruppen bei unterschiedlichen pH-Werten zu nutze. Durch die Subtraktion der UV-Spektren

(240 – 350 nm) bei verschiedenen pH-Werten erhält man ein Differenzspektrum mit Maxima bei ~250 nm und ~300 nm (Abbildung 3.4).

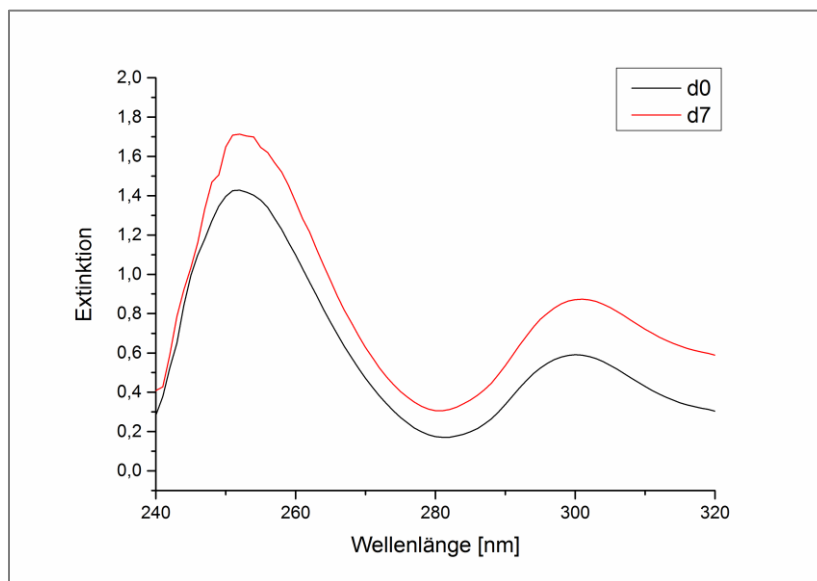


Abbildung 3.4: UV-Differenzspektrum von Lignosulfonaten an verschiedenen Kulturtagen, modifiziert durch *G. trabeum*.

Die gemessenen Extinktionsdifferenzen sind direkt proportional zur Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen in Lösung und können somit als semiquantitativer Nachweis verwendet werden. Für eine absolute Bestimmung der im Lignin enthaltenen Hydroxy-Gruppen müsste die Methode anhand von Lignin-Modellverbindungen kalibriert werden. Für die Zwecke der hier angefertigten Arbeiten war eine semiquantitative Auswertung ausreichend, da eine relative Zunahme der Hydroxy-Gruppen im Fokus stand. Aufgrund ihrer einfachen Durchführung und guten Reproduzierbarkeit ist die Methode speziell zur Untersuchung von Lignosulfonaten in Sulfitablaugen gegenüber anderen Analysen wie der potentiometrischen Titration, ^{13}C -NMR-Spektroskopie oder auch chemischen Nachweisen vorzuziehen (Lin 1992).

In einem Screening wurden 14 Braunfäulepilze und sechs Weißfäulepilze auf Lignosulfonat-haltigem Agar und in den entsprechenden Flüssigmedien kultiviert. Die Sulfitablauge diente als einzige Kohlenstoffquelle, während dem Medium zusätzlich Ammoniumnitrat ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) als Stickstoffquelle zugesetzt wurde. Aus dem Screening ging hervor, dass es in Übereinstimmung mit der Literatur (s. 3.3.1) bei einigen Braunfäulepilzen zu einer deutlichen Erhöhung an phenolischen Hydroxy-Gruppen kam. Bei den Braunfäulepilzen waren keine Laccase-Aktivitäten im Kulturüberstand messbar, da diese in der Regel über keine

ligninolytischen Enzyme verfügen (s. 3.3.1). Allerdings konnte bei einer H₂O₂-Zugabe zum Assay eine Aktivität gemessen werden. Die Ursache für die gemessenen Aktivitäten muss deshalb genauer untersucht werden. Die eingesetzten Weißfäulepilze zeigten hingegen keine Steigerung, sondern eher Abnahmen bei den Extinktionswerten, was mit den gemessenen Laccase-Aktivitäten im Überstand im Einklang steht (s. 3.2). Weißfäule korreliert in der Regel mit einer starken Abnahme phenolischer Hydroxy-Gruppen im Lignin, da die Laccase-Aktivitäten vermutlich zu einer Polymerisierung der Lignosulfonate führten. Eine Ausnahme bildete der Weißfäulepilz *Coprinellus micaceus*, bei dem eine Zunahme der Extinktion und keine Veränderung des Molekulargewichts beobachtet wurden. Die Molekulargewichtsverteilung der Lignosulfonate wurde von den meisten Braunfäulepilzen nicht beeinflusst. Die Ausnahme bildete *G. trabeum*, der die hochmolekularen Fraktionen der Lignosulfonate depolymerisierte. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Krueger *et al.* (2015) und Kerem *et al.* (1998), die eine Depolymerisierung von sulfoniertem Polystyrol bzw. Polyethylenglycol in Flüssigkulturen von *G. trabeum* beobachteten. Die acht Pilze mit den größten Extinktionszunahmen wurden erneut kultiviert, wobei die Ergebnisse des ersten Screenings reproduziert wurden. Für weitere Untersuchungen wurde der Braunfäulepilz *G. trabeum* ausgewählt, da dieser zusammen mit *A. serialis* die höchsten Extinktionszunahmen verursachte und gegenüber letzterem ein schnelleres Wachstum in der Vorkultivierung zeigte. *G. trabeum* ist einer der am besten untersuchten Braunfäulepilze (fast 700 Suchtreffer bei SciFinder®). Dies ist auf seine im Vergleich zu anderen Braunfäulepilzen deutlich besseren Ergebnisse bei diversen Screenings in Bezug auf den Ligninabbau zurückzuführen (Ander *et al.* 1984; Niemenmaa *et al.* 2008; Tanaka *et al.* 1986). Zunächst wurden die Kulturbedingungen variiert; die Kultivierung erfolgte in Schikane-Kolben und unter Zugabe von Eisen(III)-sulfat. Letzteres sollte aufgrund des Fenton-Mechanismus für eine verbesserte Umsetzung sorgen. Beide Maßnahmen hatten allerdings keinen Einfluss auf das Ergebnis der Kultivierung. Varela und Tien (2003) konnten zeigen, dass Fenton-Reaktionen *in vitro* vielmehr vom pH-Wert und der Konzentrationen der Chelat-Liganden (Oxalate) im Kulturüberstand abhängig sind. Ein Weglassen der Spurenelement-Lösung führte hingegen zu einer deutlich geringeren Extinktionszunahme. In weiteren Versuchen wurde die Konzentration der

Lignosulfonate kontinuierlich gesteigert. Hierbei zeigte *G. trabeum* bezogen auf die eingesetzte Trockenmasse der Sulfitablauge (Tabelle 2.4) bei allen Konzentrationen eine ähnliche relative Zunahme der Extinktionen. Zudem war auch bei höheren Konzentrationen anders als beim Weißfäulepilz *I. consors* (s. 3.2) stets eine partielle Depolymerisierung der hochmolekularen Lignosulfonate zu beobachten.

3.3.3 Fermentativer Ansatz zur Steigerung der phenolischen Hydroxy-Gruppen

Abschließend sollte eine Maßstabsvergrößerung der Umsetzung der Lignosulfonate durch *G. trabeum* in einem Rührkesselreaktor (15 L) durchgeführt werden. Bei Maßstabsvergrößerung von Kultivierungen mit Basidiomyceten in Rührkesselreaktoren spielen vor allem die Agitation des Mediums (Geschwindigkeit, Art des Rührers) sowie die Begasungsrate eine entscheidende Rolle (Cui *et al.* 1997; Kim *et al.* 2003). Eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Pilz-Pellets muss durch eine optimale Begasungsrate und Rührgeschwindigkeit gewährleistet sein, um ein optimales Wachstum des Pilzes sowie eine optimale Enzymproduktion zu gewährleisten (Khiyami *et al.* 2006; Michel *et al.* 1992). Daneben wird das Pilzwachstum zusätzlich durch viele weitere Faktoren wie Scherkräfte, Inokulum-Volumen, pH-Wert, Temperatur, C/N-Verhältnis, Antischaummittel oder auch die Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst (Braun und Vecht-Lifshitz 1991). Einige dieser Parameter wie die Medienzusammensetzung, der pH-Wert und die Temperatur können dabei bereits im Schüttelkolben optimiert werden. Im Idealfall verläuft eine Maßstabsvergrößerung ohne größere Veränderungen der Kulturparameter. Die im Schüttelkolben erzielten Ergebnisse zur Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen durch *G. trabeum* konnten problemlos reproduziert werden. Es wurde lediglich die Rührgeschwindigkeit im Vergleich zum Schüttelkolben (150 *rpm* auf 120 *rpm*) verändert und eine Begasungsrate (1. Tag 0,2 vvm, danach Setpoint $\text{pO}_2 = 75\%$) eingestellt. Der pH-Wert des Überstandes wurde im Verlauf der Kultivierung vermutlich durch die vom Braunfäulepilz *G. trabeum* ausgeschiedenen organischen Säuren, die für die Fenton-Reaktion benötigt werden (s. 3.3.1), kontinuierlich auf pH 3,5 abgesenkt. Die kurze Kulturdauer (7 –

14 Tage), die mögliche Maßstabsvergrößerung und die sehr gute Reproduzierbarkeit bieten optimale Voraussetzungen für potentielle industrielle Anwendungen des Prozesses. Zudem konnte die Zugabe der anorganischen Komponenten ohne Veränderung der Ergebnisse auf ein Zehntel reduziert werden.

3.4 Isolierung und Klonierung einer putativen versatilen Peroxidase aus *Irpex consors*

3.4.1 Enzymisolierung aus dem Kulturüberstand von *Irpex consors*

Aus industrieller Sicht sind vor allem isolierte Enzyme von Interesse, die ggf. dieselbe Modifizierung wie der Organismus *in vitro* katalysieren (s. 3.4.2). Die verwendete Sulfitablaugung induzierte im Basidiomyceten *I. consors* Peroxidasen, die für die Depolymerisierung der Lignosulfonate hauptverantwortlich waren (s. 3.2.2). Zur Isolierung der Peroxidase wurden die Kulturüberstände (Tabelle 5.13) von *I. consors* vereinigt und das Myzel abgetrennt. Der erste kritische Schritt bei der Aufreinigung war die Konzentrierung mit einer Tangentialfluss-Filtrationseinheit. Hierbei kam es zu einem Verlust der Gesamtaktivität von fast 50%, was auf die lange Dauer der Konzentrierung von 600 mL Kulturüberstand zurückzuführen sein könnte. Die Peroxidase sollte in einem mehrstufigen Reinigungsprozess mittels FPLC aus dem Konzentrat des Kulturüberstands isoliert werden. In der Literatur werden zur Reinigung versatiler Peroxidasen meist dreistufige Prozesse angewendet (de la Rubia *et al.* 2002; Martínez *et al.* 1996). Es existiert nur eine Arbeit, die sich mit der Isolierung einer Peroxidase eines Basidiomyceten aus einem Lignosulfonat-haltigen Medium befasst hat (Dzedzyulya und Becker 2000). Die Autoren präzipitierten die Manganperoxidase zunächst durch Ammoniumsulfat um sie anschließend in zwei FPLC-Isolierungsschritten zu reinigen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Peroxidase nicht ausgefällt, sondern das Konzentrat des Kulturüberstandes im ersten Schritt über einen schwachen Anionenaustauscher (DEAE-Sepharose™) aufgetrennt. Hierbei konnte ein Großteil der Lignosulfonate, die auf der Säule stark retardiert wurden, abgetrennt werden. Prinzipiell stellen Lignosulfonat-haltige

Medien für die Reinigung von Enzymen ein Problem dar, weil diese als Polyelektrolyte sehr stark mit Anionentauschern (hier DEAE-Sepharose™) wechselwirken. Die Lignosulfonate konkurrieren so mit den Enzymen um die freien Bindungsstellen, was die Trennleistung der Säule herabsetzt. Zum anderen absorbieren Lignosulfonate im UV-Bereich, wodurch etwaige Proteinsignale im UV-Chromatogramm überlagert werden können. Zudem ist eine Proteinbestimmung in den Fraktionen und im Kulturüberstand erschwert. Die Peroxidase-Fraktionen konnten allerdings durch einen Aktivitäts-Assay identifiziert werden. In den Fraktionen wurde neben der gesuchten Peroxidase-Aktivität aber zusätzlich Laccase-Aktivität detektiert. Der zweite Trennungsschritt zur Separierung der Peroxidase und Laccase erfolgte mittels hydrophober Interaktionschromatographie. Trotz starker Wechselwirkungen der Peroxidase mit der stationären Phase (Hi Trap Phenyl-FF) konnte diese nicht vollständig von der co-eluierenden Laccase abgetrennt werden. Durch eine isoelektrische Fokussierung mit anschließender Zymogram-Färbung konnten die Enzyme allerdings eindeutig identifiziert werden. Im Coomassie-gefärbten Gelteil waren 3 Peroxidase-Banden erkennbar, die allesamt ansequenziert wurden. Für die vorliegende Arbeit war eine vollständige Isolierung nicht erforderlich, da die Peroxidase zunächst molekularbiologisch charakterisiert werden sollte.

3.4.2 Molekularbiologische Charakterisierung der putativen versatilen Peroxidase

Die Sequenzierung der isolierten Gelbanden (durchgeführt von Dr. Gorshkov am IAAC Gießen) erfolgte nach tryptischem Verdau mittels LC-ESI-MS/MS Analytik (Shevchenko *et al.* 2007). Bei der Sequenzierung der isolierten Peroxidasen wurden bei allen drei Proben die gleichen Peptid-Fragmente gefunden. Bei den drei isolierten Peroxidase-Banden handelt es sich demnach vermutlich um Isoenzyme einer Peroxidase (Martinez *et al.* 1996). Zwar könnte es sich wegen den gleichen gefundenen Peptidfragmenten auch um Isoforme der Peroxidase aus *I. consors* handeln, jedoch sprechen die später erhaltenen Mischsequenzen gegen diese Vermutung. Vielmehr könnten die Übereinstimmungen bei den Peptid-Fragmenten von konservierten Bereichen der Peroxidase-Isoenzyme herrühren. Beispielsweise konnten Lobos *et al.* (1994) bei einer Mangan-Peroxidase aus

Ceriporiopsis subvermispora bis zu 7 Isoenzyme nachweisen. Die erhaltenen Peptidsequenzen aus *I. consors* zeigten eine starke Homologie zu einer als Mangan-Peroxidase deklarierten Peroxidase aus *Spongipellis* sp. (UniProt Zugriffsnummer: Q2HWK0, Abbildung 3.5).

```

MAFKSLAAFLTLAAQVANAAALTRRVACPDGVNTATNAACCSLFA LRDDLQQNLF DNGQCGEDVHESLR LTFHDAIGIGSNGGGGADGS
IAIFEDIETAFHANAGIDEIINEQKPF LARHNITVGD FIQFAGALGVSNC PGAPRLPVFI GRPNAVAPADKTVPEP FDSVDTILARFADA
GNFSTVEVVWLLISHTIAAADLVDP T I PGTFPFDSTPETFD TQFFVETQLK GTLFPGTAGNQGEVESPLQGE IRLQSD FELARDSRTACEWQ
SFVNNQRKLTNRFQAVFTRMTVLGNDVNSLIDCSELIPEPPAFTGSATFPAGFSVNDVEQACEATPFPTLATDPGPVTSVAPVPPS

```

Abbildung 3.5: N-terminale Peptidsequenz der Mangan-Peroxidase (Accession no. Q2HWK0) aus *Spongipellis* sp. und Homologien zu den Peptidfragmenten (aus der LC-MS/MS Analyse, grau) der isolierten Peroxidase aus *I. consors*. Signalpeptid hervorgehoben (fett, kursiv).

Zur vollständigen Amplifizierung der codierenden Sequenz der Peroxidase aus *I. consors* wurde die Peptidsequenz aus *Spongipellis* sp. (Q2HWK0) mit den Häm-Peroxidasen aus der Datenbank des *Joint Genome Institute* (JGI) verglichen. Es ergab sich dabei eine starke Homologie (78% Übereinstimmung) zu einer Mangan-Peroxidase aus *Cerrena unicolor*, einem mit *I. consors* (auch *Cerrena consors*) verwandten Pilz, dessen Genom vollständig sequenziert ist (Hibi *et al.* 2012; Ko und Jung 1999). Anhand der Konsensus-Sequenzen wurden Primer abgeleitet, die zur Amplifizierung der Teilabschnitte eingesetzt wurden. Die hierfür benötigte mRNA wurde an Tagen hoher Peroxidase-Aktivität aus Kulturen von *I. consors* isoliert und in cDNA transkribiert. Das Vorhandensein der erwähnten Isoenzyme führte dazu, dass bei den Amplifizierungen der cDNA stets Mischsequenzen erhalten wurden, da mehrere Gene für diese Peroxidase codieren. Aus diesem Grund mussten die bei der Amplifizierung der cDNA aus *I. consors* erhaltenen Produkte in *E. coli* zwischenkloniert werden (Giardina *et al.* 2000). In mehreren Schritten gelang es so, die codierende Sequenz von einem der drei isolierten Isoenzyme der Peroxidase aus *I. consors* vollständig zu amplifizieren.

Zuletzt sollte die codierende Aminosäuresequenz der Peroxidase molekularbiologisch analysiert werden. Hierfür wurde die Sequenz mit Peroxidase-Sequenzen aus der UniProt- Datenbank und der Datenbank des JGI geblastet. Das Ergebnis zeigte eine 100%ige Homologie der Aminosäuresequenz zu der oben bereits diskutierten Mangan-Peroxidase aus *Spongipellis* sp. (GenBank® Zugriffsnummer AB244274). Demzufolge könnte es sich bei dem Datenbankeintrag um eine falsche Annotation des Pilzes handeln, da die ITS-

Sequenzen von *I. consors* am LCB Gießen vorhanden sind und mit weiteren Einträgen in der NCBI-Datenbank zu *I. consors* übereinstimmen (s. Anhang). Daneben ergaben sich für die Peroxidase weitere starke Homologien zu einer Melanin-abbauenden Mangan-Peroxidase (79%, BAG49629, Nagasaki *et al.* 2008) und einer Mangan-Peroxidase aus *Irpex lacteus* (78%, AGO86670). Des Weiteren wurden Homologien zu versatilen Peroxidasen aus *Bjerkandera* sp. (72%, AAO47909) und *Pleurotus sapidus* (72%, CAJ01576) gefunden, von denen bereits gezeigt wurde, dass sie in der Lage sind, verschiedene Arten von Lignin abzubauen (Moreira *et al.* 2007; Schüttmann *et al.* 2014). Die Ergebnisse des Datenbank-Abgleiches unterstützen die These, dass die isolierte Peroxidase aus *I. consors* für die Depolymerisierung der Lignosulfonate hauptverantwortlich ist (Abbildung 3.6).

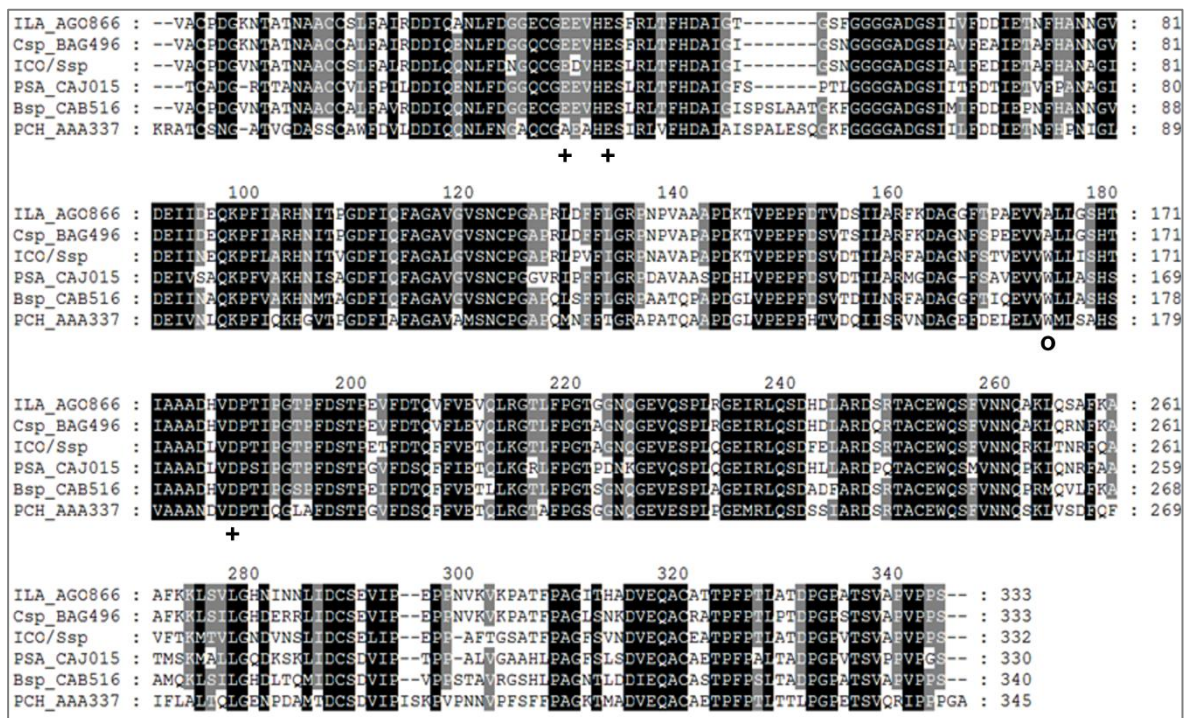


Abbildung 3.6: Abgeleitete Aminosäuresequenzen folgender Peroxidasen: **MnP** aus *I. lacteus* (ILA_AGC86670), **MnP** aus *Ceriporiopsis* sp. (BAG49629), **putative VP** aus *I. consors* (ICO/Ssp), **putative VP** aus *P. sapidus* (PSA_CAJ01576), **VP** aus *Bjerkandera* sp. (Bsp_CAB51617) und **LiP** aus *P. chrysosporium* (PCH_AAA33736). + markiert die konservierten Aminosäuren der Mangan-Bindungsstelle, o markiert die konservierten Aminosäuren für die LRET-Oxidation.

Die Peroxidase (AB244274) aus *Spongipellis* sp ist in der UniProt-Datenbank als Mangan-Peroxidase gelistet. Bei genauerer Analyse der Aminosäuresequenz fällt jedoch auf, dass die Peroxidase das für versatilen und Lignin-Peroxidasen charakteristische Tryptophan (Abbildung 3.6: W¹⁶⁵) enthält (Ruiz-Dueñas *et al.* 2009). Daneben sind zusätzlich die konservierten Mangan-Bindungsstellen

(Abbildung 3.6: E³⁹, E⁴³, und D¹⁸⁵) einer Mangan-Peroxidase enthalten (Ruiz-Dueñas *et al.* 2007). Nach dieser Definition handelt es sich bei der isolierten Peroxidase aus *I. consors* um eine putative versatile Peroxidase. Versatile Peroxidasen kombinieren die katalytischen Eigenschaften von Mangan- und Lignin-Peroxidasen. Sie können sowohl Mn²⁺ als auch Verbindungen wie Veratrylalkohol und andere aromatische Verbindungen mit hohem Redox-Potential oxidieren (Camarero *et al.* 1999). Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit, Substanzen mit hohem Redox-Potenzial wie den Farbstoff *Reactive Black 5* ohne Mediatoren direkt zu oxidieren (Heinfling *et al.* 1998). Für die Katalyse an der zentral gelegenen prosthetischen Häm-Gruppe existieren 3 Reaktionswege. Der „Hauptkanal“ ist sowohl für die Versorgung des aktiven Zentrums mit H₂O₂, als auch für die Oxidation von Substanzen mit niedrigem Redox-Potenzial verantwortlich (Pollegioni *et al.* 2015; Ruiz-Dueñas *et al.* 2008). Durch den zweiten, schmäleren Kanal gelangen die chelatisierten Mn²⁺-Ionen an die Mangan-Bindungsstelle (Abbildung 3.6: E³⁹, E⁴³, und D¹⁸⁵), wo es zur Oxidation des Mn²⁺ über das Propionat der Häm-Gruppe kommt. Da die Aufgabe der versatilen Peroxidasen primär der Abbau des sperrigen Lignins ist, existiert zusätzlich noch eine dritte Oxidationsstelle an der Oberfläche des Enzyms (Paliwal *et al.* 2012). Mehrere Arbeiten konnten einen Elektronen-Transfer über große Distanz (*long range electron transfer*, LRET) an der Oberfläche von versatilen und Lignin-Peroxidasen nachweisen (Pérez-Boada *et al.* 2005; Ruiz-Dueñas *et al.* 1999; Tsukihara *et al.* 2008). Hauptverantwortlich dafür ist das besagte Tryptophan (Abbildung 3.7: W¹⁶⁴) an der Enzymoberfläche, welches zum korrespondierenden Radikalion oxidiert werden kann (Ayala Aceves *et al.* 2001). Der LRET-Oxidationsmechanismus ist für die Umsetzung von sperrigen Substanzen und Substanzen mit hohem Redox-Potenzial verantwortlich (Tsukihara *et al.* 2008, Abbildung 3.7).

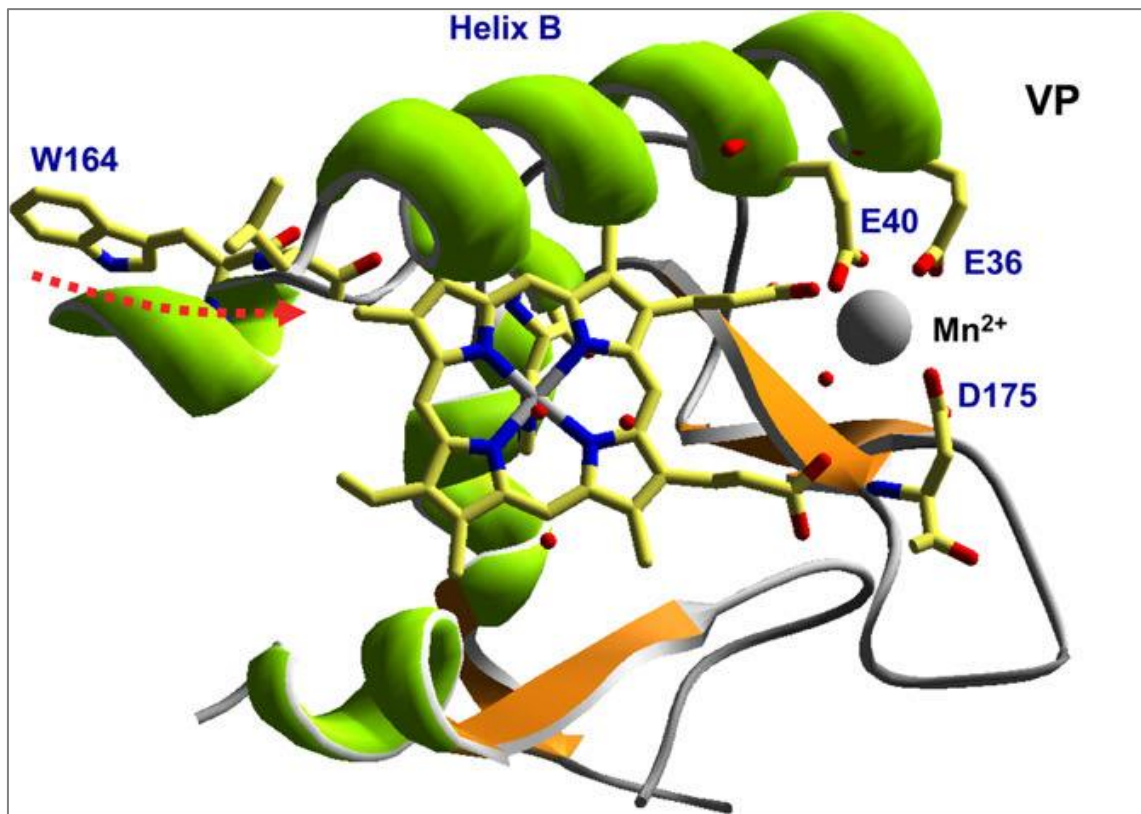


Abbildung 3.7: Axiale Darstellung der Häm-Region einer versatilen Peroxidase aus *Pleurotus eryngii*. Zu sehen sind die das katalytisch aktive Tryptophan W¹⁶⁴ (Reaktionsweg durch roten Pfeil markiert). Zudem ist die Mangan-Bindungsstelle mit den konservierten Aminosäuren E³⁶, E⁴⁰ und D¹⁷⁵ sowie dem Propionat der Häm-Gruppe abgebildet. Wassermoleküle sind als rote Punkte dargestellt (aus Ruiz-Dueñas *et al.* 2009). © Oxford University Press publication.

Generell setzen versatile Peroxidasen Substanzen mit hohen Redox-Potenzialen effizienter um als Lignin-Peroxidasen. Die unterschiedlichen Umgebungen um das katalytisch aktive Tryptophan an der Enzymoberfläche (basisch bei VP: hier N²⁶⁷, R²⁶⁸, K²⁷⁵; sauer bei LiP) sind vermutlich ein entscheidender Grund hierfür, was aus Studien zur zielgerichteten Mutagenese der Tryptophan-Umgebungen hervorgeht (Ruiz-Dueñas *et al.* 2008; Tsukihara *et al.* 2008). In den letzten Jahren wurden neben den bereits erwähnten versatilen Peroxidasen neue versatile Peroxidasen aus Basidiomyceten (vor allem aus *Bjerkandera* und *Pleurotus* Spezies) isoliert und vormals als Mangan-Peroxidasen klassifizierte Enzyme nach den neuen Erkenntnissen des LRET als putative versatile Peroxidasen klassifiziert (Chen *et al.* 2010; Taboada-Puig *et al.* 2011b). Die große Substratbreite, sowie deren Oxidation ohne Mediatoren und ihre im Vergleich zu anderen Peroxidasen gute Beständigkeit in organischen Lösungsmitteln, machen versatile Peroxidasen für industrielle Anwendungen sehr interessant (Bogaert und Coppens 2013; Martínez 2007; Rodakiewicz-Nowak *et al.* 2006). Demgegenüber stehen einige Hindernisse, wie die bis dato vergleichsweise geringen Ausbeuten bei heterologer

Expression und die große Empfindlichkeit bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen (Ruiz-Dueñas *et al.* 2009). Gonzalez-Perez *et al.* (2014) und Sáez-Jiménez *et al.* (2015) gelang es dabei kürzlich, die H_2O_2 -Empfindlichkeit durch Mutagenese zu verbessern. Alternative Ansätze beschäftigen sich mit dem *Cross-linking* von versatilen Peroxidasen unter anderem mit Oxidasen. Hierbei werden die Enzyme durch Linker verbunden, um die versatile Peroxidase stets mit der optimalen Menge an H_2O_2 zu versorgen (Taboada-Puig *et al.* 2011a; Touahar *et al.* 2014).

3.5 Biotransformation von Dimethenamid-P durch *Irpex consors*

3.5.1 Biotransformationen von Pestiziden durch Basidiomyceten

Durch den hohen Pestizid-Verbrauch kommt es zu den in 1.2 beschriebenen Umweltproblemen. Der Abbau bzw. die Biotransformation von Pestizid-Rückständen beschäftigten Forschungsgruppen weltweit schon sehr lange (Maloney 2001). Die vielseitig einsetzbaren Basidiomyceten sind auf Grund ihres breiten extrazellulären Enzymarsenals (s. 3.2.1 und 3.3.1) aussichtsreiche Kandidaten hierfür (Pointing 2001). Der Abbau von bereits verbotenen, persistenten Pestiziden, wie beispielsweise DDT (1,1,1-Trichlor-2,2-bis(*p*-chlorophenyl)ethan), Lindan oder Pentachlorophenol durch Basidiomyceten wurde bereits ausführlich erforscht (Purnomo *et al.* 2001; Reddy und Gold 2000; Ulčnik *et al.* 2013). Im Allgemeinen existieren zu allen wichtigen Pestizid-Familien (unter anderem Organochlor-Pestizide, Organophosphate, Chloracetamide, Phenylharnstoffe, polychlorierte Biphenyle) Studien zum Abbau oder Biotransformation durch Basidiomyceten (Maloney 2001). Prinzipiell umfasste das experimentelle Procedere entweder Flüssigkulturen der Basidiomyceten unter definierten Laborbedingungen oder aber Versuche mit Pestizid-kontaminierten Böden mit einem Konsortium an Mikroorganismen (Bollag *et al.* 1986; Dictor *et al.* 2008; Sanyal und Kulshrestha 2002). Bei den Chloracetamiden, zu denen auch DMTA-P zählt, wurde hauptsächlich der Abbau der Herbizide Alachlor, Metolachlor, Acetochlor und Propachlor untersucht (Stamper und Tuovinen 1998). In diesen Arbeiten kam es vorwiegend zur Cometabolisierung der Herbizide durch

die Mikroorganismen, da diese die Herbizide nicht als C-Quelle verwenden konnten (Durães Sette *et al.* 2004; Novick und Alexander 1985; Smith und Phillips 1975). Bei der Cometabolisierung hat die Umsetzung des Substrats weder stofflichen noch energetischen Nutzen für den Mikroorganismus (Bennett *et al.* 2002). Ferrey *et al.* (1994) konnten bei der Biotransformation des Alachlors durch den Basidiomyceten *Rhizoctonia solanii* eine geringfügige Mineralisierung, also komplette Verstoffwechselung des Herbizides (6%) beobachten. Auch bei Studien zum Abbau von Metolachlor durch Basidiomyceten war ausschließlich eine Cometabolisierung beobachtet worden (Liu *et al.* 1991). Dieser Umstand kann deshalb zur gezielten Generierung von Bodenmetaboliten von Pestiziden durch Kultivierung in synthetischen Flüssigmedien unter Laborbedingungen ausgenutzt werden. Die Metabolite würden so in ausreichenden Mengen für Folgestudien bereitgestellt werden. Die Daten könnten wiederum zum Beispiel für Reevaluierungen von bereits zugelassenen Pestiziden durch die zuständige Behörden verwendet werden.

3.5.2 Screening zur Biotransformation von Dimethenamid-P

Ein umfangreiches Screening zur Umsetzung des Herbizids DMTA-P wurde zunächst emers mit 29 verschiedenen Basidiomyceten durchgeführt. Bei der Auswahl der Basidiomyceten wurde darauf geachtet, eine möglichst große Biodiversität zu erzielen. Für die Generierung von Bodenmetaboliten war es naheliegend, eine Auswahl an saprobionten Bodenpilzen verschiedener Gattungen (*Clitocybe*, *Cyathus*, *Mycena*, *Hypholoma*) auszuwählen. Das Spektrum an Basidiomyceten wurde zur Vollständigkeit mit einigen Weißfäule- und Braunfäulepilzen erweitert. Die Pilze wurden auf Agar-Platten, supplementiert mit verschiedenen Konzentrationen an DMTA-P ($0,25 \text{ g L}^{-1}$, $0,50 \text{ g L}^{-1}$, $1,00 \text{ g L}^{-1}$), über zwei Wochen kultiviert. Pilzwachstum auf den Screening-Platten diente als erstes Anzeichen für etwaige toxische Wirkungen des Herbizids auf die Pilze und gleichzeitig als Indiz für mögliche Biotransformationen (Seigle-Murandi *et al.* 1991). Bei einer DMTA-P-Konzentration von $0,50 \text{ g L}^{-1}$ zeigten 13 Pilze merkliches Wachstum im Vergleich zum Blindwert ohne Herbizid. Bei diesen Pilzen wurde das Wachstum nicht um mehr als 50% durch das DMTA-P unterdrückt. Bei DMTA-P-Konzentrationen von $1,00 \text{ g L}^{-1}$ kam es bei allen Pilzen (außer *I. consors*)

zu vernachlässigbarer Myzelbildung. Die Konzentration von $0,50 \text{ g L}^{-1}$ DMTA-P wurde deswegen für das folgende Flüssig-Screening betrachtet.

Die Biotransformation von DMTA-P in Flüssigkulturen durch Basidiomyceten oder sonstigen Mikroorganismen wurde bis dato noch nicht beschrieben. Wie in Kapitel 3.5.1 dargestellt, befasste sich die Mehrzahl der vorangegangenen Studien mit Untersuchungen zum Abbau und der Biotransformation anderer Chloracetamide. Es existieren allerdings zwei Studien, die sich mit dem Abbau des DMTA-P durch Mischkulturen von Mikroorganismen oder dem Abbau unter sterilen anaeroben Bedingungen beschäftigt haben (Buser und Mueller 1995; Crawford *et al.* 2002). Hierin wurden der Abbau bzw. die Abbauraten des Herbizids in Bodenproben untersucht, wobei der Schwerpunkt der beiden Arbeiten nicht auf der Generierung und Detektion neuer Metabolite lag. Das Flüssig-Screening in dieser Arbeit wurde mit den Basidiomyceten durchgeführt, die ausreichendes Wachstum auf den Screening-Platten ($0,50 \text{ g L}^{-1}$ DMTA-P) zeigten. Hierbei zeigten alle Pilze im Verlauf der Kultivierung Myzelwachstum in den Flüssigkulturen. Allerdings war lediglich bei 5 Basidiomyceten (*Agrocybe aegerita*, *I. consors*, *Pycnoporus coccineus*, *Stereum sp.*, *Trametes suaveolens*) eine Abnahme der DMTA-P-Konzentration zu beobachten. Die Umsetzungen der 5 Pilze wurden mittels HPLC-UV untersucht, wobei nur bei *I. consors* ein reproduzierbarer Abbau des DMTA-P (53%) detektiert wurde. In den Kulturüberständen von *I. consors* konnten 4 Hauptmetabolite detektiert werden. Diese erschienen alle gleichzeitig und mit ähnlicher Intensität im HPLC-UV-Chromatogramm. Zudem waren die gebildeten Metabolite polarer als DMTA-P, was eine Oxidation des Substrates vermuten ließ. Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Umsetzung zeigten, dass eine Steigerung der Glucose-Konzentration im Minimalmedium von $0,15 \text{ g L}^{-1}$ auf $3,0 \text{ g L}^{-1}$ bzw. $10,0 \text{ g L}^{-1}$ eine merkliche Umsatzsteigerung zur Folge hatte (Abbildung 3.8).

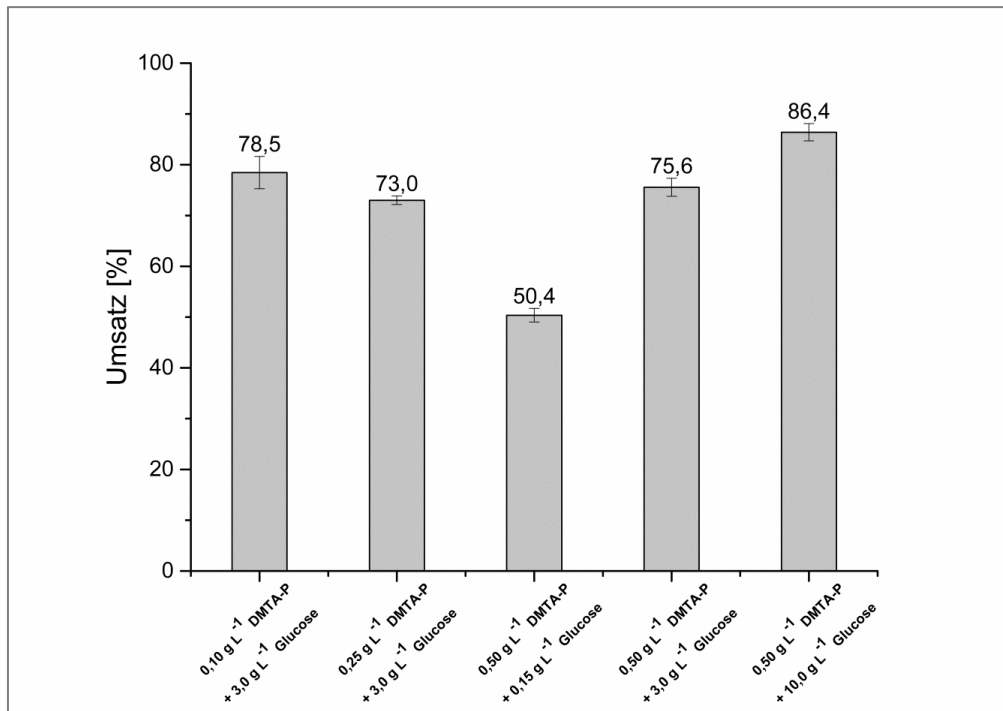


Abbildung 3.8: Umsatz von DMTA-P in Flüssigkulturen durch *I. consors* bei verschiedenen Kulturbedingungen.

Aus Abbildung 3.8 ist auch ersichtlich, dass eine Reduzierung der Substratkonzentration keine merkliche Steigerung des Umsatzes bewirkte. Die eingesetzte Substratkonzentration von $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ($1,8 \text{ mM}$) war deutlich höher als in vergleichbaren Studien (Ichinose *et al.* 1999; Mougin *et al.* 1994; Słaba *et al.* 2013).

3.5.3 Biotransformation von Dimethenamid-P durch *Irpex consors*

Für die Identifizierung der gebildeten Metabolite wurde zunächst der Kulturüberstand verwendet. LC-MS/MS Untersuchungen fanden hierbei jeweils im ESI-positiv-Modus statt, was sich für das Substrat-DMTA-P in der Literatur als geeignet herausstellte (Yokley *et al.* 2002). Die Untersuchungen ergaben, dass alle 4 Hauptmetabolite die gleiche Quasimolekülon von m/z 292 $[\text{M}+\text{H}^+]$ aufwiesen. Diese resultierte aus einer Sauerstoff-Addition an DMTA-P (m/z 276 $[\text{M}+\text{H}^+]$). Neben den Hauptmetaboliten wurden auch Massen von weiteren Metaboliten geringerer Intensitäten gefunden. Diese deuteten sowohl auf Monooxygenierung (m/z 292 $[\text{M}+\text{H}^+]$), Dioxygenierung (m/z 308 $[\text{M}+\text{H}^+]$), als auch auf Demethylierung (m/z 262 $[\text{M}+\text{H}^+]$) der Ausgangsverbindung hin.

Für die finale Strukturaufklärung der 4 Hauptmetabolite wurden diese mittels präparativer HPLC aus dem Extrakt des Kulturüberstands isoliert. Bei Studien über DMTA-P-Metabolite erwies sich die GC-MS-Analytik als passende Methode (Hladik *et al.* 2005b; Hong und Lemley 1998; Mangiapan *et al.* 1997). Die GC-MS Analyse der isolierten Metabolite stand im Einklang mit den Ergebnissen der LC-MS/MS Analytik. Alle Hauptmetabolite wiesen ein Molekülion von m/z 291 [M^{++}] auf. Darüber hinaus zeigten die Metabolite **M3A** und **M3B** das gleiche Fragmentierungs-Muster. Daneben konnten die Metabolite **M5** (m/z 291 [M^+]) und **M7** (m/z 261 [M^+]) isoliert werden, deren Molekülionen ebenfalls mit den vorherigen Ergebnissen aus der LC-MS/MS Untersuchung übereinstimmten. Die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie sollte schließlich die Strukturen der Hauptmetabolite **M1**, **M2**, **M3A** und **M3B** liefern. Die Schwierigkeiten bei der Auswertung der NMR-Spektren lagen im Vorhandensein von mehreren isomeren Formen jedes Metaboliten. Der Hauptgrund war auf die strukturelle Eigenart der Chloracetamide zurückzuführen. Durch sterische und elektrostatische Effekte, sowie den Doppelbindungscharakter der N-CO-Bindung kommt es bei dieser Verbindungsklasse zur Ausbildung von Atropisomeren und Rotameren (Ledneczki *et al.* 2007; Nicole *et al.* 1980). Dies führt zu starren Isomeren, deren physikochemische Eigenschaften verschieden sind (Abbildung 3.9).

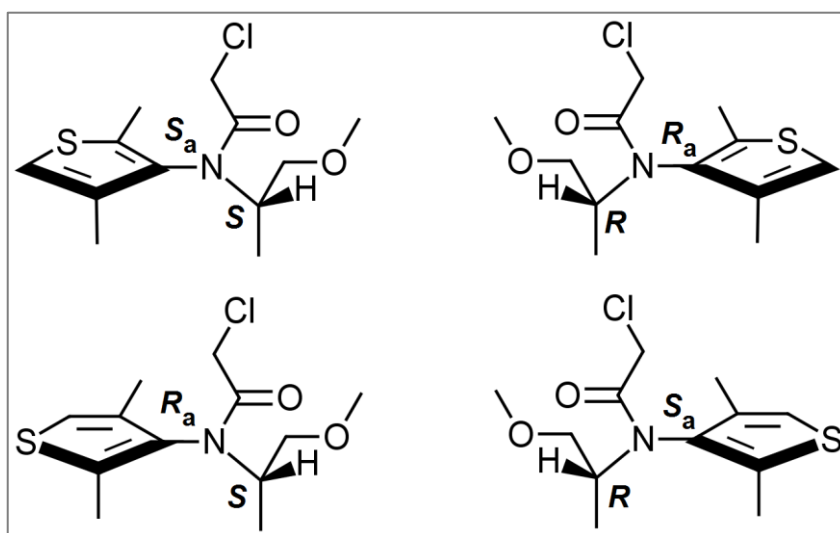


Abbildung 3.9: Die 4 möglichen Stereoisomere des DMTA-P.

Die NMR-Analyse ergab im Einklang mit den massenspektrometrischen Untersuchungen, dass es sich bei allen 4 Hauptmetaboliten um oxygenierte Spezies des DMTA-P handelte. Keines der Transformationsprodukte **M1**, **M2** und

M3A/B wurde bisher in der Literatur über DMTA-P Derivate beschrieben (Glavaški *et al.* 2014; Hladik *et al.* 2005a; Zimmerman *et al.* 2002). Metabolit **M1** gehört zu der schwer isolierbaren Gruppe der Thiophen-S-Oxide. Diese Verbindungen sind in der Regel instabil und zerfallen bei Raumtemperatur oder unter Lichteinwirkung zum korrespondierenden Thiophen (Gregory *et al.* 1997; Thiemann *et al.* 2009). Thiophen-S-Oxide neigen zudem wegen ihres Dien-Charakters zur Dimerisierung via Diels-Alder Reaktionen (Treiber *et al.* 1997). Deswegen konnten bisher nur wenige dieser Verbindungen isoliert und charakterisiert werden (Nakayama und Sugihara 1997; Thiemann *et al.* 2009). In dieser Arbeit konnte die Struktur des S-Oxides allerdings durch der NMR-spektroskopischen Daten mit den sehr charakteristischen Tieffeld-Verschiebungen eindeutig nachgewiesen werden (Geneste *et al.* 1979). Bekräftigt wurde dies durch MS/MS Experimente, bei denen eindeutig die Addition des Sauerstoffs an den Thiophenring nachgewiesen werden konnte. Zudem konnte bei Metabolit **M1** die charakteristische IR-Schwingung der S-O-Bindung (1041 cm^{-1}) beobachtet werden. Die Thermolabilität in der GC-MS Analyse (Zerfall zu DMTA-P) sowie der Zerfall nach mehrwöchiger Lagerung bei 4 °C unterstützen diese Ergebnisse. Dimerisierungs-Produkte des Metaboliten **M1** wurden nicht beobachtet. Bei Metabolit **M2** handelte es sich um das am Methylsubstituenten des Thiophenrings oxidierte Derivat von DMTA-P. Das Regioisomer an der anderen Methylgruppe (Position 1, Metabolit **M5**) konnte mittels GC-MS als Nebenprodukt nachgewiesen werden. Die Strukturaufklärung belegte, dass die Metaboliten **M3A** und **M3B** in ihrer Konstitution identisch waren. Durch die Ausbildung eines neuen Stereozentrums an der unsubstituierten Position des Thiophenrings entstanden so zwei voneinander trennbare Diastereomere des Thiolactons **M3A/B**. Die Bildung von Thiolactonen, ausgehend der Oxidation von substituierten Thiophenen, wurde in der Literatur bereits beschrieben (Rademacher *et al.* 2012). Die mögliche Vorstufe, das monohydroxylierte Thiophen-Derivat **MIII**, lagert sich im wässrigen Medium bei leicht sauren Bedingungen zum Thiolacton **M3A/B** um (Abbildung 3.10).

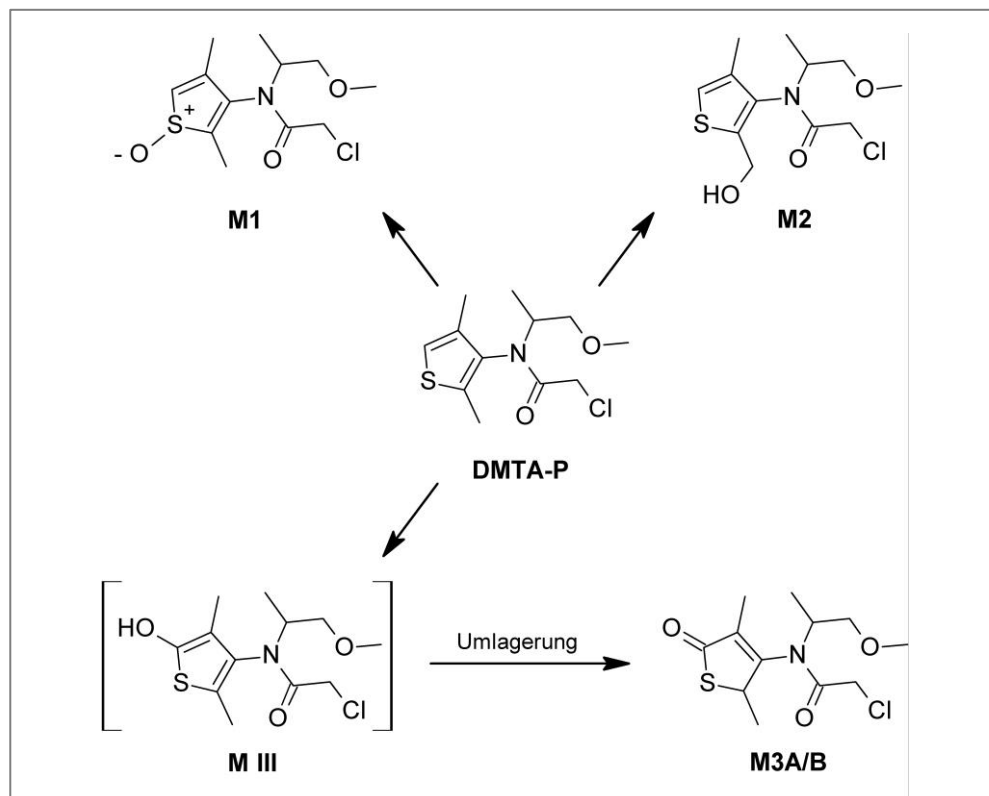


Abbildung 3.10: Die Hauptmetabolite der Biotransformation von DMTA-P durch *I. consors*.

GC-MS Untersuchungen konnten zusätzliche Strukturvorschläge für die bei den LC-MS Analysen gefundenen Nebenmetaboliten **M5** und **M7** hervorbringen (Abbildung 3.11).

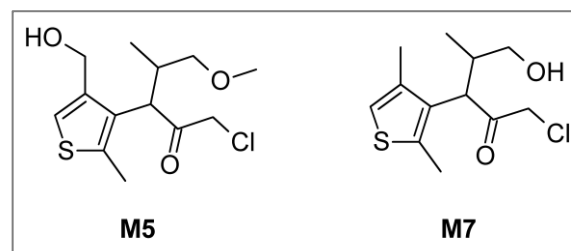


Abbildung 3.11: Strukturvorschläge für die Nebenmetabolite **M5** und **M7** aus der Biotransformation von DMTA-P durch *I. consors*.

Bei **M5** handelt es sich vermutlich um das Regioisomer des Metaboliten **M2**. Dieses wurde im Vergleich zu ersterem in deutlich geringeren Mengen gebildet. **M7** stellt möglicherweise ein demethyliertes Derivat von DMTA-P dar. Diese Art von Reaktion wurde bereits bei Biotransformationen von Xenobiotika durch Basidiomyceten beschrieben (Campoy *et al.* 2009; Liu *et al.* 1991). Die Strukturen müssen aber final mittels NMR-Spektroskopie verifiziert werden.

Es existieren kaum Studien zur mikrobiellen Biotransformation von DMTA-P und die vorhandenen beschäftigten sich eher mit dem Abbau des Substrats als mit der

Analyse der Transformationsprodukte (Buser und Mueller 1995; Crawford *et al.* 2002). Für den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit der Literatur muss daher die Biotransformation der verwandten Chloracetamide Acetochlor, Alachlor und Metolachlor herangezogen werden. Diese standen auf Grund ihres größeren Anwendungsvolumens im Vergleich zu DMTA-P im Fokus vorangegangener Studien zur Umsetzung mit Mikroorganismen (Grube *et al.* 2011; Stamper und Tuovinen 1998). Slaba *et al.* (2013) konnten kürzlich 10 oxygenierte Derivate von Alachlor identifizieren. In dieser Arbeit vermochten Flüssigkulturen des Ascomyceten *Paecilomyces marquandii* Alachlor einer Konzentration von 50 mg L⁻¹ in 7 Tagen fast komplett umzusetzen. Bei den identifizierten Metaboliten handelte es sich, anders als bei den hier vorgestellten Ergebnissen, ausschließlich um dechlorinierte und hydroxylierte Derivate. Dabei erfolgte die Hydroxylierung hauptsächlich an den *N*-Alkyl- und *N*-Acyl-Seitenketten. Eine Oxidation des aromatischen Ringes des Alachlors konnte bei der Biotransformation durch *Cunninghamella elegans* beobachtet werden (Pothuluri *et al.* 1993). In einer weiteren Studie zur Umsetzung des Alachlors durch den Ascomyceten *Chaetomium globosum* kam es hauptsächlich zur Dealkylierung und Deacylierung des Herbizids (Tiedje und Hagedorn 1975). Pothuluri *et al.* (1997) konnten demethylierte und hydroxylierte Derivate des Metolachlors in Submerskulturen mit *C. elegans* nachweisen. Dabei erfolgte die Hydroxylierung bevorzugt an den Alkyl-Seitenketten des aromatischen Ringes des Metolachlors, vergleichbar mit den in dieser Arbeit identifizierten Metabolite des DMTA-P **M2**, **M5** und **M7**. Eine der wenigen Umsetzungen von Chloracetamiden durch Basidiomyceten wurden von Liu *et al.* (1991) beschrieben. In dieser Arbeit konnten hydroxylierte und zyklisierte Metabolite des Metolachlors nachgewiesen werden. Alle detektierten Produkte waren im Gegensatz zur Umsetzung des DMTA-P zudem dechloriniert. Versuche mit extrazellulären, ligninolytischen Enzymen des Basidiomyceten *P. chrysosporium* zur Umsetzung von Alachlor führten hingegen lediglich zur *N*-Dealkylierung bzw. *N*-Deacylierung (Chirnside *et al.* 2011). Insgesamt wurde bei keiner der beschriebenen Biotransformationen eine aromatische Hydroxylierung beobachtet, wie es bei dem Präkursor des Metaboliten **M3A/B** vermutlich der Fall war. Bei der Verwendung von Bakterienkulturen von *Streptomyces* sp. wurden in Flüssigkulturen mit Alachlor diverse Metabolite mittels GC-MS identifiziert (Durães Sette *et al.* 2004). Dabei konnten neben Zyklisierungen auch Reduktionen des

Herbizides beobachtet werden, was diese Transformation deutlich von denen der Ascomyceten und Basidiomyceten unterscheidet.

Die Bildung aller isolierbaren Biotransformanten des DTMA-P wurde schließlich mit Hilfen der Massenspektrometrie und Markierungsexperimenten eindeutig nachgewiesen. Das an der unsubstituierten Position am Thiophenring ¹³C-markierte DMTA-P wurde im Verhältnis 1 zu 1 mit dem unmarkierten DMTA-P in der Kultivierung mit *I. consors* eingesetzt. In den Massenspektren aller isolierten Metabolite konnten um $m/z = 1$ erhöhte Massenzahlen detektiert werden. Somit konnte eine *de novo* Bildung der Metabolite ausgeschlossen und deren Biotransformation durch *I. consors* bewiesen werden.

3.5.4 Untersuchungen zu den beteiligten Enzymen von *Irpex consors*

Abschließend sollten einige Versuche über die beteiligten Enzyme der Biotransformation des DMTA-P durch *I. consors* unternommen werden. Die Umsetzung des DMTA-P war bereits nach 24 h fast komplett erfolgt. Alle 4 Hauptmetabolite wurden gleichzeitig und mit annähernd gleicher Intensität detektiert. Im Kulturüberstand wurden Laccase-Aktivitäten detektiert, allerdings führte das Abtrennen des Pilzmyzels nach 12 h aus der Kultur zum Abbruch der Umsetzung von DMTA-P. Somit musste die Umsetzung durch intrazelluläre oder Membran-gebundene Enzyme ablaufen. Eine mögliche Enzymklasse stellen die intrazellulären Cytochrom P450 Monooxygenasen (EC 1.14.14.1) dar. Diese Enzyme sind für ihre Hydroxylierungsreaktionen, wie sie bei den Metaboliten **M1**, **M2**, **M7** und vermutlich auch **M3A/B** auftraten (Guengerich 2001; Hrycay und Bandiera 2012; Matsuzaki und Wariishi 2004), bekannt. Besonders die Bildung des Thiophen-S-Oxides **M1** durch Oxidation mittels P450 Monooxygenasen, die in der Literatur ausgiebig erforscht wurde, sprechen für diesen Transformationsweg (Gilardi und Ichinose 2013; Gramec *et al.* 2014; Schlenk *et al.* 1994). Durch weitere umfangreiche Inhibierungsexperimente mit P450-Inhibitoren wie zum Beispiel Piperonylbutoxid könnten weitere Indizien für die Beteiligung von Monooxygenasen an der Umsetzung von DMTA-P durch *I. consors* gesammelt werden (Hodgson und Levi 1999). Ichinose *et al.* (1999) unterdrückten bei der

Umsetzung von 4-Methyldibenzothiophen zum korrespondierenden S-Oxid durch *Coriolus versicolor* die Produktbildung durch Zugabe dieses Inhibitors und wiesen so die Beteiligung einer P450 Monooxygenase indirekt nach. Generell sind aber die Isolierung von intrazellulären Cytochrom P450 Monooxygenasen bzw. der direkte Beweis deren Beteiligung an einer Biotransformation schwierig (Bernhardt und Urlacher 2014; Gilardi und Ichinose 2013).

3.6 Biotransformation des Dimethenamid-P-Sulfonsäure-Derivates M27 durch *Irpex consors*

3.6.1 Sulfonsäure-Derivate von Chloracetamiden

Das Aufkommen polarer Bodenmetabolite durch die Anwendung der Chloracetamid-Herbizide stellt ein grundlegendes Problem dar (s. 1.2). Die sulfonierten Derivate des DMTA-P sowie der prominenten Vertreter der Chloracetamide (unter anderem Alachlor, Acetochlor, Metolachlor, Propachlor) wurden bei einer Reihe von Studien in teilweise hohen Konzentrationen im Grundwasser gefunden (Vasiljević *et al.* 2012). Deren Bildungsweg wurde durch eine Vielzahl von Untersuchungen aufgeklärt (Feng 1991; Lamoureux *et al.* 1971, Abbildung 3.12).

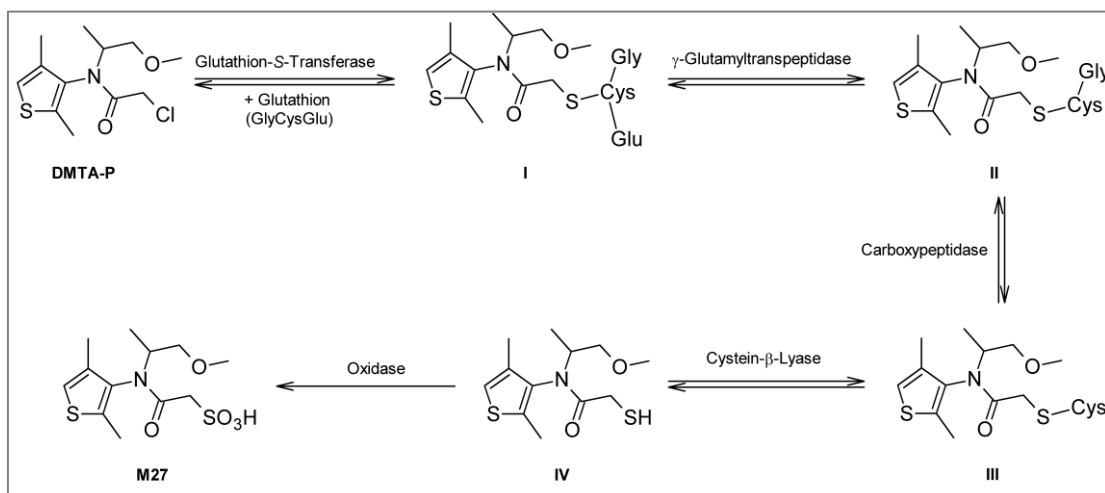


Abbildung 3.12: Postulierter Bildungsweg der Sulfonsäure-Derivate der Chloracetamide am Beispiel DMTA-P (nach Feng 1991).

Das Chloracetamid DMTA-P wird am elektrophilen, Chlor-tragenden Kohlenstoff durch eine Glutathion-S-Transferase substituiert. Das so gebildete Glutathion-

Addukt **I** wird in mehreren Schritten (**II**, **III**) durch spezifische Peptidasen und β -Lyasen zum korrespondierenden Thiol **IV** umgewandelt. Durch oxidative Enzyme wird daraus schließlich das Sulfonsäure-Derivat des entsprechenden Chloracetamides gebildet (hier **M27**, Feng 1991; Lamoureux *et al.* 1971). Dies gilt als einer der Hauptbildungswege der sauren Metabolite im Boden (Field und Thurman 1996). Diese Umwandlungen der Herbizide sind als Detoxifizierung vor allem bei Mikroorganismen und in pflanzlichen Zellen beschrieben (Lamoureux und Rusness 1989; Zablotowicz *et al.* 1995). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Zugaben von Safener zu Herbizid-Formulierungen diesen Metabolisierungsweg in den Nutzpflanzen sogar noch verstärkten. Bei einer Studie zur Metabolisierung von DMTA-P in Kombination mit dem Safener Fluxofenim konnte gezeigt werden, dass die Bildung verschiedener Glutathion-Addukte des DMTA-P in Weizen deutlich gesteigert wurde (Riechers *et al.* 1996).

3.6.2 Versuche zur Biotransformation des Metaboliten M27 durch Basidiomyceten

In einer zweiten Screening-Reihe sollte das DMTA-P-Derivat M27 in Flüssigkulturen durch Basidiomyceten umgesetzt werden. Die Vorgehensweise zur Umsetzung des Metaboliten M27 war an die Screening-Ergebnisse zur Biotransformation von DMTA-P angelehnt. Hierfür wurden neben *I. consors* 19 weitere Basidiomyceten unter Verwendung des gleichen Minimalmediums wie im vorherigen Screening untersucht (3.5.2). Die Basidiomyceten wurden nach größtmöglicher Biodiversität (Gattung, Familie) ausgewählt. Hierbei wurde allerdings auf ein Oberflächen-Screening verzichtet und das Minimalmedium direkt mit M27-supplementiert ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) und für die Flüssigkultivierung eingesetzt. Trotz mehrfacher Durchführung war mit den 20 untersuchten Basidiomyceten in Submerskultur keine Abnahme der M27-Konzentrationen zu beobachten. Möglicherweise fehlte es den Basidiomyceten an einem Enzyminduktor für die extrazelluläre Umsetzung von M27. Dieses ist, im Vergleich zum DMTA-P, durch die Sulfonsäure-Gruppe polarer und somit für die postulierte intrazelluläre Biotransformation (3.5.4) schlechter zugänglich. Zudem könnte die Umsetzung von M27 im aktiven Zentrum des Zielenzym durch die starke Polaritätsänderung nicht mehr möglich sein.

In der Literatur sind diverse Arbeiten zu Enzyminduktionen mittels Weizenstroh beschrieben. Diese behandeln unter anderem die Entfärbungen von Farbstoffen und Abwässern durch ligninolytische Enzyme von Basidiomyceten, bei denen durch Weizenstroh-Supplementierung deutlich höhere Aktivitäten gemessen wurden (D'Souza *et al.* 2006; Kenkebashvili *et al.* 2012). Angelehnt an diese Arbeiten wurde das M27-haltige Minimalmedium mit Weizenstroh (20 g L^{-1}) versetzt und die Flüssigkultivierung mit den 20 Basidiomyceten wiederholt. Unter diesen Bedingungen wurde bei den beiden Basidiomyceten *G. trabeum* und *I. consors* ein vollständiger Abbau von M27 festgestellt. Abiotische Kontrollen zeigten indes keine Abnahme der Substratkonzentration im Kulturüberstand, wie sie durch Adsorption an das Weizenstroh zu vermuten wäre. Die Sulfonsäure-Derivate der Chloracetamide sind wegen ihrer starken Polarität schwer von Matrix-Bestandteilen, zum Beispiel aus Bodenproben, abzutrennen (Aga und Thurman 2001). Auch in diesem Fall war eine Isolierung zur eindeutigen Identifizierung der gebildeten polaren M27-Derivate nicht möglich. Es wird vermutet, dass diese nicht mit der Umkehrphase wechselwirkten und so mit den polaren Matrixbestandteilen co-eluierten. Variationen der Fließmittelzusammensetzungen sowie Änderung der stationären HPLC-Phase auf Normalphase blieben erfolglos. Die Reduzierung der zugegebenen Weizenstrohmenge auf $5,0 \text{ g L}^{-1}$ führte ebenfalls nur zu einer unwesentlichen Minimierung der Matrixeffekte. Hierbei ist zu erwähnen, dass *I. consors* bei dieser Strohmenge M27 nicht mehr vollständig umzusetzen vermochte.

3.6.3 Alginat-Inklusion von Pilzmyzel zur Umsetzung von M27

Einen grundlegend verschiedenen Ansatz stellt die Inklusion des Pilzmyzels und des Weizenstrohs in eine Natrium-Alginat-Matrix dar. Die Verwendung von Natrium-Alginat wurde bereits ausführlich im Zusammenhang mit Bakterien, Hefen und isolierten Enzymen untersucht (Sanlier *et al.* 2013; Stormo und Crawford 1992; Ylivero *et al.* 2011). Versuche mit Basidiomyceten zielten vor allem auf Studien zur Viabilität und dem Abbau von Xenobiotika in Böden ab (Bennett *et al.* 2001). Die Zielsetzung dabei galt der geeigneten Inokulierung des Pilzes auf die belasteten Böden durch verschiedene Inklusionsmethoden. So konnten Lestan und Lamar (2009) zeigen, dass die Basidiomyceten *Bjerkandera adusta*,

Irpex lacteus und *Trametes versicolor* unter Anwendung der Alginat-Inklusion des Pilzmyzels in der Lage waren, bis zu 90% des Pentachlorophenols in einer unsterilen Bodenprobe abzubauen. Nemergut *et al.* (2012) erzielten ähnliche Ergebnisse mit dem Basidiomyceten *Marasmiellus troyanus*, der durch Alginat-Inklusion 90% des Benz[a]pyrens in einer Bodenprobe abzubauen vermochte. In einer weiteren Arbeit wurde ein Flüssigkulturmedium mit dem Farbstoff *acid black 52* durch den in Alginat-inkludierten Basidiomyceten *Funalia trogii* fast vollständig entfärbt (Park *et al.* 2006). Weitere Arbeiten zeigten aber auch die Notwendigkeit einer zusätzlichen Nährstoffquelle, wie beispielsweise Sägemehl, in der Alginat-Matrix, um die Viabilität des Pilzes zu steigern (Loomis *et al.* 1997). In der vorgestellten Arbeit wurden 2,5%ige Alginat-Hydrogele angesetzt. Die gleichzeitige Zugabe des zermahlenden Strohs (20 g L^{-1}) und dem suspendierten Pilzmyzel (50%, v/v) von *G. trabeum* bzw. *I. consors* beeinträchtigte die Festigkeit der Alginatperlen nach dem Aushärten nicht. Die Alginatperlen konnten problemlos in die Hauptkulturmedien inokuliert werden und es wurde keine Verfärbung des Kulturmediums im Verlauf der Kultivierung durch lösliche Reste des gemahlenden Strohs beobachtet. Dies wurde auch bei den HPLC-UV Untersuchungen der Kultüberstände auf den Abbau von M27 deutlich, bei denen kaum Matrixeffekte auftraten. Neben dem Verschwinden der Matrixeffekte konnte bei den Kulturen mit *I. consors* das Auftreten eines neuen Hauptmetaboliten festgestellt werden. Das M27 wurde nicht vollständig abgebaut, allerdings kam es zur Bildung eines einzelnen Hauptmetaboliten. Die Analyse des Kulturüberstandes mittels LC-MS ergab, dass es sich bei dem Hauptmetaboliten um ein chloriertes Derivat von M27 handeln musste. Die Isolierung des Metaboliten und anschließende NMR-spektroskopische Untersuchung des Metaboliten **M27Cl** ergab, dass es zu einer aromatischen Substitution an der unsubstituierten Position des Thiophenrings gekommen war (Abbildung 3.13).

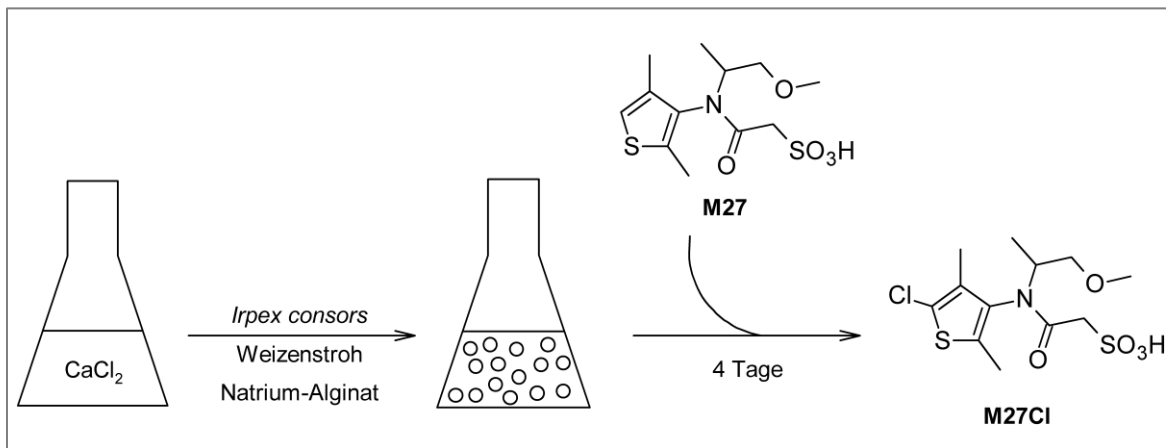


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Bildung des Metaboliten M27Cl durch Alginat-Inklusion von *I. consors*.

Die Umsetzung eines sulfonierten Chloracetamides durch Basidiomyceten ist in der Literatur bis dato noch nicht bekannt. Folglich handelt es sich bei dem Metaboliten M27Cl um ein nicht beschriebenes Derivat des DMTA-P. Es existieren allerdings Arbeiten zur Chlorierung des DMTA-P, bei denen ebenfalls eine Chlorierung der unsubstituierten Position des Thiophenrings beschrieben wurde (Sivey *et al.* 1986). Dabei wurde eine Chlorierung des DMTA-P bei der Desinfizierung von Trinkwasser durch Chlor und Chlormonoxid beobachtet. Der Unterschied der Biotransformation von M27 durch *I. consors* zwischen inkludiertem und nicht-inkludiertem Pilzmyzel ist wahrscheinlich auf die hohe lokale Konzentration an Chlorid-Ionen zurückzuführen. Für das Aushärten der Alginat-Matrix wurde nämlich eine 0,9 M Calciumchlorid-Lösung verwendet, weshalb eine hohe Chlorid-Konzentration im Alginat-Hydrogel anzunehmen war. Der Chlorierung von M27 muss zudem ein enzymatischer Prozess zu Grunde liegen, da in der abiotischen Kontrolle keine Spuren des chlorierten **M27Cl** gefunden wurden. Halogenierungen durch Basidiomyceten werden in der Regel von Haloperoxidasen (EC 1.11.1.10) verursacht (Hofrichter und Ullrich 2006). Diese Art von Enzymen kann entweder eine Häm- oder auch Vanadium-haltige prosthetische Gruppen beinhalten (Simons *et al.* 1995; Sundaramoorthy *et al.* 2010). Dabei können Halogenierungen bei einem weiten Spektrum an Substraten, vor allem aromatische Verbindungen, beobachtet werden (Murphy 2003; Vázquez-Duhalt *et al.* 2001). In einigen Fällen wurden Halogenierungen von Substraten auch durch Mangan- und Lignin-Peroxidasen aus Basidiomyceten beobachtet (Renganathan *et al.* 1987; Sheng und Gold 1997).

4 Ausblick

Die Modifizierung der Lignosulfonate durch Basidiomyceten verlief erfolgreich. Für etwaige biotechnologische Anwendungen der modifizierten Lignosulfonate müssen diese zwangsläufig in größeren Mengen produziert werden. Zudem müsste der Beweis erbracht werden, dass die isolierte versatile Peroxidase aus *I. consors* in der Lage ist, Lignosulfonate zu depolymerisieren. Zu diesem Zweck wäre eine heterologe Expression des Enzyms hilfreich, um diese in größeren Mengen zur Verfügung zu stellen. Des Weiteren könnte die isolierte versatile Peroxidase nach biochemischer Charakterisierung auf den Abbau anderer Polymere getestet werden. Auf Grundlage der erhaltenen Nukleotidsequenz der isolierten versatilen Peroxidase aus *I. consors* könnten spezifische Primer in homologen Bereichen zur gezielten Amplifizierung und Charakterisierung der beiden anderen Isoenzyme abgeleitet werden.

Die Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten durch den Basidiomyceten *G. trabeum* konnte in dieser Arbeit erreicht werden. Darüber hinaus wurde die Modifizierung der Lignosulfonate im größeren Maßstab erfolgreich durchgeführt werden. Optimierungen der Raum-Zeit-Ausbeuten, sprich Versuche mit höher konzentrierten Mengen an Lignosulfonaten bei gleichzeitig kürzerer Kultivierungsdauer wären hierbei erstrebenswert. Zudem könnten Versuche in einem kontinuierlichen System unternommen werden, um eine stetige Produktion an modifizierten Lignosulfonaten zu erzielen. In diese Arbeiten könnte der ebenfalls erfolgreich identifizierte Basidiomycet *A. serialis* eingebunden werden. Einen weiteren Aspekt stellt die Co-Kultivierung der beiden Basidiomyceten *I. consors* und *G. trabeum* dar. Das Ziel wäre hierbei die simultane Modifikation der Lignosulfonate (Depolymerisierung und Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen) zu bewerkstelligen.

Bei der Umsetzung von DMTA-P durch *I. consors* wurden 4 Hauptmetabolite erfolgreich charakterisiert. Zum Abschließen dieser Arbeit wäre die vollständige Charakterisierung aller detektierten Nebenmetabolite noch wünschenswert. Ferner wäre die Identifizierung des verantwortlichen Enzyms für diese Umsetzung erstrebenswert, um eventuell weitere Substrate (zum Beispiel M27) auch in höheren Konzentrationen gezielt zu transformieren. Beim Screening zur Umsetzung von DMTA-P konnte von 29 Basidiomyceten nur *I. consors* DMTA-P

transformieren. Eine Erweiterung des Screenings, beziehungsweise die Variation der Kulturbedingungen könnte weitere Kandidaten hervorbringen. Das gilt auch für das Screening zur Umsetzung des DMTA-P Derivates M27, bei dem erst die Zugabe von Weizenstroh eine Biotransformation induzierte. Generell ist auch über die Verwendung von Mischkulturen (auch anderer Mikroorganismen) nachzudenken, da dies näher an den Bedingungen des Mikrokosmos im Boden liegt.

Die bei der Stroh-induzierten Biotransformation von M27 entstandenen, stark polaren Metabolite müssten durch die Auswahl einer geeigneten Trennmethode, zum Beispiel Festphasenextraktion, isoliert und charakterisiert werden. Zur Umsetzung von M27 durch Alginat-Inklusion von *I. consors* und *G. trabeum* könnten noch weitere Versuche zur Optimierung (pH, Temperatur, Konzentration) unternommen werden. So wäre speziell von Interesse, welche enzymatischen Reaktionen der Transformation zugrunde liegen. Zudem könnte untersucht werden, ob neben der Chlorierung auch eine Bromierung und Iodierung von M27 oder anderer Substrate möglich wäre. Des Weiteren müssten abschließend noch die bei der Umsetzung von M27 durch Alginat-inkludierten *G. trabeum* entstandenen Metabolite identifiziert und charakterisiert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen wurden über das Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Niederlande), die Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen (DSMZ, Braunschweig) und die Sylvan Inc. (Horst, Niederlande) erworben. Ein Teil der Mikroorganismen wurde am Institut für Lebensmittelchemie und -biotechnologie (LCB) selbst isoliert.

5.1.2 Chemikalien und Substrate

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 5.1 aufgelistet.

Tabelle 5.1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Qualität	Hersteller
ABTS [®] -Diammonium-Salz	BioChemica	Applichem (Darmstadt)
Aceton	≥ 99,9%	Roth (Karlsruhe)
Acetonitril	HiPerSolv CHROMANORM [®]	VWR Chemicals (Darmstadt)
Agar-Agar, Kobe I	für Molekularbiologie	Roth
Agarose LE		Biozym (Hessisch Oldendorf)
Albumin Fraktion V aus Rinderserum (BSA)	98%	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Ameisensäure	≥ 50%	Roth
Ammoniumnitrat	98%, ACS <i>reagent</i>	Acros Organics (Geel, Belgien)
Ammoniumsulfat	≥ 95,5%, p.a., ACS, ISO	Roth
L-Asparagin-Monohydrat	BioChemica	Applichem
Biphenyldicarbonsäure	98%	Acros Organics
Bromphenolblau-Natrium-Salz	f. d. Elektrophorese	Roth
Calciumchlorid-dihydrat	p.a.	Applichem

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Chloroform-d ₁	99,8% deuteriert	Acros Organics
Coomassie Brilliant Blau G250	reinst	Applichem
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	zur Analyse, p.a.	Applichem
Essigsäure	Rotipuran®, 100 %, p.a.	Roth
Essigsäureethylester	HiPerSolv, CHROMANORM®	VWR
Ethanol	99,5%, reinst	Roth
Ethidiumbromid	1%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure/ EDTA)	≥ 99%,	Roth
D-(+)-Glucose	für die Mikrobiologie	Roth
Glycerin	≥ 98%, Ph. Eur., wasserfrei	Roth
Hefeextrakt	p.a.	OXOID Limited (Wesel)
Kaliumacetat	reinst, Ph. Eur.	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p.a., ACS	Roth
Kaliumchlorid	p.a.	Merck (Darmstadt)
di-Kaliumhydrogenphosphat	wasserfrei, reinst	Roth
Katalase <i>from bovine liver</i>	10.000–40.000 U mg ⁻¹ Protein; 45 mg Protein mL ⁻¹	Sigma Aldrich
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	zur Analyse, p.a.	Applichem
Laccase (<i>T. versicolor</i>)	26.0 U mg ⁻¹ Protein	Sigma-Aldrich
Lignosulfonsäure Natriumsalz	-	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	≥ 99%	Roth
Magnesiumsulfat-Hydrat	≥ 99%, getrocknet, reinst, DAC	Roth
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	zur Analyse, p.a.	Applichem
Malzextrakt	für die Mikrobiologie	Sigma-Aldrich
Methanol	Rotisolv® HPLC	Roth
Isopropanol	ROTIPURAN® min. 99,8 %, p.a.	Roth
Natriumacetat	wasserfrei zur Analyse	Applichem
Natriumalginat aus Braunalgen	für die Immunologie	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	>99%	Roth
Natriumhydroxid	p.a.	Applichem

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Natriumnitrit	zur Analyse, ACS, Ph. Eur.	Merck
Natriumpolystyrolsulfonat	100%	PSS (Mainz)
Natriumsulfat	wasserfrei, ≥ 99 %, p.a.	Roth
Orange G	f. d. Elektrophorese	Roth
o-Phosphorsäure	>85%, p.a.	Roth
Roti [®] -Nanoquant	5x-Konz.	Roth
Salzsäure	rauchend 37%, Rotipuran [®] , p.a.	Roth
Stickstoff	5.0	Air Liquide (Paris, Frankreich)
TRIS PUFFERAN [®]	≥ 93%, <i>buffer grade</i>	Roth
Trypton	BioChemica	Applichem
Weizenstroh	gemahlen	Betrieb Gladbacherhof (Villmar)
Wasserstoffperoxid-Lösung	≥ 30%	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	f. d. Elektrophorese	Merck
Zink(III)-sulfat-Heptahydrat	zur Analyse, p.a.	Applichem

Tabelle 5.2: Verwendete Substrate.

Substrat	Spezifikation	Hersteller
Bretax Cl (Sulfitablaugung mit Calcium- Lignosulfonat)	52% (w/w)	Burgo Group spa (Altavilla Vicentina, Italien)
Dimethenamid- P (S-(2-Chlor-N-(2,4-dimethyl- thienyl)-N-(2-methoxy-1- methylethyl)acetamid)	≥ 96,8%	BASF (Ludwigshafen)
[¹³ C]-Dimethenamid- P	≥ 97,1%	BASF
M27 (2-[(2,4-Dimethyl-3-thienyl)(2- methoxy-1-methylethyl)amino]- 2-oxo-)ethansulfonsäure)	≥ 97,1%	BASF

5.1.3 Geräte und sonstige Hilfsmittel

Hier nicht aufgeführte Geräte werden in den Folgekapiteln ausführlich beschrieben.

Tabelle 5.3: Verwendete Geräte und sonstige Hilfsmittel.

Gerät	Modell	Hersteller
Analysenwaage	SI-234A	Denver Instrument (Göttingen)
Autoklav (groß)	Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik (Magdeburg)
Autoklav (klein)	Laboklav 25B	SHP Steriltechnik
Brutschrank	INE 500	Memmert (Schwabach)
Dispergiergerät	Ultra-Turrax T 25 digital	IKA® (Staufen)
Dispergierwerkzeug	S 25 N – 18 G	IKA®
Filtrierpapier	rund, qualitativ, mittel/schnell	Lab Logistics Group (Meckenheim)
Feuchtebestimmer	MA 35	Sartorius (Göttingen)
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 1-2 LD plus	CHRiST® (Osterode am Harz)
Geldokumentation	DeVision G	Decon Science Tec (Hohengandern)
Inkubationsschüttler	Orbitron	Infors HAT (Bottmingen, Schweiz)
Laborwaage	Atilon	Acculab Sartorius
Kühler	Minichiller	Huber (Offenburg)
Mehrkanalpipette	ResearchPro 50-1200 mL	Eppendorf (Hamburg)
Membranfilter	regenerierte Cellulose ($\varnothing = 0,20 \mu\text{m}$)	GE Healthcare (München)
Membranfilter (Spritzen)	Chromafil® PET-20/15 MS ($\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$)	Macherey-Nagel (Düren)
Mikrotiterplattenphotometer	Synergy 2	BioTek® (Winooski, USA)
NanoPhotometer™	PEARL	Implen (München)
Orbitalschüttler	gyro-rocker SSL 3	Bibby Scientific (Staffordshire, UK)
PCR-Cycler	CFX Conntect	Bio-Rad (München)

Gerät	Modell	Hersteller
Pipette 2-20 µL	Peqette	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Pipette 20-200 µL	Peqette	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipette 200-1000 µL	Peqette	Peqlab Biotechnologie GmbH
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Reinstwasser-Anlage	arium [®] 611 VF	Sartorius
Rotationsverdampfer	RV10 basic	IKA [®]
Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena (Jena)
Sterilfilter	Rotilabo [®] - Spritzenfilter, CME, steril, 0,22 µm	Roth
Sterilwerkbank	HERA safe KS 18	Thermo Scientific (Karlsruhe)
Tischzentrifuge	Allegra X-15R	Beckman Coulter (Krefeld)
Tischzentrifuge	Microfuge [®] 22R	Beckman Coulter
Trockenschrank	Heraeus T6	Thermo Scientific
Ultraschallbad	Elma T710DH	OMNILAB (Bremen)
Vakuumpumpe	RV10 basic	IKA [®]
Vortexer	VTX-3000L	LMS (Portsmouth, UK)

5.2 Mikrobiologie

5.2.1 Verwendete Kulturmedien

Alle aufgeführten Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt, mit 1 M NaOH auf pH = 6,0 eingestellt und 20 min bei 121 °C autoklaviert.

5.2.1.1 Nährmedien für die Transformation

Tabelle 5.4: LB_{AMPX}-Medium für die Transformation von *E. coli*-Klonen.

Komponente	Konzentration
Trypton	10,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
Natriumchlorid	5,0 g L ⁻¹
Ampicilin	0,1 g L ⁻¹

Der pH-Wert des LB_{AMPX}-Mediums wurde mit 1 M NaOH auf pH = 7,0 eingestellt. Ampicilin wurde erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf ca. 50 °C zugegeben. Zur Herstellung des entsprechenden LB_{AMPX}-Agars wurden 15,0 g L⁻¹ Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben. Für die Anzucht von Klonen wurden im LB_{AMPX}-Medium 10,0 g L⁻¹ Natriumchlorid verwendet.

Tabelle 5.5: SOC-Medium zur Regenerierung.

Komponente	Konzentration
Trypton	20,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
Natriumchlorid	0,6 g L ⁻¹
Kaliumchlorid	0,2 g L ⁻¹
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	2,0 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	2,5 g L ⁻¹
D-(+)-Glucose	4,0 g L ⁻¹

5.2.1.2 Vorkulturmedien

Die aufgeführten Medien dienen zur Erzeugung von Biomasse der entsprechenden Basidiomyceten.

Tabelle 5.6: Modifizierte Standardnährlösung (SNL, Sprecher und Hanssen 1982).

Komponente	Konzentration
D-(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,0 mL L ⁻¹

Zur Herstellung des entsprechenden SNL-Agars wurden zusätzlich 15,0 g L⁻¹ Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

Tabelle 5.7: Malzextrakt-Medium (ME, 2,0%).

Komponente	Konzentration
Malzextrakt	20,0 g L ⁻¹

Zur Herstellung des entsprechenden ME-Agars (1,0%) wurden 10,0 g L⁻¹ Malzextrakt und 15,0 g L⁻¹ Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

Tabelle 5.8: Spurenelementlösung.

Komponente	Konzentration
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	0,080 g L ⁻¹
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	0,005 g L ⁻¹
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	0,030 g L ⁻¹
Zink(III)-sulfat-Heptahydrat	0,090 g L ⁻¹
EDTA-Dinatriumsalz	0,400 g L ⁻¹

5.2.1.3 Screening-Medien

Für das Screening in Emers- und Flüssigkulturen zur Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate wurde folgendes Medium verwendet (Tabelle 5.9). Zur Herstellung des entsprechenden Agars wurden 15,0 g L⁻¹ Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugegeben.

Tabelle 5.9: Medium zur Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten.

Komponente	Konzentration
Ammoniumnitrat	1,0 g L ⁻¹
Bretax Cl*	20,0 mL L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,0 mL L ⁻¹

*1 zu 2 mit Reinstwasser verdünnt.

Die Umsetzung von DMTA-P wurde durch ein Vorscreening mit Basidiomyceten auf Agar-Platten unterschiedlicher Konzentration untersucht. Für das Flüssig-Screening zur Umsetzung von DMTA-P wurde Medium B ohne Agar-Agar verwendet (Tabelle 5.10).

Tabelle 5.10: Für das DMTA-P-Screening eingesetzte Medien.

Komponente	Konzentration			
	Medium A	Medium B	Medium C	Medium D
Agar-Agar	15,00 g L ⁻¹	15,00 g L ⁻¹	15,00 g L ⁻¹	15,00 g L ⁻¹
Ammoniumnitrat	1,00 g L ⁻¹	1,00 g L ⁻¹	1,00 g L ⁻¹	1,00 g L ⁻¹
DMTA-P*	0,25 g L ⁻¹	0,50 g L ⁻¹	0,50 g L ⁻¹	1,00 g L ⁻¹
D-(+)-Glucose-Monohydrat	0,15 g L ⁻¹	0,15 g L ⁻¹	1,50 g L ⁻¹	0,15 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,50 g L ⁻¹	1,50 g L ⁻¹	1,50 g L ⁻¹	1,50 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,50 g L ⁻¹	0,50 g L ⁻¹	0,50 g L ⁻¹	0,50 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,00 mL L ⁻¹	1,00 mL L ⁻¹	1,00 mL L ⁻¹	1,00 mL L ⁻¹

*sterile Zugabe nach dem Autoklavieren (819 µL \cong 1,00 g). Als Referenz-Agar wurde Medium A ohne Zugabe von DMTA-P gewählt.

Für das Screening zur Umsetzung von M27 wurde nachstehendes Medium verwendet (Tabelle 5.11).

Tabelle 5.11: Stroh-Supplementierung zur Umsetzung von M27.

Komponente	Konzentration
Ammoniumnitrat	1,0 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
M27*	0,1 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,00 mL L ⁻¹
Weizenstroh (fein gemahlen)	20,0 g L ⁻¹

*Zugabe mittels Sterilfiltration einer wässrigen Lösung

5.2.1.4 Hauptkulturmedien

Alle Bestandteile der Bretax Cl-haltigen Kulturen wurden vor dem Autoklavieren zusammengegeben. Die jeweiligen Medien wurden in entsprechende Erlenmeyerkolben überführt, mit Cellulose Stopfen verschlossen und anschließend mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Tabelle 5.12: Hauptkulturmedium zur Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten.

Komponente	Konzentration
Bretax Cl*	40,0 mL L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,0 mL L ⁻¹

*1 zu 2 mit Reinstwasser verdünnt.

Tabelle 5.13: Hauptkulturmedium zur Molekulargewichtsverringering von Lignosulfonaten.

Komponente	Konzentration
Bretax Cl*	20,0 mL L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,0 mL L ⁻¹

*1 zu 2 mit Reinstwasser verdünnt.

Tabelle 5.14: Hauptkulturmedium zur Erhöhung der Anzahl phenolischer Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten im Bioreaktor.

Komponente	Konzentration
Ammoniumnitrat	0,1 g L ⁻¹
Bretax Cl*	40,0 mL L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,1 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,0 mL L ⁻¹

*1 zu 2 mit Reinstwasser verdünnt.

Tabelle 5.15: Hauptkulturmedium für die Biotransformation von DMTA-P.

Komponente	Konzentration
Ammoniumnitrat	1,0 g L ⁻¹
DMTA-P*	0,5 g L ⁻¹
D-(+)-Glucose-Monohydrat	3,0 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,0 mL L ⁻¹

*sterile Zugabe von 409 µL L⁻¹.

Tabelle 5.16: Hauptkulturmedium für die Biotransformation von M27.

Komponente	Konzentration
Ammoniumnitrat	1,0 g L ⁻¹
D-(+)-Glucose-Monohydrat	3,0 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
M27*	50–100 mg L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,0 mL L ⁻¹

*Zugabe mittels Sterilfiltration einer wässrigen Lösung

Die Substrate und Glucose für die Hauptkulturmedien der Biotransformationen von DMTA-P und M27 wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

5.2.2 Kulturführung

5.2.2.1 Stammhaltung

Von den in dieser Arbeit verwendeten Pilzstämmen wurde jeweils eine Stammkultur auf ME-Agarplatten (5.2.1.1) angelegt. Dazu wurde eine Agarplatte mit einem ca. 1 cm² großen, mit Myzel bewachsenen Agar-Stück beimpft, mit Parafilm[®] verschlossen und im Brutschrank eine Woche bei 24 °C kultiviert. Nachdem die Platte zur Hälfte mit Myzel bewachsen war wurde die Kultur bei 4 °C gelagert. Die Stammkulturen wurden regelmäßig nach dem gleichen Verfahren überimpft.

5.2.2.2 Vorkulturen

Für die Anzucht der Vorkulturen wurden verschiedene Vorkulturmedien verwendet (5.2.1.1). Pro 100 mL Nährmedium wurde ein ca. 1 cm² großes, mit Myzel bewachsenes Agar-Stück (5.2.2.1) steril in einen Erlenmeyerkolben mit Cellulose-Stopfen überführt und mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator homogenisiert (30 s, 10.000 U min⁻¹). Die Kultivierung erfolgte unter Lichtausschluss für 7 Tage auf dem Inkubationsschüttler (24 °C, 150 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm).

5.2.2.3 Vorscreening

Die Screening-Agarplatten (5.2.1.3) wurden jeweils mit einem mit Myzel bewachsenen Stück ME-Agar (1 cm², 5.2.2.1) von vorkultivierten Basidiomyceten beimpft. Die Platten wurden mit Parafilm[®] verschlossen und unter Lichtausschluss in einem Konstantraum bei 24 °C für 14 Tage gelagert.

5.2.2.4 Submers-Screening

100 mL Hauptkulturmedium (5.2.1.3) wurden in einen 250 mL Erlenmeyerkolben gefüllt. Jeweils zwei 1 cm² große mit Myzel bewachsene ME-Agar-Stücke des entsprechenden Pilzes wurden in den Erlenmeyerkolben gegeben und mittels Ultra-Turrax homogenisiert (10.000 U min⁻¹; 30 s). Die Kulturen wurden über einen bestimmten Zeitraum bei 24 °C auf einem Inkubationsschüttler (150 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) unter Lichtausschluss inkubiert. Zusätzlich wurde ein abiotischer Blindwert mitgeführt.

5.2.2.5 Hauptkulturen für die Modifizierung von Lignosulfonaten

Zum Ansetzen der Hauptkulturen wurden die Vorkulturen (5.2.2.3) für 30 s bei 10.000 U min⁻¹ homogenisiert. 10 Vol.-% homogenisierte Vorkultur wurden in einen 500 mL Erlenmeyerkolben, der mit 200 mL Kulturmedium (5.2.1.4) befüllt war, überführt. Für die Blindprobe wurde 10 Vol.-% Vorkulturmedium (5.2.1.1) zugegeben. Die Kulturen wurden bei 24 °C unter Lichtausschluss auf dem Inkubationsschüttler kultiviert (150 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm). Die Kulturdauer variierte je nach Zielsetzung und Kulturbedingungen. Alle Kulturen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. In regelmäßigen Intervallen wurden Proben steril entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

5.2.2.6 Hauptkulturen für die Umsetzung von DMTA-P und M27

Die Vorkulturen (5.2.2.3) wurden homogenisiert (10.000 U min⁻¹; 30 s), ein Aliquot von 50 mL entnommen, in 50 mL Falcontubes überführt und zentrifugiert (3.724 g, 4 °C, 10 min). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pilzmyzel mit 50 mL

autoklaviertem Reinstwasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Myzel in 50 mL Reinstwasser resuspendiert. Jeweils 10 mL dieser Suspension wurden in 100 mL Hauptkulturmedium (5.2.1.4) in 250 mL Erlenmeyerkolben überführt und bei 24 °C unter Lichtausschluss auf einem Inkubationsschüttler (150 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) kultiviert. Die Kulturdauer variierte je nach Zielsetzung und Kulturbedingungen. Für den abiotischen Blindwert wurde das Hauptkulturmedium mit 10 Vol.-% Vorkulturmedium ohne Pilz versetzt. In regelmäßigen Intervallen wurde jeweils 1 mL Probe steril entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

5.2.3 Bestimmung der Kulturparameter

5.2.3.1 pH-Wert

Der pH-Wert der Kulturen wurde unmittelbar nach Probennahme mit Hilfe eines täglich kalibrierten pH-Meters bestimmt.

5.2.3.2 Biotrockenmasse

Der gesamte Kolbeninhalt einer Hauptkultur wurde durch einen tarierten Rundfilter unter Vakuum filtriert und der Kolben sowie der Filterkuchen mit destilliertem Wasser nachgewaschen. Rundfilter und Myzel wurden bei -21 °C tiefgefroren und anschließend für drei Tage lyophilisiert.

5.2.3.3 Glucose-Gehalt

Der Glucose-Gehalt der Kulturüberstände wurde mit dem D-Glucose/D-Fructose UV-Test Kit (R-Biopharm, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Als Referenz diente eine 0,5 g L⁻¹ D-Glucose-Lösung.

5.3 Modifizierung von Lignosulfonaten durch Basidiomyceten

5.3.1 Molekulargewichtsverringering von Lignosulfonaten durch Flüssigkulturen von *Irpex consors*

Für die Verringerung des Molekulargewichts der Lignosulfonate wurde der Weißfäule-Pilz *Irpex consors* verwendet. Die Kulturführung der Flüssigkulturen der Standard-Kultivierung ist in 5.2.2 beschrieben. Abweichend von den Standard-Kultivierungsbedingungen in 5.2.1.4 wurden die Zugabemenge an Sulfitablauge zur Untersuchung dieses Kulturparameters verändert (Tabelle 5.17).

Tabelle 5.17: Verwendete Kulturparameter; KH_2PO_4 = Kaliumdihydrogenphosphat, MgSO_4 = Magnesiumsulfat-Hydrat, SE-Lsg = Spurenelementlösung, sonst. = sonstiges, VK = Vorkultur, Vol = Medienvolumen.

Medium	Vol [mL]	Bretax Cl* [mL L ⁻¹]	KH_2PO_4 c [g L ⁻¹]	MgSO_4 c [g L ⁻¹]	SE-Lsg [mL L ⁻¹]
BC20 (Standard)	200	20	1,5	0,5	1,0
BC40	200	40	1,5	0,5	1,0
BC80	200	80	1,5	0,5	1,0

*1 zu 2 mit Reinstwasser verdünnt.

5.3.2 Erhöhung der Anzahl an phenolischen Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten

5.3.2.1 Screening von Basidiomyceten

Für das Emers- und Submers-Screening (5.2.1.3) zur Steigerung der Anzahl an phenolischen Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate wurden folgende Basidiomyceten ausgewählt (Tabelle 5.18).

Tabelle 5.18: Liste der eingesetzten Basidiomyceten im Screening;
BF = Braunfäule, WF = Weißfäule.

Pilz	Abk.	Schadbild	Herkunft	Stamm-Nr.
<i>Agrocybe aegerita</i>	AAE	WF	Sylvan	4022
<i>Antrodia serialis</i>	ASER	BF	LCB	216*
<i>Antrodia xantha</i>	AXA	BF	LCB	200*
<i>Coprinellus micaceus</i>	CMI	WF	LCB	212*
<i>Coprinus xanthothrix</i>	CXA	WF	DSMZ	4961
<i>Daedalea quercina</i>	DQU	BF	LCB	193*
<i>Fomitopsis cajanderi</i>	FCA	BF	DSMZ	4988
<i>Fomitopsis pinicola</i>	FPI-F	BF	LCB	192*
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	GAB	BF	DSMZ	1210
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	GOD	BF	LCB	198*
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	GTR	BF	LCB	227*
<i>Laetiporus sulphureus</i>	LSU	BF	DSMZ	2785
<i>Lenzites betulina</i>	LBE	WF	LCB	215*
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	PSCH	BF	DSMZ	5136
<i>Piptoporus betulinus</i>	PBE	BF	LCB	201*
<i>Porostereum spadiceum</i>	PSPA	WF	LCB	204*
<i>Postia caesia</i>	POCA	BF	DSMZ	5124
<i>Trametes hirsutum</i>	THI-F	WF	LCB	190*
<i>Trametes suaveolens</i>	TSU	WF	DSMZ	5237
<i>Wolfiporia cocos</i>	WCO-C	BF	CBS	279.55

*Interne Stammnummer des LCB.

5.3.2.2 Variation der Kulturparameter

Alle Vor- und Hauptkulturen wurden wie in 5.2.2 gezeigt angesetzt. Tabelle 5.19 zeigt die untersuchten Medienzusammensetzungen. Die Standard-Kultivierungsbedingungen sind in 5.2.1.4 aufgelistet.

Tabelle 5.19: Zusammensetzung der Kulturmedien; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ = Eisen(III)-sulfat, NH_4NO_3 = Ammoniumnitrat, KH_2PO_4 = Kaliumdihydrogenphosphat, MgSO_4 = Magnesiumsulfat-Hydrat, SE-Lsg = Spurenelementlösung, sonst. = sonstiges, VK = Vorkultur, Vol = Medienvolumen.

Medium	Vol [mL]	Bretax Cl* [mL L ⁻¹]	NH_4NO_3 [g L ⁻¹]	KH_2PO_4 c [g L ⁻¹]	MgSO_4 c [g L ⁻¹]	SE-Lsg [mL L ⁻¹]	sonst.
BN20/200	200	20	1,0	1,5	0,5	1,0	-
BN-S	200	20	1,0	1,5	0,5	1,0	Schikane-kolben
BN40	200	40	1,0	1,5	0,5	1,0	-
BN-FE	100	20	1,0	1,5	0,5	1,0	8,0 g L ⁻¹ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
BN-SE	100	20	1,0	1,5	0,5	-	-
BN80	100	80	1,0	1,5	0,5	1,0	-
BN20/100	100	20	1,0	1,5	0,5	1,0	-

*1 zu 2 mit Reinstwasser verdünnt.

5.3.2.3 Kultivierung von *G. trabeum* im Bioreaktor

Die Kultivierung erfolgte in einem 20 L Bio Bench System (Applikon Biotechnology, Delft, Niederlande) und 14 L Hauptkulturmedium (Tabelle 5.14). Die Hauptkultur wurde mit 1,4 L (10 Vol.-%) der homogenisierten Vorkultur (Tabelle 5.7) inokuliert und 14 Tage kultiviert. Die Probenentnahme erfolgte alle 7 Tage unter sterilen Bedingungen. Die Daten der Fermentation sind Tabelle 5.20 in aufgeführt.

Tabelle 5.20: Daten der Fermentation von *G. trabeum* in Lignosulfonat-haltigem Medium.

Spezifikation	
Innendurchmesser	211 mm
Innenhöhe	607 mm
Gesamtvolumen	20,0 L
Arbeitsvolumen	15,0 L
H/D Gesamt	3,0
Rührer	3 x 6-Blatt-Scheibenrührer
oberer Rührer	205 mm
mittlerer Rührer	185 mm
unterer Rührer	65 mm
Temperatur	24,0 °C
Rührergeschwindigkeit	120 rpm
Begasungsrate	1. Tag: 3 L min ⁻¹ (0,2 vvm) ab 2. Tag: Setpoint pO ₂ = 76,0%

5.3.3 Kulturbegleitende Analytik

5.3.3.1 Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von Lignosulfonaten mittels Gel-Permeations-Chromatographie

Zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der Lignosulfonate wurde folgende HPLC-Anlage verwendet (Tabelle 5.21).

Tabelle 5.21: HPLC-Anlage für die Gel-Permeations-Chromatographie.

Gerät	Modell	Hersteller
HPLC-Einheit	Jasco LC-Net II / ADC	JASCO (Groß-Umstadt)
Pumpe	Jasco PU-2080 plus	JASCO
Gradient-Einheit	Jasco LG-2080-025	JASCO
Entgasungs-Einheit	Jasco DG-2080-53	JASCO
Detektor	Jasco UV-2075 plus	JASCO
Autosampler	Sampling 231, Injector XL	Gilson (Middleton, USA)
Autosampler-Pumpe	Syringe Pump 402	Gilson

Die Messung der Proben erfolgte nach einer Methode von (Hofrichter *et al.* 1999) (Tabelle 5.22). Für die Messung von Kulturüberständen wurden die Proben jeweils 1 zu 3 (20 mL L⁻¹ Bretax CI), 1 zu 6 (40 mL L⁻¹ Bretax CI) oder 1 zu 12 (80 mL L⁻¹ Bretax CI) verdünnt und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert.

Tabelle 5.22: Chromatographische Parameter; K₂HPO₄ = Dikaliumhydrogenphosphat, NaNO₃ = Natriumnitrat.

Spezifikation	
Trennsäule	MCX, 1.000 Å, 5 µm, 300/8, (PSS)
Vorsäule	MCX 1.000 Å, 5 µm (PSS)
Eluent	Wasser/Acetonitril 80:20 (v/v) + 5,0 g L ⁻¹ NaNO ₃ , + 2,0 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ , pH 10
Injektionsvolumen	20 µL
Flussrate	1,0 mL min ⁻¹
Modus	isokratisch
Detektion	254 nm
Analysedauer	17,0 min

Die Säule wurde mit 4,4'-Biphenyldicarbonsäure (242 Da) und Natriumpolystyrolsulfonsäure-Standards mit den Molekulargewichten 1.100 Da, 4.230 Da, 6.520 Da, 10.600 Da, 14.900 Da und 63.900 Da (à 1,0 g L⁻¹ im Eluenten gelöst und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert) kalibriert (Abbildung 5.1).

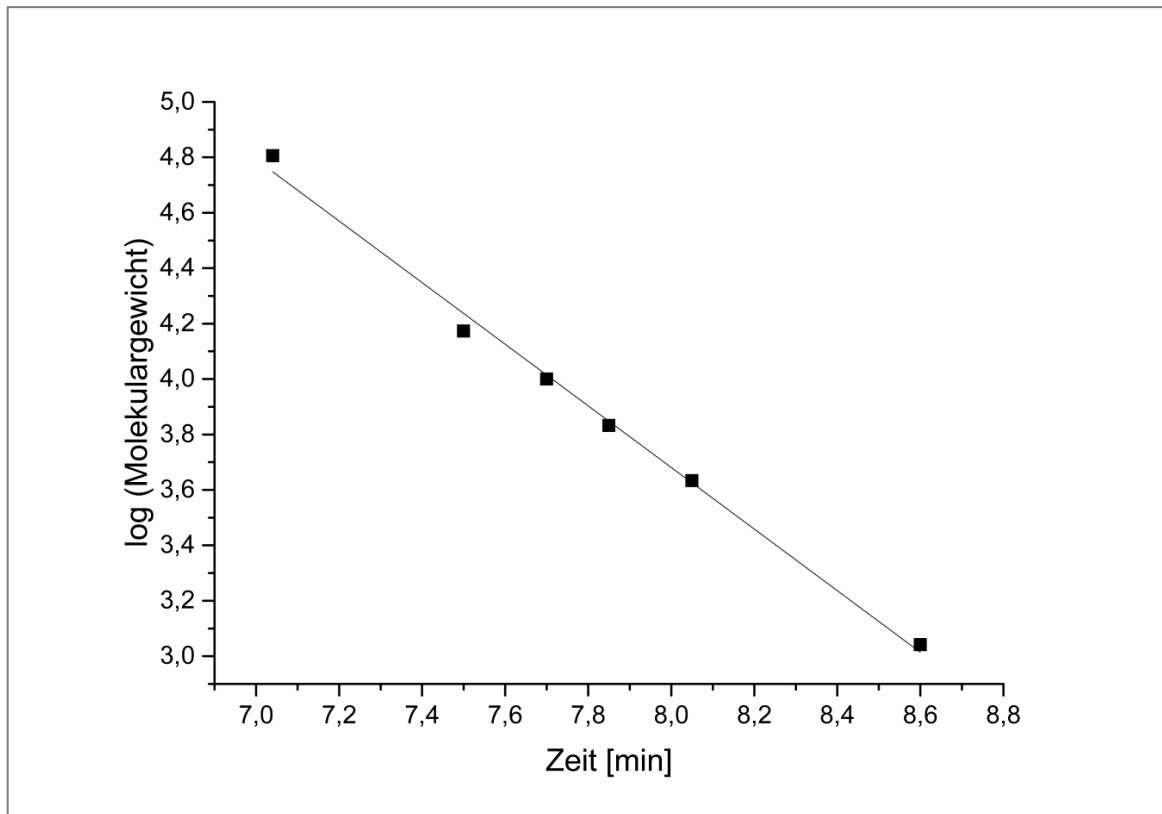


Abbildung 5.1: Kalibriergerade Größenausschlussssäule MCX
($y = -1,1161x + 12,573$, $R^2 = 0,9937$).

5.3.3.2 Bestimmung der phenolischen Hydroxy-Gruppen von Lignosulfonaten mittels UV-Differenzspektroskopie

Die Bestimmung der Anzahl an phenolischen Hydroxy-Gruppen der Lignosulfonate erfolgte mit einer modifizierten Methode nach (Wexler 1964). 10 mL der Bretax Cl-haltigen Kulturüberstände wurden im Ölbad bei 125 °C bis zur Trockne eingedampft, bei -21 °C tiefgefroren und 72 h lyophilisiert. 10 mg des lyophilisierten Feststoffgemisches wurden in 2,5 ml 150 mM NaOAc-Puffer (pH = 3,5) gelöst. Für die Referenz-Messung wurde aus dieser Lösung ein Aliquot von 50 µL entnommen und mit dem Acetat-Puffer zehnfach verdünnt (pH = 3,5). Für die Probelösung wurde dasselbe Aliquot entnommen, 100 µL 1 M NaOH-Lösung zugegeben und mit Reinstwasser ad 1,0 mL aufgefüllt (pH ≥ 11). Gemessen wurden Extinktionen im Bereich von 230 – 340 nm (Schrittweite 1 nm, Geschwindigkeit 1 nm s⁻¹). Abgebildet sind jeweils die Differenzspektren der Proben, wobei jeweils die saure Lösung als Referenz diente.

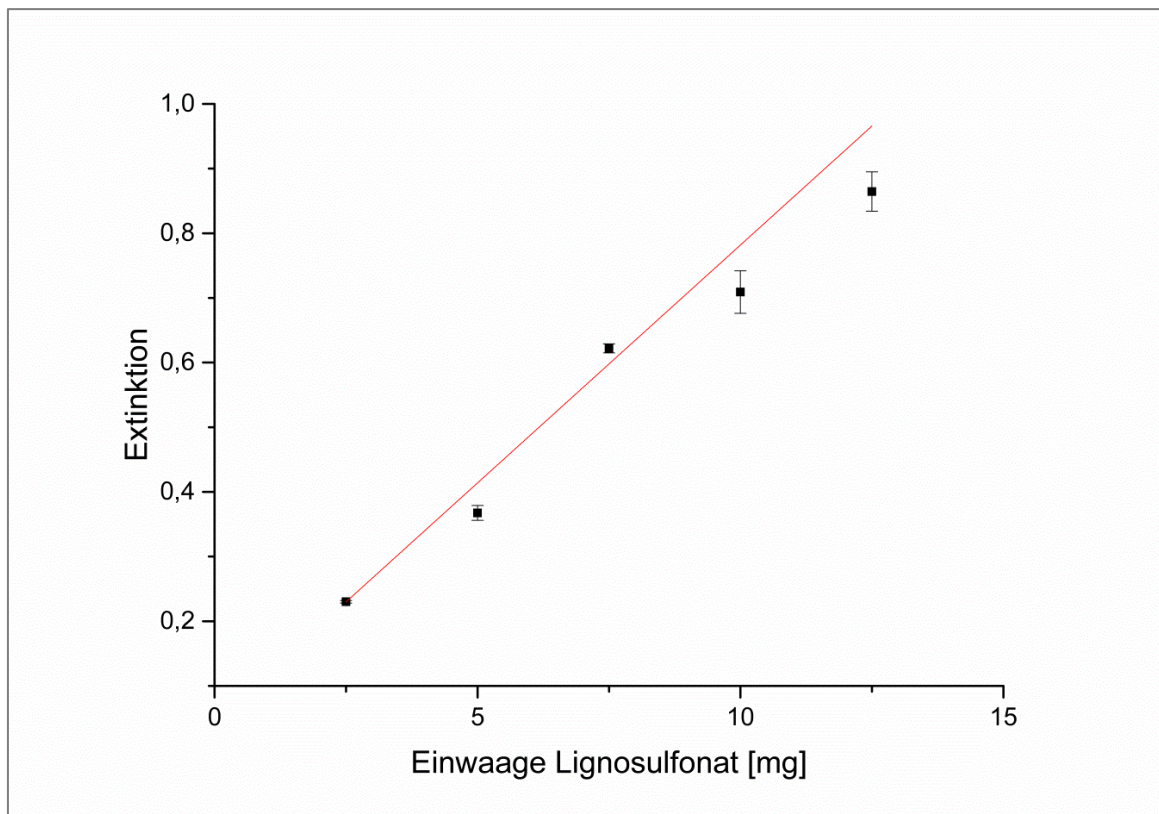


Abbildung 5.2: Kalibriergerade der UV-Differenzspektroskopie ($y = 0,07359x - 0,04589$, $R^2 = 0,9973$).

5.3.3.3 ABTS-Assay zur Bestimmung der Enzymaktivität

Für die Bestimmung der Laccase- und Peroxidase-Aktivitäten wurde ein modifizierter ABTS-Assay eingesetzt (Wolfenden und Willson 1982). Die Kulturüberstände und sonstige Proben wurden vor der Messung so verdünnt, dass das ermittelte ΔE_{nm} im Bereich zwischen 0,01 und 0,09 min^{-1} lag. Die Wasserstoffperoxid-Lösungen wurden täglich frisch angesetzt. Die ABTS-Lösung wurde nach dem Gebrauch bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert. Die Zusammensetzung des Assays ist in Tabelle 5.23 angegeben, wobei A – F jeweils verschiedene Ansätze darstellen.

Tabelle 5.23: Pipetierschema ABTS-Assay; H₂O₂ = Wasserstoffperoxid, MnSO₄ = Mangan(II)-sulfat, NaOAc = Natriumacetat.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Probe	20 µL	
150 mM Natriumacetatpuffer	80 µL	60 mM NaOAc
A: H ₂ O (Laccase)	50 µL	
B: 2 mM MnSO ₄ (Laccase/Peroxidase)	50 µL	0,5 mM Mn SO ₄
C: 2 mM MnSO ₄ + 0,14 mM H ₂ O ₂ (Peroxidase)	50 µL	0,5 mM MnSO ₄ , 0,035 mM H ₂ O ₂
D: 2 mM MnSO ₄ + 0,7 mM H ₂ O ₂ (Peroxidase)	50 µL	0,5 mM MnSO ₄ , 0,175 mM H ₂ O ₂
E: 2 mM MnSO ₄ + 1,4 mM H ₂ O ₂ (Peroxidase)	50 µL	0,5 mM MnSO ₄ , 0,35 mM H ₂ O ₂
F: Katalase (2,25 kU mL ⁻¹)(Laccase)	50 µL	112,5 U
2 mM ABTS-Lösung	50 µL	0,5 mM ABTS
Endvolumen	200 µL	

Die Umsetzung wurde durch Zugabe der 2 mM ABTS-Lösung gestartet. Der Ansatz wurde bei 30 °C inkubiert und die Extinktionszunahme für 10 min bei $\lambda = 420$ nm und dieser Temperatur gemessen. 1 Unit (U) ist definiert als die Menge an Substrat (μmol) die pro Minute umgesetzt wird.

Mit der folgenden Formel wurde die Enzymaktivität berechnet:

$$[U \cdot L^{-1}] = \frac{\Delta E_{420} \cdot V_{\text{gesamt}} \cdot F}{V_{\text{Probe}} \cdot \varepsilon_{\text{ABTS}, 420 \text{ nm}} \cdot d}$$

ΔE_{nm} = V_{max} (maximale Umsetzungsgeschwindigkeit; min^{-1})

V_{gesamt} = Gesamtvolumen des Reaktionsgefäßes (200 µL)

F = Verdünnungsfaktor

V_{Probe} = Volumen der Probe (20,0 µL)

d = Schichtdicke der Küvette (0,64 cm)

$\varepsilon_{\text{ABTS}, 420 \text{ nm}}$ = Extinktionskoeffizient (ABTS; $0,0432 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Die Peroxidase-Aktivität wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\Delta E_{420 \text{ nm (Peroxidase-berechnet)}} = \Delta E_{420 \text{ nm (Peroxidase)}} - \Delta E_{420 \text{ nm (Katalase)}}$$

5.4 Isolierung und Klonierung einer versatilen Peroxidase aus *I. consors*

5.4.1 Kulturernte und Konzentrierung

Die Kulturüberstände der Hauptkulturen 5.2.1.4 wurden vereinigt und das Pilzmyzel mittels Zentrifugation (3.724 g, 4 °C, 15 min) und anschließendem Filtrieren über einen Büchnertrichter vollständig entfernt. Der filtrierte Überstand wurde über eine kontinuierliche Filtrationseinheit VIVAFLW200 (Satorius Stedim Biotech; MWCO 10 kDa) konzentriert. Der filtrierte Kulturüberstand wurde in einer Schott-Flasche bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

5.4.2 Ultrafiltrationseinheiten

Zur Konzentrierung und Umpufferung im weiteren Verlauf der Isolierung wurden Macrosep[®]-3K-OMEGA Zentrifugationseinheiten (MWCO 3 kDa; Pall, Dreieich) verwendet. Kleinere Volumina wurden mittels Nanosep[®]-10K-OMEGA Zentrifugationseinheiten (MWCO 10 kDa; Pall) gehandhabt. Diese wurden vor der ersten Verwendung dreimal mit Reinstwasser gespült. Die FPLC-Proben wurden stets dreimal mit derselben Menge an Eluenten für 10 min bei 3.724 g und 4 °C zentrifugiert und zwischenzeitlich bei 4 °C gelagert.

5.4.3 *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)

Die konzentrierten Kulturüberstände wurden vor der Isolierung dreimal mit dem Start-Puffer der FPLC äquilibriert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4 °C und einer Detektionswellenlänge von $\lambda = 280$ nm durchgeführt. Die gesammelten Fraktionen wurden auf Laccase- und Peroxidase-Aktivität untersucht (5.3.3.3). Fraktionen mit Peroxidase-Aktivität wurden vereinigt und für den nächsten Isolierungsschritt auf die Startbedingungen umgepuffert und konzentriert (5.4.2). Die Isolierung der versatilen Peroxidase erfolgte mit folgendem FPLC-System (Tabelle 5.24).

Tabelle 5.24: Daten zum FPLC-System.

Spezifikation	Modell	Hersteller
FPLC-Einheit	BioLogic DuoFlow	Bio-Rad
Fraktionssammler	BioLogic BioFrac <i>fraction collector</i>	Bio-Rad
Datenaufnahme	BioLogic DuoFlow Version 5.10	Bio-Rad

5.4.3.1 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Das Konzentrat der Kulturüberstände 5.4.1 wurde im ersten Schritt durch Ionenaustauschchromatographie mit einem schwachen Ionentauscher gereinigt.

Tabelle 5.25: Daten zur Ionenaustauschchromatographie; NaCl = Natriumchlorid.

Spezifikation			
Trennsäule	XK 26/40 Column (GE Healthcare)		
Säulenmaterial	DEAE Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare)		
Säulenvolumen	125 mL		
Eluent	A: 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 6) B: 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer + 1,0 M NaCl (pH 6)		
Auftragsvolumen	50 mL		
Flussrate	4,0 mL min ⁻¹		
Modus	linearer Gradient		
	Zeit [min]	A[%]	B[%]
	0	100	0
	30	100	0
	90	0	100
	120	0	100
	120	100	0
	180	100	0
Detektion	280 nm		
Analysedauer	180 min		
Fraktionssammler	24 Fraktionen à 30 mL		

5.4.3.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Tabelle 5.26: Daten zur hydrophoben Interaktionschromatographie;
(NH₄)₂SO₄ = Ammoniumsulfat.

Spezifikation			
Trennsäule	<i>Prepacked Column for ÄTKA™ systems</i> (GE Healthcare)		
Säulenmaterial	Hi Trap Phenyl-FF (high sub.) (GE Healthcare)		
Säulenvolumen	1,0 mL		
Eluent	A: 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 3,5) B: 50 mM Natriumacetat -Puffer + 1,0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ (pH 3,5)		
Auftragsvolumen	1,0 mL		
Flussrate	2,0 mL min ⁻¹		
Modus	linearer Gradient		
	Zeit [min]	A[%]	B[%]
	0	0	100
	5	0	100
	25	100	0
	30	100	0
Detektion	280 nm		
Analysedauer	30 min		
Fraktionssammler	30 Fraktionen à 1,0 mL		

5.4.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die isoelektrische Fokussierung wurden ausschließlich kommerziell erhältliche Materialien verwendet und stets nach Anleitung des Herstellers durchgeführt (Tabelle 5.27).

Tabelle 5.27: Isoelektrische Fokussierung.

Spezifikation	Modell	Hersteller
Gelelektrophoresekammer	Multiphor II	GE Healthcare
Elektrophorese-Puffer	SERVAGel™ IEF Running Buffer Kit	SERVA (Heidelberg)
Fertigel	SERVAGel™ IEF 3-10	SERVA
IEF Marker	IEF Markers pH 3-10 SERVA Liquid Mix	SERVA
Probenauftrags-Puffer	IEF Sample buffer (2x)	SERVA
Spannungsquelle	EV262	Peqlab (Erlangen)

Die Proben wurden mit dem Probenauftragspuffer (1:1) verdünnt und jeweils 30 µL davon in die Geltaschen geladen. Zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts wurden 5 µL des IEF-Markers in die Geltaschen aufgetragen. Anschließend wurde das IEF-Gel für 60 min bei 50 V, dann 60 min bei 200 V und schließlich 30 min bei 500 V bei 4 °C entwickelt. Nach der Elektrophorese wurde das IEF-Gel in zwei Teile geschnitten und eine ABTS- bzw. eine kolloidale Coomassie-Färbung durchgeführt.

5.4.4.1 Kolloidale Coomassie-Färbung

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde eine kolloidale Coomassie-Färbelösung verwendet (0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/v), 10% Ammoniumsulfat (w/v), 10% Phosphorsäure (v/v), 20% Methanol (v/v) in Reinstwasser). Das IEF-Gel wurde in die Färbelösung gegeben und über Nacht auf dem Orbitalschüttler bei 36 U min⁻¹ geschüttelt. Um den Hintergrund zu entfärben, wurde das Gel anschließend mit Reinstwasser gespült und im letzten Schritt eingescannt.

5.4.4.2 ABTS-Aktivitätsfärbung

Zur Identifizierung und Unterscheidung der Peroxidasen wurde eine ABTS-Aktivitätsfärbung durchgeführt. Für die Laccase-Färbung wurde das IEF-Gel in 50 mL 1,25 mM ABTS in 150 mM Natriumacetatpuffer (pH 3,5) gegeben und 10 min inkubiert. Für die Peroxidase-Färbung wurden anschließend 36 μL einer 3%-igen H_2O_2 Lösung zugegeben, und ca. 15 min auf dem Orbitalschüttler bei 36 U min^{-1} inkubiert. Im letzten Schritt wurde das IEF-Gel mit Reinstwasser gewaschen und die nun sichtbaren Banden eingescannt und dokumentiert.

5.4.5 Enzym-Sequenzierung

Die in 5.4.4 erhaltenen Peroxidase-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem IEF-Gel geschnitten. Die Sequenzierung erfolgte am IAAC durch Dr. Gorshkov mittels LC-ESI-MS/MS-Analytik. Ein leicht modifiziertes Protokoll nach (Shevchenko *et al.* 2007) diente als Vorlage für den tryptischen Verdau der Enzyme. Die Peptid-Mischung wurde mittels nanoHPLC (Ultimate, Dionex/LCPackings, Idstein) gekoppelt an ein Q *Exactive Orbitrap* Massenspektrometer (Thermo Scientific) analysiert. Für die Auftrennung der Peptide wurden eine Vorsäule (Dionex, C18 PepMap, 5 mm, i.d. $300 \mu\text{m}$) in Verbindung mit einer analytischen Säule (Dionex, Acclaim PepMap 100, 15 cm, i.d. $75 \mu\text{m}$, C18, $3 \mu\text{m}$, 100 \AA) verwendet. Die Analysedauer betrug 42 min, bei einem linearen Gradienten von 5 – 45% Eluent B (Eluent A: 2% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure, Eluent B: 80% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure). Zur MS-Datenerfassung wurde die *Top-five* Methode eingesetzt, der Massenbereich betrug m/z 400 – 2.000 bei einer Auflösung von 140.000 (bei m/z 200). Für den Scan der Fragmentationen wurde eine Auflösung von 35.000 und die *higher-energy dissociation* Fragmentierungsmethode eingestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Proteome Discoverer™ 1.4 (Thermo Scientific), die Datenbank-Suche mit SEQUEST.

5.4.6 Isolierung genomischer DNA

Die Anzucht des Pilzmyzels erfolgte wie unter 5.2.2.3 beschrieben. Nach der Kultivierung wurde das Pilzmyzel zunächst bei -21 °C tiefgefroren. 4 Microspatel des tiefgefrorenen Pilzmyzels wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und 1,5 mL Reaktionsgefäße vollständig gefüllt. Im nächsten Schritt wurden 500 μL Lysepuffer hinzugegeben, gevortext und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert Tabelle 5.28.

Tabelle 5.28: Lysispuffer für die Isolierung genomischer DNA.

Komponente	Endkonzentration	Zugabe-Volumen
1 M Tris HCl, pH 8,0	400 mM	4,0 mL
200 mM EDTA, pH 8,0	60 mM	3,0 mL
1 M NaCl	50 mM	1,5 mL
10% SDS (w/v)	1% (w/v)	1,0 mL
Reinstwasser (steril)		ad 10,0 ml

Danach wurden 150 μL einer 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) hinzugegeben, kurz gevortext und für 10 min bei 14.000 *rpm* bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, 650 μL Isopropanol hinzugegeben und durchmischt. Nach erneutem 10-minütigen Zentrifugieren bei 14.000 *rpm* wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet in 500 μL 70%-igem Ethanol gewaschen. Die ethanolische Lösung wurde für 1 min bei 14.000 *rpm* zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das feuchte Pellet wurde im Anschluss für ca. 30 min luftgetrocknet und in 50 μL (20 μL bei kleinen Pellets) sterilem Reinstwasser resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde im Anschluss mittels NanoPhotometer™ bestimmt. Die genomische DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -21 °C tiefgefroren.

5.4.7 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde frisch geerntetes Pilzmyzel aus Lignosulfonat-haltigen Hauptkulturen (5.2.2.5) verwendet. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) unter Gebrauch des RLT-Puffers nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wurden ausschließlich autoklavierte Materialien sowie autoklaviertes Reinstwasser verwendet. Die Konzentration der RNA-Proben wurde wie unter 5.4.6 bestimmt. Zur Kontrolle der RNA-Isolierung wurden PCR-Reaktionen mit ITS-Primern durchgeführt (5.4.10). Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.4.8 cDNA-Synthese

Für die Erststrangsynthese wurde die M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA) nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Um etwaige RNA-Reste zu eliminieren, wurde ein RNA-Verdau unter Verwendung der RNase H aus *E. coli* (AMPRESKO, Solon, USA) durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.4.9 Verwendete Primer

Ausgehend von den Ergebnissen der Sequenzierung (5.4.5) wurden durch Sequenz-Alignments der abgeleiteten cDNA-Sequenz der versatilen Peroxidase (VP) aus *I. consors* mit Sequenzen einer Mangan-Peroxidase aus *Cerreana Unicolor* (Prot.ID 357111) Primer zur Amplifizierung abgeleitet. Zur vollständigen Amplifizierung der cDNA-Sequenz der VP aus *I. consors* wurden auf Grundlage erhaltener Sequenzierungs-Daten weitere Primer abgeleitet. Zudem sind die für die Isolierung der gDNA verwendeten Primer aufgelistet Tab. 5.29.

Tab. 5.29: Übersicht der designten Primer zur Amplifizierung der VP aus *I. consors*.

Name	Sequenz	Verwendungszweck
CUN357111_for1	5'- GCTTTGACTAGGCGTGTGC- 3'	Forward Primer zur Amplifizierung des <i>I. consors</i> vp-cDNA. Start in Exon 2
CUN357111_rev1	5'- TGAATGGCAATCCTTCGTC-3'	Reverse Primer zur Amplifizierung des <i>I. consors</i> vp-cDNA. Start in Exon 8
ICO_MnP1+2_for1	5'- AGCATTCAATTCGCCGGTGC- 3'	Forward Primer zur Amplifizierung des <i>I. consors</i> vp-cDNA
ICO_MnP1_for1	5'- ACCCAGTTAAAGGGAACGCT- 3'	Forward Primer zur Amplifizierung des 3'-Endes des <i>I. consors</i> vp-cDNA
Poly dT Primer	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTT-3'	Reverse Primer zur Amplifizierung des 3'-Endes mit dem Poly-A-Schwanz des <i>I. consors</i> vp-cDNA
ICO_MnP_SP_for1	5'- CTCGCTGCTTTCCTCACTC-3'	Forward Primer zur Amplifizierung des Signal-Peptides des <i>I. consors</i> vp-cDNA
ICO_MnP_SP_rev3	5'- TCAAACCTTTGTGTGATTAGAG AAGC-3'	Reverse Primer zur Amplifizierung des Signal-Peptides des <i>I. consors</i> vp-cDNA
ICO_MnP_SP_rev4	5'- TCTGGAGACGCTGTACCATAT C-3'	Reverse Primer zur Amplifizierung des Signal-Peptides des <i>I. consors</i> vp-cDNA
ICO_MnP_complete_for1	5'- GTAGCAAACGCCGCTTTGAC- 3'	Forward Primer zur Amplifizierung des gesamten codierenden vp-cDNA von <i>I. consors</i>
ICO_MnP_complete_rev1	5'- TTACGAAGGGGGGACAGGAG -3'	Reverse Primer zur Amplifizierung des gesamten codierenden vp-cDNA von <i>I. consors</i>
ITS4	5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3'	Amplifizierung der isolierten gDNA von <i>I. consors</i>
ITS5	5'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAA G-3'	Amplifizierung der isolierten gDNA von <i>I. consors</i>

5.4.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in 5.4.9 gezeigten Primer-Paare wurden zur Amplifizierung gewünschter gDNA- und cDNA-Abschnitte eingesetzt. Die Zusammensetzung des Master-Mixes und die Temperaturprogramme richteten sich nach den Angaben des Phusion[®]-Polymerase-Herstellers (New England BioLabs, Ipswich, USA,

Tabelle 5.30 und Tabelle 5.31). Alle angegebenen Puffer und Lösungen wurden mit der Phusion[®]-Polymerase geliefert.

Tabelle 5.30: Zusammensetzung des Master-Mixes pro 20 μ L PCR-Ansatz mit Phusion[®]-Polymerase. GC = Guanin, Cytosin.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
5x GC Reaktionspuffer	4,0 μ L	1x
10 mM dNTPs	0,4 μ L	200,0 μ M
10 μ M Forward Primer	1,0 μ L	0,5 μ M
10 μ M Reverse Primer	1,0 μ L	0,5 μ M
Phusion [®] High-Fidelity DNA-Polymerase	0,2 μ L	1,0 U pro 50,0 μ L PCR
Template DNA	variabel	50 – 250 ng pro 20,0 μ L PCR
Nuklease-freies Reinstwasser	ad 20 μ L	

Tabelle 5.31: Temperaturprogramm einer PCR-Reaktion mit Phusion[®]-Polymerase.

#	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierungsphase	98 °C	5,0 min
2	Denaturierung	98 °C	10 s
3	Primer Annealing	variabel	30 s
4	Elongation	72 °C	10-30 s pro kb
Gehe zurück zu # 2 für 34 Zyklen			
5	Finale Elongation	72 °C	10 min
6	Lagerung	4,0 °C	∞

PCR-Reaktionen mit der HotStarTaq[®]-Polymerase (Qiagen) wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Tabelle 5.32 und Tabelle 5.33). Alle Reagenzien Puffer und Lösungen entstammen dem HotStarTaq[®] Master Mix Kit (Qiagen).

Tabelle 5.32: Zusammensetzung des Master Mixes pro 20 μL PCR-Ansatz mit HotStarTaq[®]-Polymerase.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Reaktionspuffer (Qiagen)	2,0 μL	1x
10 mM dNTPs	0,4 μL	200,0 μM
5x Q-Solution	4,0 μL	1x
10 μM Forward Primer	1,0 μL	0,5 μM
10 μM Reverse Primer	1,0 μL	0,5 μM
HotStarTaq-Polymerase	0,4 μL	2,5 U pro 50,0 μL PCR
Template DNA	variabel	50 – 250 ng pro 20,0 μL PCR
Nuklease-freies Reinstwasser	ad 20,0 μL	

Tabelle 5.33: Temperaturprogramm einer PCR-Reaktion mit HotStarTaq[®]-Polymerase.

#	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Initiale Denaturierungsphase	95 °C	5,0 min
2	Denaturierung	95 °C	10 s
3	Primer Annealing	variabel	30 s
4	Elongation	72 °C	1,0 min pro kb
Gehe zurück zu # 2 für 34 Zyklen			
5	Finale Elongation	72 °C	10 min
6	Lagerung	4 °C	∞

5.4.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte (5.4.10) wurden nach Beendigung der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde folgender TAE-Puffer verwendet:

Tabelle 5.34: 50x TAE-Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese.

Komponente	Konzentration
0,5 M EDTA, pH 8	100,0 mL L ⁻¹
Essigsäure	57,1 mL L ⁻¹
Tris-Base	242,0 g L ⁻¹

Der 50x TAE-Puffer wurde vor der Verwendung 1:50 mit Reinstwasser verdünnt (1x TAE-Puffer). Im nächsten Schritt wurden 1,5 – 2,0% Agarose in 1x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle zum Sieden erhitzt, bis die Agarose komplett gelöst war. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurden 0,9 µL einer 1%-igen Ethidiumbromid-Lösung pro 10 mL Agarose-Lösung hinzugegeben. Nach vorsichtigem Schütteln des Kolbens wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegossen und bei Raumtemperatur ca. 30 min ausgehärtet. Im Anschluss wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer bis zur Überschichtung des Gels befüllt. Für das Auftragen von Proben in die Taschen des Agarose-Gels wurden die PCR-Proben 1 zu 10 mit dem 10x Ladepuffer vermengt (Tabelle 5.35).

Tabelle 5.35: 5x Ladepuffer für die Agarose-Gelelektrophorese.

Komponente	Konzentration
Bromphenolblau	0,01 g L ⁻¹
EDTA	11,70 g L ⁻¹
Glycerin	30,00 g L ⁻¹
Orange G	0,01 g L ⁻¹
Xylencyanol	0,01 g L ⁻¹

Die für die Gelelektrophorese angelegte Spannung betrug je nach Gelgröße 80-150 V, wobei die Dauer eines Elektrophorese-Laufes variabel war. Die Größen der

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines Größenstandards (100 bp DNA *extended* DNA-Leiter für PCR-Amplifikate, 1 kbp DNA-Leiter für Restriktionsverdau, Roth) abgeschätzt. Die Geldokumentation erfolgte mit der Anlage DeVISION DBOX (Decon Science Tec., Hohengandern), ausgestattet mit einem UV-Transilluminator (312 nm), einer Kamera und der Software DeVISION G Vers. 2.0.

5.4.12 DNA-Fragmentisolierung

Für die Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit dem NucleoSpin[®] Gel und PCR *Clean-up* Kit (Macherey-Nagel) unter Verwendung des Protokolls des Herstellers isoliert. Dafür wurden die PCR-Produkte aus dem Agarose-Gel (5.4.11) mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles 2 mL Reaktionsgefäß überführt.

5.4.13 Klonierung der cDNA in *E. coli* TOP10

5.4.13.1 Ligation

DNA-Amplifikate mit gewünschter Größe wurden wie 5.4.12 beschrieben isoliert. Bei vorherigem Einsatz der HotStarTaq[®]-Polymerase zur Amplifizierung der cDNA wurde für die Ligation das TOPO[®] TA *Cloning*[®] Kit (Invitrogen, Handbuch vom 24. Februar 2014) verwendet. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 5.36).

Tabelle 5.36: Ligationsansatz TOPO[®] TA Klonierung.

Komponente	Volumen
Template DNA (~30 ng L ⁻¹)	4,0 µL
Salz-Lösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1,0 µL
pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor	1,0 µL

Für DNA-Fragmente, die durch Phusion[®]-Polymerase amplifiziert wurden, musste eine *blunt-end* Ligation mit dem CloneJET PCR *Cloning*[®] Kit (Thermo Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt werden (Tabelle 5.37). Nach dem

Zusammengenommen der Komponenten wurde der Ansatz eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 5.37: Ansatz *blunt-end* Ligation.

Komponente	Volumen
Template DNA (~25 ng L ⁻¹)	2,0 µL
2x Reaktionspuffer	10,0 µL
pJET 1.2/ <i>blunt Cloning</i> Vektor	1,0 µL
Reinstwasser	ad 19,0 µL
T4 DNA Ligase	1,0 µL

5.4.13.2 Transformation in *E. coli* TOP10

Ein Aliquot *One Shot*[®] TOP10 *Chemically Competent E. coli* Zellen (Invitrogen) wurde auf Eis vorgelegt. Für die Transformation wurden 5 µL des entsprechenden Ligationsansatzes (Tabelle 5.36 und Tabelle 5.37) zugegeben und vorsichtig durchmischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und danach für 30 s auf 42 °C erhitzt. Der Ansatz wurde kurz auf Eis abgekühlt, mit 250 µL SOC Medium (Tabelle 5.5) versetzt und 1 h bei 37 °C und 200 U min⁻¹ inkubiert.

5.4.13.3 Selektion positiver Transformanten

50 µL bzw. 200 µL des jeweiligen Transformationsansatzes (5.4.13.2) wurden auf LB_{AMPX}-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Positive Transformanten der TOPO[®] TA Klonierung blieben weiß, weil das zuklonierte Insert in der *multiple cloning site* das *lacZα*-Gen im Vektor unterbrochen hatte und somit die β-Galaktosidase-Expression verhindert, die zur Blaufärbung führte. Der Selektionsmechanismus bei der *blunt-end* Klonierung beruht auf dem Unterbrechen des letalen *eco47IR*-Gens in der *multiple cloning site*. Dementsprechend wuchsen nur Klone auf den LB_{AMPX}-Agarplatten, die das neue Insert der *blunt-end* Klonierung beinhalteten.

5.4.13.4 Kolonie-PCR

Die positiven Klone auf den LB_{AMPX}-Agarplatten wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in PCR-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden 10 µL steriles Reinstwasser zugegeben und die Suspension für 10 min in der Siedehitze gekocht. Aus jedem Ansatz wurden 4 µL Suspension entnommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 16 µL Mastermix (New England BioLabs, Tabelle 5.30) gegeben. Alle angegebenen Puffer und Lösungen wurden mit der Phusion[®]-Polymerase geliefert. Die anschließende PCR (5.4.10) unter Verwendung einer Phusion[®]-Polymerase erfolgte nach dem spezifischen Temperaturprogramm (Tabelle 5.31). Die Reaktionsansätze wurden schließlich mittels Agarose-Gelelektrophorese (5.4.11) auf das Vorhandensein gesuchter DNA-Fragmente überprüft.

5.4.13.5 Plasmidisolierung

Positive Klone (5.4.13.3) wurden in LB_{AMPX}-Flüssigmedien überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung der Plasmide aus den *E. coli* Zellen erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Anleitung des Herstellers.

5.4.13.6 Restriktionsverdau

Zum Ausschluss falsch-positiver Klone wurden die isolierten Plasmide (5.4.13.5) mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut. Der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor besitzt Schnittstellen für das Restriktionsenzym *EcoR* I (Fast Digest, Thermo Scientific). Isolierte Plasmide aus TOPO TA Klonierungen wurde 3 h bei 37 °C verdaut (Tabelle 5.38).

Tabelle 5.38: Restriktionsverdau *EcoR* I Fast Digest.

Komponente	Volumen
Plasmid (bis 1,0 µg)	1,0 – 5,0 µL
10x <i>EcoR</i> I Puffer	2,0 µL
<i>EcoR</i> I Fast Digest	1,0 µL
Reinstwasser	ad 20,0 µL

Isolierte Plasmide aus der *blunt-end* Klonierung wurden unter Verwendung des Restriktionsenzym *BGI* II Fast Digest (Thermo Scientific) für 4 h bei 37 °C verdaut (Tabelle 5.39).

Tabelle 5.39: Restriktionsverdau *BGI* II Fast Digest.

Komponente	Volumen
Plasmid (bis 1,0 µg)	1,0 µL
10x Reaktionspuffer	2,0 µL
<i>BGI</i> II Fast Digest	1,0 µL
Reinstwasser	ad 20,0 µL

Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese (5.4.11) überprüft.

5.4.14 Sequenzierungen

Ein Teil der isolierten DNA-Fragmente (5.4.12) und Plasmide (5.4.13.5) wurden zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg) unter permanenter Kühlung versandt und dort mittels Kettenabbruch-Methode sequenziert. Die restlichen DNA-Fragmente (5.4.12) wurden an einem ABI 310 Prism[®] (Life Technologies, Darmstadt) automatisiertem Sequenzierer identifiziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software Genescan[®] (Life Technologies) bearbeitet, analysiert und ein Datenbankabgleich (5.4.15) mittels BLAST-Algorithmus durchgeführt (Altschul *et al.* 1997).

5.4.15 Bioinformatik

Tabelle 5.40: Bei den molekularbiologischen Arbeiten verwendeten bioinformatischen Werkzeuge; EBI = *European Bioinformatics Institute*, NCBI = *National Center for Biotechnology Information*.

Anwendungsfeld	Dienst/Programm	Adresse
Primerdesign	PCR Primer Design Tool (Eurofins MWG Operon)	http://www.eurofinsgenomics.eu
	EMBL-Datenbank (EBI)	http://www.ebi.ac.uk/
Datenbanken für Sequenzsuche und -vergleich	Gen-Bank (NCBI)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
	PeroxiBase	https://peroxibase.toulouse.inra.fr/index.php
	UniProt	http://www.uniprot.org/blast/
Translation	ExpASy Bioinformatics Resource Portal	http://web.expasy.org/translate/
Reverse Translation	Bioinformatics Organization	http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html
Multiple Alignements	ClustalW2	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/
Phylogenetik	MEGA 4	http://megasoftware.net/mega4/mega.html

5.5 Biotransformation eines Herbizids und Herbizid-Derivates durch Basidiomyceten

5.5.1 Biotransformation des Herbizids DMTA-P

5.5.1.1 Emers-Screening von Basidiomyceten zur Biotransformation von DMTA-P

Für das Agarplatten-Screening (5.2.2.3) wurden verschiedene Substratkonzentrationen (5.2.1.3) und ein breites Spektrum an Basidiomyceten eingesetzt (Tabelle 5.41).

Tabelle 5.41: Liste der eingesetzten Basidiomyceten im Emers-Screening.

Pilz	Abk.	Herkunft	Stamm-Nr.
<i>Agrocybe aegerita</i>	AAE	Sylvan	4022
<i>Armillaria gallica</i>	AGAL	LCB	229*
<i>Ceriporiopsis resinascens</i>	CRE	CBS	525.82
<i>Coprinus sterquilinius</i>	COST	DSMZ	3341
<i>Clitocybe vibecina</i>	CUI	LCB	228*
<i>Clitopilus hobsonii</i>	CHO	LCB	205*
<i>Cyathus africanus</i>	CAF	DSMZ	1593
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	DCO	LCB	230*
<i>Ganoderma applanatum</i>	GAP-F	LCB	176*
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	GAB	DSMZ	1210
<i>Hericium erinaceus</i>	HER	CBS	70034
<i>Hypholoma fasciculare</i>	HFA	DSMZ	2902
<i>Hypholoma sublateritium</i>	HSU	LCB	214*
<i>Irpex consors</i>	ICO	DSMZ	7382
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	LPY	LCB	222*
<i>Macrolepiota procera</i>	MPR	LCB	202*
<i>Marasmius rotula</i>	MRO	LCB	191*
<i>Mycena polygramma</i>	MPO	DSMZ	8734
<i>Mycena pseudocorticola</i>	MPS	LCB	220*
<i>Omphalotus olearius</i>	OMO	DSMZ	3398
<i>Phallus impudicus</i>	PIM	LCB	221*
<i>Phanerochaete tamariciphila</i>	PTA	CBS	339.95
<i>Phellinus igniarius</i>	PIG-F	LCB	210*
<i>Pholiota aurivella</i>	PAU	DSMZ	1018
<i>Pleurotus eryngii</i>	PER	DSMZ	8264
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	PPU	DSMZ	9558
<i>Pycnoporus coccineus</i>	PYCO	CBS	355.63
<i>Stereum sp.</i>	Ssp.	DSMZ	8254
<i>Trametes suaveolens</i>	TSU	DSMZ	5237

*Interne Stammnummer (LCB).

5.5.1.2 Biotransformation von DMTA-P in Submerskultur

Basidiomyceten, die Wachstum auf den Screening-Agarplatten (5.2.1.3) zeigten, wurden in einem Flüssig-Screening weiter untersucht (5.2.2.4). Für die Untersuchung und Optimierung der Biotransformationen durch *I. consors* wurde eine Reihe von Parametern variiert (Tabelle 5.42).

Tabelle 5.42: Zusammensetzung der Kulturmedien.

Komponente	Konzentration			
	Medium A	Medium B	Medium C	Medium D
Ammoniumnitrat	1,00 g L ⁻¹	1,00 g L ⁻¹	1,00 g L ⁻¹	1,00 g L ⁻¹
DMTA-P*	0,10 g L⁻¹	0,25 g L⁻¹	0,50 g L⁻¹	0,50 g L ⁻¹
D-(+)-Glucose-Monohydrat	3,00 g L ⁻¹	3,00 g L ⁻¹	3,00 g L ⁻¹	10,00 g L⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,50 g L ⁻¹	1,50 g L ⁻¹	1,50 g L ⁻¹	1,50 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,50 g L ⁻¹	0,50 g L ⁻¹	0,50 g L ⁻¹	0,50 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (Tabelle 5.8)	1,00 mL L ⁻¹	1,00 mL L ⁻¹	1,00 mL L ⁻¹	1,00 mL L ⁻¹

*sterile Zugabe nach dem Autoklavieren (819 µL \pm 1,00 g)

5.5.1.3 Biotransformation von ¹³C-markiertem DMTA-P

Die Umsetzung von ¹³C-markiertem DMTA-P durch den Basidiomyceten *I. consors* wurde in Flüssigkultur untersucht. Hierfür wurde eine Stammlösung aus markiertem und unmarkiertem DMTA-P (100,9 mg mL⁻¹ ¹³C-DMTA-P/ 102,4 mg DMTA-P) in Acetonitril angesetzt. 1,0 mL dieser Stammlösung wurden in 500 mL eines autoklavierten Hauptkulturmediums 5.2.1.4 gegeben. Die Kultivierungsbedingungen sind in 5.2.2.6 beschrieben.

5.5.1.4 Involvierte Enzyme der Umsetzung des DMTA-P

Zur Lokalisierung der Enzymaktivität wurde eine Kultivierung mit *I. consors* nach 5.2.2 in einem Hauptkulturmedium (5.2.1.4) angesetzt. Nach 12 h Kultivierung wurde das Pilzmyzel mittels Zentrifugation (3.724 g, 4 °C, 10 min) vom Kulturüberstand abgetrennt. Gleichzeitig wurden 10 mL des Kulturüberstandes entnommen und 10 min bei Siedehitze gekocht. Alle Kulturüberstände wurden im Anschluss ohne Pilzmyzel weiter kultiviert (5.2.2). Zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h

und 144 h wurden jeweils 1 mL Probe entnommen und mittels HPLC-UV (5.5.3.1) untersucht. Die Ansätze wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

5.5.2 Weizenstroh induzierter Abbau von M27 in Submerskultur

5.5.2.1 Submers-Screening von Basidiomyceten zur Biotransformation von M27

Die Umsetzung des Herbizid-Derivates M27 durch Basidiomyceten wurde in einem Flüssigmedium mittels Stroh-Supplementierung (5.2.1.3) untersucht. Hierfür wurden eine Reihe von Basidiomyceten untersucht (Tabelle 5.43).

Tabelle 5.43: Liste der eingesetzten Basidiomyceten im Submers-Screening.

Pilz	Abk.	Herkunft	Stamm-Nr.
<i>Antroidea xantha</i>	AXA	LCB	200*
<i>Bjerkandera adusta</i>	BAD	DSMZ	4798
<i>Ceriporiopsis rivulosa</i>	CRI	DSMZ	434.48
<i>Coprinus sterquilinus</i>	COST	DSMZ	8330
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	GAB	DSMZ	1210
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	GOD	LCB	198*
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	GTR	LCB	227*
<i>Hericium erinaceus</i>	HER	CBS	70034
<i>Hypholoma fasciculare</i>	HFA	DSMZ	2902
<i>Irpex consors</i>	ICO	DSMZ	7382
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	IBE	CBS	311.29
<i>Omphalotus olearius</i>	OMO	DSMZ	3398
<i>Panellus stipticus</i>	PSTI	LCB	203*
<i>Phellinus igniarius</i>	PIG-F	LCB	210*
<i>Phellinus pini</i>	PHP	DSMZ	5238
<i>Pleurotus eryngii</i>	PER	DSMZ	8264
<i>Punctularia strigosozonata</i>	PST	CBS	702.94
<i>Stropharia aeruginosa</i>	STA	DSMZ	3374
<i>Trametes gibbosa</i>	TGI	LCB	175*
<i>Xylaria longipes</i>	XLO	LCB	218*

*Interne Stammnummer (LCB).

5.5.2.2 Alginat-Inklusion von Pilzmyzel zur Biotransformation von M27

20 mL einer autoklavierten Natrium-Alginat Lösung (5%, w/w), die 20 g L⁻¹ fein gemahlenes Weizenstroh (5 mm Partikeldurchmesser) enthielt, wurden nach Abkühlen auf RT zu 20 mL einer gemäß 5.2.2.6 behandelten Vorkultur gegeben (final 2,5% w/w, Alginat). Die zähflüssige Suspension wurde dann mittels Spritze langsam unter Rühren in 80 mL einer sterilen 0,9 M Calciumchlorid-Lösung getropft. Die entstandenen Alginatperlen wurden zum Aushärten 30 min bei RT gerührt, filtriert und anschließend in 100 mL autoklaviertem Reinstwasser erneut 20 min gerührt. Das Waschen wurde einmal wiederholt, fünf Spatelspitzen Kügelchen in das entsprechende Medium (5.2.1.4) überführt und bei 24 °C unter Lichtausschluss auf einem Inkubationsschüttler (150 U min⁻¹, Auslenkung 25 mm) kultiviert. Parallel dazu wurden eine biotische sowie eine abiotische Kontrolle in Doppelbestimmung angesetzt.

5.5.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) zur Kontrolle der Biotransformationen von DMTA-P und M27

Zur Kontrolle der Umsetzung der Substrate DMTA-P und M27 wurde eine RP-HPLC mit UV-Detektion durchgeführt. Die Geräte Parameter des HPLC-Systems sind in 5.3.3.1 aufgeführt. Alle Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung filtriert (Porengröße 0,2 µm) und 60 min entgast. Alle Analysen fanden bei Raumtemperatur statt.

5.5.3.1 Analyse der Biotransformation von DMTA-P

a) Probenvorbereitung Flüssig-Screening: Der entnommene Kulturüberstand wurde zentrifugiert (5 min, 4° C, 3.724 g). Im Anschluss wurde 1 mL Probe mit 4 mL Ethylacetat extrahiert und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert.

b) Probenvorbereitung sonstige Hauptkulturen: Die Kulturüberstände wurden mit einer Lösung aus Acetonitril und Reinstwasser (+0,1% Ameisensäure) (20/80) 1 zu 4 verdünnt und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert.

Tabelle 5.44: HPLC-UV-Parameter für die Analyse der Biotransformation von DMTA-P.

Spezifikation	
Trennsäule	CC 250/4 Nucleosil® 100-5-C18 (Macherey-Nagel)
Eluent	A: Acetonitril B: Reinstwasser (+0,1% Ameisensäure)
Injektionsvolumen	20 µL
Flussrate	1,0 mL min ⁻¹
Modus	linearer Gradient
	Zeit [min] A[%] B[%]
	0 20 80
	30 60 40
	40 20 80
	45 20 80
Detektion	254 nm
Analysedauer	45,0 min

Die externe Kalibrierung der DMTA-P Konzentration ist in Abbildung 5.3 gezeigt.

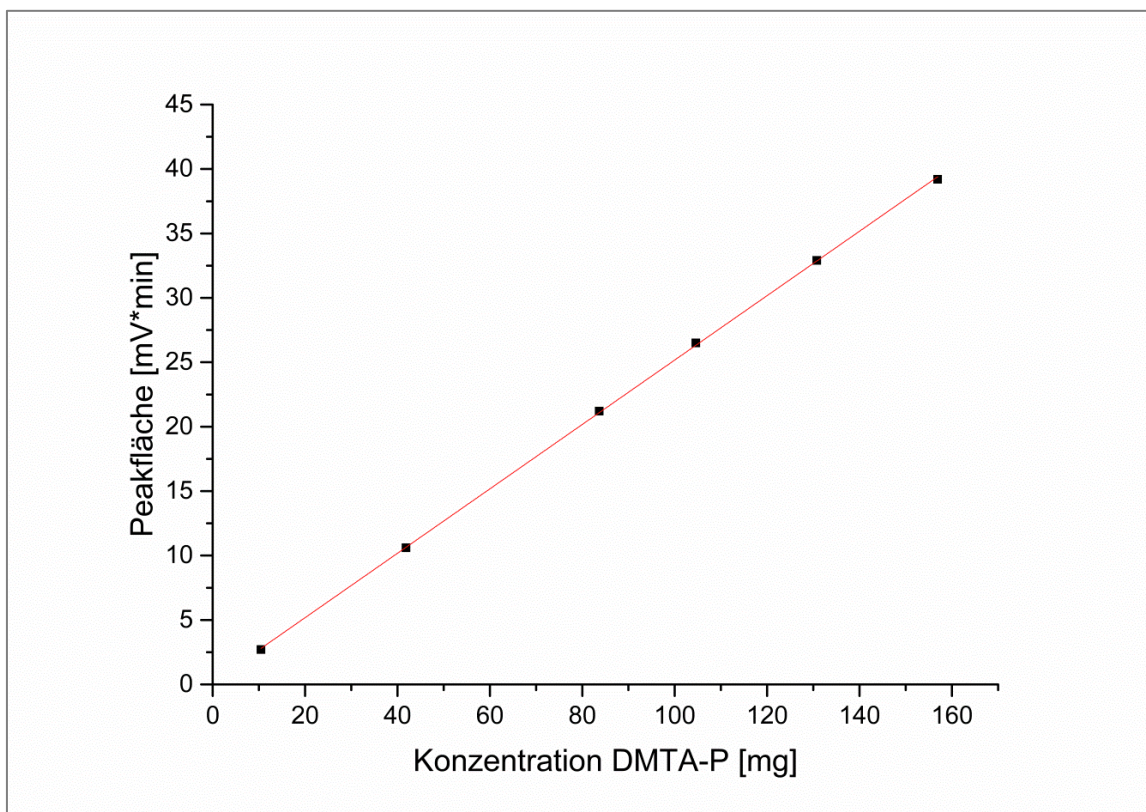


Abbildung 5.3: Kalibriergerade zur Ermittlung der Konzentration des DMTA-P ($y = 0,2499x + 0,1804$, $R^2 = 0,9999$).

5.5.3.2 Analyse der Umsetzung von M27

500 μL Kulturüberstand wurden mit 125 μL Acetonitril (ACN) vermischt, die Proben membranfiltriert (0,45 μm) und mittels HPLC-UV analysiert.

Tabelle 5.45: HPLC-UV-Parameter für die Analyse der Biotransformation von M27.

Spezifikation			
Trennsäule	CC 250/4 Nucleosil [®] 100-5-C18 (Macherey-Nagel)		
Eluent	A: Acetonitril		
	B: Reinstwasser (+0,1% Ameisensäure)		
Injektionsvolumen	20 μL		
Flussrate	1,0 mL min ⁻¹		
Temperatur	24 °C		
Modus	linearer Gradient		
	Zeit [min]	A[%]	B[%]
	0	5	95
	35	25	75
	40	5	95
	45	5	95
Detektion	254 nm		
Analysedauer	45,0 min		

5.5.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) mit Massenspektrometrie-Kopplung zur Metabolit-Analyse

Zur Bestimmung der Molekülmassen entstandener Metabolite wurden HPLC-MS-Analysen durchgeführt. Alle Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung filtriert (Porengröße 0,2 μm) und 60 min entgast. Alle Analysen erfolgten bei Raumtemperatur. Dafür wurden die Proben der Kulturüberstände wie in 5.5.3 beschrieben für die Messung vorbereitet (Tabelle 5.46 und Tabelle 5.47).

Tabelle 5.46: HPLC-MS-Anlage.

Gerät	Modell	Hersteller
HPLC-Einheit	Shimadzu LC-10AvP	Shimadzu (Kyōto, Japan)
Pumpe	Shimadzu LC-10AD VP	Shimadzu
Detektor	Shimadzu SPD-10A VP	Shimadzu
Autosampler	Shimadzu SIL-10AD VP	Shimadzu
MS-Einheit	3200 Q TRAP MS/MS	AB Sciex Instruments (Framingham, USA)

Tabelle 5.47: HPLC-MS-Parameter für die Analyse der Biotransformation von DMTA-P und M27.

Spezifikation	
HPLC-Analyse	s. Tabelle 5.44 bzw. Tabelle 5.45
Split	1:8
Ionisierung	Elektrosprayionisation (ESI)
Polarität	positiv (DMTA-P), negativ (M27)
Scan Typ	<i>Enhanced MS (EMS)</i>
Scan Rate	4.000 Da s ⁻¹
Kapillarspannung	±5.000 V
Verwendetes Gas	Stickstoff (Zerstäubungsgas, Curtain Gas, Kollisionsgas)
Declustering Potential	±35,0 V
Eintrittspotential	±10,0 V
Kollisionsenergie	±10,0 V
Temperatur	450 °C
Massenbereich	<i>m/z</i> 115,00 – 600,00

5.5.5 Isolierung der Metabolite aus Flüssigkulturen

5.5.5.1 Extraktion der Metabolite von DMTA-P aus dem Kulturüberstand

Die Kulturüberstände der Hauptkulturen 5.2.1.4 wurden vereinigt, das Pilzmyzel mittels Filtration über einen Büchnertrichter vollständig entfernt und mit 100 mL Reinstwasser gewaschen. Die Metabolite wurden mit demselben Volumen an Ethylacetat im Scheidetrichter aus den Kulturüberständen extrahiert. Das Lösungsmittel wurde dann unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene gelbliche, ölige Konzentrat wurde in Acetonitril/Wasser (+ 0,1% Ameisensäure) 35:65 (v/v) aufgenommen ($\sim 10 \text{ mg mL}^{-1}$) und durch einen $0,45 \mu\text{m}$ -Filter filtriert.

5.5.5.2 Aufarbeitung des Kulturüberstandes der Umsetzung von M27 durch *I. consors*

Die Alginatperlen wurden durch Filtration vom Kulturüberstand (5.5.2.2) getrennt. Der Kulturüberstand wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockne eingeeengt. Der erhaltene Rückstand wurde schließlich in einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser (+ 0,1% Ameisensäure) 20:80 (v/v) aufgenommen ($\sim 10 \text{ mg mL}^{-1}$) und durch einen $0,45 \mu\text{m}$ -Filter filtriert.

5.5.5.3 Auftrennung der Metabolite mittels präparativer RP-HPLC

Zur Isolierung der gebildeten Metabolite von DMTA-P aus dem Extrakt 5.5.5.1 und dem gebildeten Metabolit von M27 aus dem Rückstand 5.5.5.2 erfolgte mittels präparative HPLC. Die Parameter sind in Tabelle 5.48 aufgeführt. Alle Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung filtriert (Porengröße $0,2 \mu\text{m}$) und 60 min entgast. Die Isolierung fand bei Raumtemperatur statt und die gewünschten Fraktionen wurden manuell aufgefangen.

Tabelle 5.48: Parameter der präparativen HPLC-UV für die Isolierung der Metabolite von DMTA-P und M27.

Spezifikation						
HPLC-Einheit	YL 9110 S, Young Lin Instruments Co.(Hongye Anyang, Korea)					
Vorsäule	VarioPrep Vorsäulenhalter mit VP 10/16 Nucleosil® C18 Kartuschen (Macherey-Nagel)					
Trennsäule	CC 250/16 Nucleosil® 100-7-C18 (Macherey-Nagel)					
Injektionsvolumen	3,0 mL					
Flussrate	12,0 mL min ⁻¹					
Temperatur	24 °C					
Substrat	DMTA-P			M27		
Eluent	A: Acetonitril/Reinstwasser (+0,1% Ameisensäure) 35:65 (v/v)			A: Acetonitril		
	B: Acetonitril			B: Reinstwasser (+0,1% Ameisensäure)		
Modus	isokratisch			linearer Gradient		
	Zeit [min]	A[%]	B[%]	Zeit [min]	A[%]	B[%]
	0	100	0	0	15	85
	24	100	0	15	35	65
	ab 24	0	100	20	15	85
	27	0	100	25	15	85
	ab 27	100	0			
	35	100	0			
Detektion	254 nm			254 nm		
Analysedauer	35,0 min			25,0 min		

Die gesammelten Fraktionen der gesuchten Metabolite wurden mit gleichen Volumina Ethylacetat im Scheidetrichter extrahiert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die isolierten Metabolite wurden bis zur weiteren Analyse bei -21 °C gelagert.

5.5.6 Analytik der isolierten Metabolite von DMTA-P und M27

5.5.6.1 Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS)

Die isolierten Metabolite (5.5.5) wurden zur Identifizierung mittels GC-MS analysiert. Hierfür wurden die Isolate in Ethylacetat gelöst und für die Chromatographie entsprechend verdünnt. Die Messung erfolgte nach einem leicht modifiziertem Protokoll nach (Hladik *et al.* 2005b) (Tabelle 5.49).

Tabelle 5.49: Parameter der GC-MS-Analyse der Metabolite von DMTA-P.

Spezifikation	
Gaschromatograph	Agilent 7890A (Agilent, Santa Clara, USA)
Detektor	Agilent 5975C MSD Triple-Axis-Detektor (Agilent)
Trennsäule	DB-5MS, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent)
Injektor	split/splitless, 250 °C
Injektionsvolumen	1 µL (split 1:10)
Trägergas	Helium (1,2 mL min ⁻¹)
Temperaturprogramm	90 °C (1 min), 10,5 °C min ⁻¹ auf 290 °C (19 min)
Massenbereich	<i>m/z</i> 33 – 300
Temperaturen	Ionenquelle: 230 °C, Interface: 250 °C, Quadrupol: 150 °C
Ionisation	Elektronenstoßionisation (70 eV)
Datenaufnahme	ChemStation MSD E.02.00.493
Datenbank	NIST 2008 MS LIB

5.5.6.2 Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR)

Für die finale Strukturaufklärung der Metabolite wurden diese mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie untersucht. Die isolierten Metabolite des DMTA-P wurden dazu in deuteriertem Chloroform gelöst und die Spektren an einem Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer (Bruker Optics, Billerica, USA) aufgenommen. Die Messungen zu den Metaboliten von M27 erfolgten in einer Mischung aus deuteriertem Wasser und deuteriertem Methanol (9:1, v/v). Zur

vollständigen Strukturaufklärung wurden ^1H -, ^{13}C -, DEPT-135-, HMBC-, HMQC-, NOESY- und COSY-Experimente durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software TOPSPIN 1.3 (Bruker Biospin) bzw. der Software MestReNova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien).

5.5.6.3 Infrarotspektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion (ATR-IR)

Die Infrarotspektroskopie wurde an einem Bruker Alpha Spektrometer (Bruker Optics, max. Auflösung: 1 cm^{-1}) durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Hintergrundmessung (32 Scans), bevor die öligen Metabolite direkt auf den ATR-Diamanten aufgetragen wurden. Der Messbereich lag zwischen 5000 cm^{-1} bis 150 cm^{-1} , wobei 32 Scans aufgenommen wurden.

5.5.6.4 ESI-MS/MS-Analyse der isolierten Metabolite

Die ESI-MS/MS-Experimente der isolierten Metabolite wurde am selben MS/MS-System wie in 5.5.4 durchgeführt. Die Analyse der Metabolite erfolgte durch Spritzeninfusion Tabelle 5.50.

Tabelle 5.50: MS/MS-Parameter zur Analyse der isolierten Metaboliten des DMTAP.

Spezifikation	
Flussrate	$10\ \mu\text{L min}^{-1}$
Ionisierung	Elektrosprayionisation (ESI)
Polarität	positiv
Scan Typ	<i>Product ion mode</i>
Vorläuferion $[\text{M}+\text{H}]^+$	$m/z\ 292,2$
Scan Rate	$4.000\ \text{Da s}^{-1}$
Kapillarspannung	5.500 V
Verwendetes Gas	Stickstoff (Zerstäubungsgas, <i>Curtain Gas</i> , Kollisionsgas)
Declustering Potential	35,0 V
Eintrittspotential	10,0 V
Kollisionsenergie	20,0 V
Temperatur	450 °C

Literaturverzeichnis

Adenipekun CO (2012) Uses of mushrooms in bioremediation: A review. *Biotechnol Mol Biol Rev* 7:62–68.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402.

Anderson J (1983) Life in the soil is a ferment of little rotters. *New Scientist* 100:29–37.

Aga DS, Thurman EM (2001) Formation and transport of the sulfonic acid metabolites of alachlor and metolachlor in soil. *Environ Sci Technol* 35:2455–2460.

Aguiar A, Gavioli D, Ferraz A (2013) Extracellular activities and wood component losses during *Pinus taeda* biodegradation by the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Int Biodeterior Biodegrad* 82:187–191.

Ai M, Wang F, Zhang Y, Huang F (2014) Purification of pyranose oxidase from the white rot fungus *Irpex lacteus* and its cooperation with laccase in lignin degradation. *Process Biochem* 49:2191–2198.

Alfaro M, Oguiza JA, Ramírez L, Pisabarro AG (2014) Comparative analysis of secretomes in basidiomycete fungi. *J Proteom* 102:28–43.

Alonso MV, Oliet M, Rodríguez F, Astarloa G, Echeverría JM (2004) Use of a methylolated softwood ammonium lignosulfonate as partial substitute of phenol in resol resins manufacture. *J Appl Polym Sci* 94:643–650.

Alonso M, Oliet M, Rodríguez F, García J, Gilarranz M, Rodríguez J (2005) Modification of ammonium lignosulfonate by phenolation for use in phenolic resins. *Bioresour Technol* 96:1013–1018.

Alonso MV, Rodríguez JJ, Oliet M, Rodríguez F, García J, Gilarranz MA (2001) Characterization and structural modification of ammoniac lignosulfonate by methylation. *J Appl Polym Sci* 82:2661–2668.

Anastasi A, Prigione V, Varese GC (2010) Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to different eco-physiological groups. *J Hazard Mater* 177:260–267.

Ander P, Eriksson KE, Yu HS (1984) Metabolism of lignin-derived aromatic-acids by wood-rotting fungi. *J Gen Microbiol* 130:63–68.

Arantes V, Jellison J, Goodell B (2012) Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:323–338.

Arantes V, Milagres AMF, Filley TR, Goodell B (2011) Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:541–555.

Arantes V, Qian Y, Kelley S, Milagres AF, Filley T, Jellison J, Goodell B (2009a) Biomimetic oxidative treatment of spruce wood studied by pyrolysis–molecular beam mass spectrometry coupled with multivariate analysis and ¹³C-labeled tetramethylammonium hydroxide thermochemolysis: implications for fungal degradation of wood. *J Biol Inorg Chem* 14:1253–1263.

Arantes V, Qian Y, Milagres AMF, Jellison J, Goodell B (2009b) Effect of pH and oxalic acid on the reduction of Fe³⁺ by a biomimetic chelator and on Fe³⁺ desorption/adsorption onto wood: implications for brown-rot decay. *Int Biodeterior Biodegrad* 63:478–483.

Archibald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Paice MG, Reid ID (1997) Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J Biotechnol* 53:215–236.

Areskog D, Li J, Gellerstedt G, Henriksson G (2010) Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis. *Biomacromol* 11:904–910.

Ayala Aceves M, Baratto MC, Basosi R, Vazquez-Duhalt R, Pogni R (2001) Spectroscopic characterization of a manganese–lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera adusta* in the absence of manganese: evidence of a protein centered radical by hydrogen peroxide. *J Mol Catal B: Enzym* 16:159–167.

- Babczinski P** (2012) Herbicides disturbing the synthesis of very long-chain fatty acids. In: Krämer W, Schirmer U, Jeschke P, Witschel M (Hrsg.) Modern crop protection compounds: 1. Herbicides, 2. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim, S 305–316.
- Becker HG, Sinitsyn AP** (1993) Mn-peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: the action on the lignin. Biotechnol Lett 15:289–294.
- Bennett JW, Connick Jr WJ, Daigle D, Wunch KG** (2001) Formulation of fungi for *in situ* bioremediation. In: Gadd GM (Hrsg.) Fungi in bioremediation, Cambridge University Press, Cambridge, S 97–112.
- Bennett JW, Wunch KG, Faison BD** (2002) Use of fungi in bioremediation. In: Hurst CC (Hrsg.) Manual of environmental microbiology, 2. Auflage. ASM Press, Washington D.C., S 960–971.
- Bernhardt R, Urlacher VB** (2014) Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. Appl Microbiol Biotechnol 98:6185–6203.
- Blackwell M, Spatafora JW** (2004) Fungi and their allies. In: Mueller GM, Bills GF, Goster MS (Hrsg.) Biodiversity of fungi, 1. Auflage. Elsevier Academic Press, Burlington, S 7–22.
- Bogaert L, Coppens N** (2013) Peroxidases: biochemical characteristics, functions and potential applications, Nova Science Publishers, Incorporated.
- Böger P, Matthes B, Schmalfuß J** (2000) Towards the primary target of chloroacetamides – new findings pave the way. Pest Manag Sci 56:497–508.
- Bollag J, McGahen LL, Minard RD, Liu S** (1986) Bioconversion of alachlor in an anaerobic stream sediment. Chemosphere 15:153–162.
- Bollag JM, Shuttleworth KL, Anderson DH** (1988) Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. Appl Environ Microbiol 54:3086–3091.
- Braun S, Vecht-Lifshitz SE** (1991) Mycelial morphology and metabolite production. Trends Biotechnol 9:63–68.

Broda P, Birch P, Brooks P, Copa-Patiño J, Sinnott ML, Tempelaars C, Wang Q, Wyatt A, Sims P (1994) *Phanerochaete chrysosporium* and its natural substrate. FEMS Microbiol Rev 13:189–195.

Brunow G, Wallin H, Sundman V (2009) A comparison of the effects of a white-rot fungus and H₂O₂-horseradish peroxidase on a lignosulfonate. Holzforschung 32:189–192.

Buchholz RF, Neal JA, McCarthy JL (1992) Some properties of paucidisperse gymnosperm lignin sulfonates of different molecular weights. J Wood Chem Technol 12:447–469.

Budin D, Suša L (1982) Bestimmung des Molekulargewichts und der Molekulargewichtsverteilung von Ligninsulfonaten aus Ca-Bisulfitablauge. Holzforschung 36:17–22.

Buser H, Mueller MD (1995) Environmental behavior of acetamide pesticide stereoisomers. 1. Stereo- and enantioselective determination using chiral high-resolution gas chromatography and chiral HPLC. Environ Sci Technol 29:2023–2030.

Buswell JA, Cai Y, Chang S (1995) Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiol Lett 128:81–87.

Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. J Biol Chem 274:10324–10330.

Campoy S, Álvarez-Rodríguez ML, Recio E, Rumbero A, Coque JR (2009) Biodegradation of 2,4,6-TCA by the white-rot fungus *Phlebia radiata* is initiated by a phase I (O-demethylation)–phase II (O-conjugation) reactions system: implications for the chlorine cycle. Environ Microbiol 11:99–110.

Chen M, Yao S, Zhang H, Liang X (2010) Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. Chin J Chem Eng 18:824–829.

- Chirnside AEM, Ritter WF, Radosevich M** (2009) Biodegradation of aged residues of atrazine and alachlor in a mix-load site soil by fungal enzymes. *Appl Environ Soil Sci* 41:2484-2492.
- Cho NS, Shin W, Jeong SW, Leonowicz A** (2004) Degradation of lignosulfonates by fungal laccase with low molecular mediators. *Bull Korean Chem Soc* 25:1551–1554.
- Colpa DI, Fraaije MW, van Bloois E** (2014) DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41:1–7.
- Crawford JJ, Sims GK, Simmons FW, Wax LM, Freedman DL** (2002) Dissipation of the herbicide [¹⁴C]dimethenamid under anaerobic conditions in flooded soil microcosms. *J Agric Food Chem* 50:1483–1491.
- Cui YQ, van der Lans RG, Luyben KC** (1997) Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng* 55:715–726.
- Daniel G, Volc J, Filonova L, Plíhal O, Kubátová E, Halada P** (2007) Characteristics of *Gloeophyllum trabeum* alcohol oxidase, an extracellular source of H₂O₂ in brown rot decay of wood. *Appl Environ Microbiol* 73:6241–6253.
- de La Rubia T, Linares A, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Romera J, Martínez J** (2002) Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavido-alba*. *Res Microbiol* 153:547–554.
- Deng Y, Zhang W, Wu Y, Yu H, Qiu X** (2011) Effect of molecular weight on the adsorption characteristics of lignosulfonates. *J Phys Chem B* 115:14866–14873.
- Dictor M, Baran N, Gautier A, Mouvet C** (2008) Acetochlor mineralization and fate of its two major metabolites in two soils under laboratory conditions. *Chemosphere* 71:663–670.
- D'Souza DT, Tiwari R, Sah AK, Raghukumar C** (2006) Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme Microb Technol* 38:504–511.

Durães Sette L, Mendonça Alves da Costa LA, Marsaioli AJ, Manfio GP (2004) Biodegradation of alachlor by soil streptomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:712–717.

Duval A, Molina-Boisseau S, Chirat C (2015) Fractionation of liginosulfonates: comparison of ultrafiltration and ethanol solubility to obtain a set of fractions with distinct properties. *Holzforschung* 69:127–134.

Dzedzyulya EI, Becker EG (2000) Mn-peroxidase from *Bjerkandera adusta* 90-41. Purification and substrate specificity. *Biochem Moscow* 65:707–712.

El Mansouri N, Farriol X, Salvadó J (2006) Structural modification and characterization of liginosulfonate by a reaction in an alkaline medium for its incorporation into phenolic resins. *J Appl Polym Sci* 102:3286–3292.

Eriksson KL, Blanchette R, Ander P (1990) Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer, Berlin, Heidelberg.

Eugenio M, Carbajo J, Terrón M, González A, Villar J (2008) Bioremediation of liginosulphonates by liginin-degrading basidiomycetous fungi. *Bioresour Technol* 99:4929–4934.

Europäischen Parlaments und Rat (2009) Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Rates vom 21. Oktober 2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Aufhebung der Richtlinien 79/117/EWG und 91/414/EWG des Rates. *Amtsblatt der EU L* 309/1 vom 24.11.2009.

Faix O (1992) New aspects of liginin utilization in large amounts. *PAPIER* 46:733–740.

Feng PCC (1991) Soil transformation of acetochlor via glutathione conjugation. *Pestic Biochem Physiol* 40:136–142.

Ferrey ML, Koskinen WC, Blanchette RA, Burnes TA (1994) Mineralization of alachlor by liginin-degrading fungi. *Can J Microbiol* 40:795–798.

Field JA, Thurman EM (1996) Glutathione Conjugation and Contaminant Transformation. *Environ Sci Technol* 30:1413–1418.

Filley T, Cody G, Goodell B, Jellison J, Noser C, Ostrofsky A (2002) Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi. *Org Geochem* 33:111–124.

Fredheim GE, Braaten SM, Christensen BE (2002) Molecular weight determination of lignosulfonates by size-exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering. *J Chromatogr A* 942:191–199.

Gadd GM (2001) *Fungi in Bioremediation*. Cambridge University Press, Cambridge.

Galliano H, Gas G, Seris J, Boudet A (1991) Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme Microb Technol* 13:478–482.

Gao J, Wang Y, Gao B, Wu L, Chen H (2012) Environmental fate and transport of pesticides. In: Rathore HS, Nollet LML (Hrsg.) *Pesticides. Evaluation of environmental pollution*. CRC Press, Boca Raton, S 29–46.

Gasser CA, Hommes G, Schäffer A, Corvini PF (2012) Multi-catalysis reactions: new prospects and challenges of biotechnology to valorize lignin. *Appl Microbiol Biotechnol* 95:1115–1134.

Geneste P, Olive JL, Ung SN, El Amoudi El Faghi M, Easton JW, Beierbeck H, Saunders JK (1979) Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of benzo[b]thiophenes and benzo[b]thiophene S-oxides and S,S-dioxides. *J Org Chem* 44:2887–2892.

Giardina P, Palmieri G, Fontanella B, Riviaccio V, Sannia G (2000) Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch Biochem Biophys* 376:171–179.

Gierer J (1982) Chemistry of delignification: a general concept. *Holzforschung* 36:43–51.

Gierer J, Reitberger T (1992) The reactions of hydroxyl radicals with aromatic rings in lignins, studied with creosol and 4-Methylveratrol. *Holzforschung* 46:495–504.

Gilardi G, Ichinose H (2013) Cytochrome P450 of wood-rotting basidiomycetes and biotechnological applications. *Biotechnol Appl Biochem* 60:71–81.

Glavaški OS, Petrović SD, Mijin DŽ, Jovanović MB, Dugandžić AM, Zeremski TM, Ivić MLA (2014) Electrochemical degradation of the pesticide dimethenamid-P at gold, DSA platinum and ruthenium oxide electrodes in different electrolytes. *Electroanal* 26:1877–1880.

Goldschmid O (1954) Determination of phenolic hydroxyl content of lignin preparations by ultraviolet spectrophotometry. *Anal Chem* 26:1421–1423.

Gonzalez-Perez D, Garcia-Ruiz E, Ruiz-Dueñas FJ, Martínez AT, Alcalde M (2014) Structural determinants of oxidative stabilization in an evolved versatile peroxidase. *ACS Catal* 4:3891–3901.

Goodell B (2003) Brown-rot fungal degradation of wood: our evolving view. In: Goodell B, Nicholas DD, Schultz TP & American Chemical Society. (Hrsg.) *Wood deterioration and preservation: advances in our changing world*. Washington D. C., American Chemical Society, S 97–118.

Goodell B, Jellison J, Liu J, Daniel G, Paszczyński A, Fekete F, Krishnamurthy S, Jun L, Xu G (1997) Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood. *J Biotechnol* 53:133–162.

Gramec D, Peterlin Mašič L, Sollner Dolenc M (2014) Bioactivation potential of thiophene-containing drugs. *Chem Res Toxicol* 27:1344–1358.

Gregory DD, Wan Z, Jenks WS (1997) Photodeoxygenation of Dibenzothiophene sulfoxide: evidence for a unimolecular S–O cleavage mechanism. *J Am Chem Soc* 119:94–102.

Grube H, Donaldson D, Kiley T, Wu L 2011. Pesticide industry sales and usage report: 2006 and 2007 market estimates. U.S. Environmental Protection Agency (EPA).

Guengerich FP (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 14:611–650.

Heberle SA, Aga DS, Hany R, Müller SR (2000) Simultaneous quantification of acetanilide herbicides and their oxanilic and sulfonic acid metabolites in natural waters. *Anal Chem* 72:840–845.

Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M, Szewzyk U (1998) Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl Environ Microbiol* 64:2788–2793.

Heydens WF, Siglin JC, Holson JF, Stegeman SD (1996) Subchronic, developmental, and genetic toxicology studies with the ethane sulfonate metabolite of alachlor. *Fundam Appl Toxicol* 33:173–181.

Heydens WF, Wilson AGE, Kraus LJ, Hopkins WE, Hotz KJ (2000) Ethane sulfonate metabolite of alachlor: assessment of oncogenic potential based on metabolic and mechanistic considerations. *Toxicol Sci* 55:36–43.

Hibi M, Hatahira S, Nakatani M, Yokozeki K, Shimizu S, Ogawa J (2012) Extracellular oxidases of *Cerrena* sp. complementarily functioning in artificial dye decolorization including laccase, manganese peroxidase, and novel versatile peroxidases. *Biocatal Agric Biotechnol* 1:220–225.

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

Hladik ML, Hsiao JJ, Roberts AL (2005a) Are neutral chloroacetamide herbicide degradates of potential environmental concern? Analysis and occurrence in the upper Chesapeake Bay. *Environ Sci Technol* 39:6561–6574.

Hladik ML, Roberts LA, Bouwer EJ (2005b) Removal of neutral chloroacetamide herbicide degradates during simulated unit processes for drinking water treatment. *Water Res* 39:5033–5044.

Hodgson E, Levi PE (1999) Interactions of piperonyl butoxide with Cytochrome P450. In: Jones DG (Hrsg.) *Piperonyl Butoxide*. Academic Press, London, S 41–53.

Hofrichter M (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol* 30:454–466.

Hofrichter M, Kellner H, Pecyna M, Ullrich R (2015) Fungal unspecific peroxygenases: heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome P450 properties. In: Hrycak EG, Bandiera SM (Hrsg.) *Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and mechanisms of cytochrome P450*. Springer International Publishing, New York, S 341–368.

Hofrichter M, Lundell T, Hatakka A (2001) Conversion of milled pine wood by manganese peroxidase from *Phlebia radiata*. *Appl Environ Microbiol* 67:4588–4593.

Hofrichter M, Scheibner K, Bublitz F, Schneegaß I, Ziegenhagen D, Martens R, Fritsche W (1999) Depolymerization of straw lignin by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* is accompanied by release of carbon dioxide. *Holzforschung* 53:161–166.

Hofrichter M, Ullrich R (2006) Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:276–288.

Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:871–897.

Hong S, Lemley AT (1998) Gas chromatographic–mass spectrometric determination of alachlor and its degradation products by direct aqueous injection. *J Chromatogr A* 822:253–261.

Hori C, Gaskell J, Igarashi K, Kersten P, Mozuch M, Samejima M, Cullen D (2014) Temporal alterations in the secretome of the selective ligninolytic fungus *Ceriporiopsis subvermispora* during growth on aspen wood reveal this organism's strategy for degrading lignocellulose. *Appl Environ Microbiol* 80:2062–2070.

Hrycak EG, Bandiera SM (2012) The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* 522:71–89.

- Hu M, Zhang W, Wu Y, Gao P, Lu X** (2009) Characteristics and function of a low-molecular-weight compound with reductive activity from *Phanerochaete chrysosporium* in lignin biodegradation. *Bioresour Technol* 100:2077–2081.
- Huntscha S, Singer H, Canonica S, Schwarzenbach RP, Fenner K** (2008) Input dynamics and fate in surface water of the herbicide metolachlor and of its highly mobile transformation product metolachlor ESA. *Environ Sci Technol* 42:5507–5513.
- Hüttermann A, Gebauer M, Volger C, Rösger C** (1977) Polymerisation und Abbau von Natrium-Ligninsulfonat durch *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. *Holzforschung* 31:83–89.
- Ichinose H, Wariishi H, Tanaka H** (1999) Bioconversion of recalcitrant 4-Methyldibenzothiophene to water-extractable products using lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Biotechnol Prog* 15:706–714.
- Jablonkai I** (2003) Alkylating reactivity and herbicidal activity of chloroacetamides. *Pest Manag Sci* 59:443–450.
- Jäger G, Büchs J** (2012) Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals. *Biotechnol J* 7:1122–1136.
- Janiga ER** (1982) Lignosulfonate-phenol-formaldehyde resin binder. Patent US 4423173.
- Jensen KA, Houtman CJ, Ryan ZC, Hammel KE** (2001) Pathways for extracellular Fenton chemistry in the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl Environ Microbiol* 67:2705–2711.
- Jin L, Nicholas DD, Kirk TK** (1990) Mineralization of the methoxyl carbon of isolated lignin by brown-rot fungi under solid substrate conditions. *Wood Sci Technol* 24:263–276.
- Jung YH, Kim HK, Park HM, Park Y, Park K, Seo J, Kim KH** (2015) Mimicking the Fenton reaction-induced wood decay by fungi for pretreatment of lignocellulose. *Bioresour Technol* 179:467–472.

Kaffenberger JT, Schilling JS (2014) Comparing lignocellulose physiochemistry after decomposition by brown rot fungi with distinct evolutionary origins. *Environ Microbiol*. DOI: 10.1111/1462-2920.12615.

Kalkhoff SJ, Kolpin DW, Thurman EM, Ferrer I, Barcelo D (1998) Degradation of chloroacetanilide herbicides: the prevalence of sulfonic and oxanilic acid metabolites in Iowa groundwaters and surface waters. *Environ Sci Technol* 32:1738–1740.

Kearney PC, Roberts T (1998) Pesticide remediation in soils and water. John Wiley & Sons Ltd, Chister.

Kenkebashvili N, Elisashvili V, Wasser SP (2012) Effect of carbon, nitrogen sources, and copper concentration on the ligninolytic enzyme production by *Coriopsis gallica*. *J Waste Conv, Bioprod and Biotechnol* 1:22–27.

Kerem Z, Bao W, Hammel KE (1998) Rapid polyether cleavage via extracellular one-electron oxidation by a brown-rot basidiomycete. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10373–10377.

Kerem Z, Jensen KA, Hammel KE (1999) Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven Fenton reaction. *FEBS Lett* 446:49–54.

Kersten PJ, Cullen D (1993) Cloning and characterization of cDNA encoding glyoxal oxidase, a H₂O₂-producing enzyme from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *PNAS* 90:7411–7413.

Khiyami MA, Pometto AL, Kennedy WJ (2006) Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in plastic composite support biofilm stirred tank bioreactors. *J Agric Food Chem* 54:1693–1698.

Kim SW, Hwang HJ, Xu CP, Choi JW, Yun JW (2003) Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. *Lett Appl Microbiol* 36:321–326.

- Kim S, Silva C, Zille A, Lopez C, Evtuguin DV, Cavaco-Paulo A** (2009) Characterisation of enzymatically oxidised lignosulfonates and their application on lignocellulosic fabrics. *Polym Int* 58:863–868.
- Kirk PM, Ainsworth GC** (2008) *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*, 10. Auflage. CAB Internat, Wallingford.
- Kirk TK** (1975) Effects of a brown-rot fungus, *Lenzites trabea*, on lignin in spruce wood. *Holzforschung* 29:99–107.
- Kirk TK, Connors WJ, Bleam RD, Hackett WF, Zeikus JG** (1975) Preparation and microbial decomposition of synthetic [¹⁴C]lignins. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 72:2515–2519.
- Kirk TK, Farrell RL** (1987) Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41:465–505.
- Ko KS, Jung HS** (1999) Phylogenetic re-evaluation of *Trametes consors* based on mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequences. *FEMS Microbiol Lett* 170:181–186.
- Koenig AB, Sleighter RL, Salmon E, Hatcher PG** (2010) NMR structural characterization of *Quercus alba* (White Oak) degraded by the brown rot fungus, *Laetiporus sulphureus*. *J Wood Chem Technol* 30:61–85.
- Kolpin DW, Thurman EM, Goolsby DA** (1996) Occurrence of selected pesticides and their metabolites in near-surface aquifers of the Midwestern United States. *Environ Sci Technol* 30:335–340.
- Kolpin DW, Thurman EM, Linhart SM** (2000) Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates. *Sci Total Environ* 248:115–122.
- Krueger MC, Hofmann U, Moeder M, Schlosser D, Ramírez L** (2015) Potential of wood-rotting fungi to attack polystyrene sulfonate and its depolymerisation by *Gloeophyllum trabeum* via hydroquinone-driven Fenton chemistry. *PLOS ONE*. DOI: 10.1371/journal.pone.0131773.

Ksenofontova MM, Mitrofanova AN, Mamleeva NA, Lunin VV (2007) The ozonization of sodium lignosulfonate in the presence of hydrogen peroxide. *Russ J Phys Chem* 81:706–710.

Kulikova NA, Klein OI, Stepanova EV, Koroleva OV (2011) Use of basidiomycetes in industrial waste processing and utilization technologies: fundamental and applied aspects (Review). *Appl Biochem Microbiol* 47:565–579.

Lackner R, Srebotnik E, Messner K (1991) Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 178:1092–1098.

Lamoureux GL, Rusness DG (1989) Propachlor metabolism in soybean plants, excised soybean tissues, and soil. *Pestic Biochem Physiol* 34:187–204.

Lamoureux GL, Stafford LE, Tanaka FS (1971) Metabolism of 2-Chloro-*N*-isopropylacetanilide (propachlor) in the leaves of corn, sorghum, sugarcane, and barley. *J Agric Food Chem* 19:346–350.

Ledneczki I, Forgo P, Kiss J, Molnár Á, Pálinkó I (2007) Conformational behaviour of acetamide derivatives studied by NMR spectroscopic and computational methods. *J Mol Struct* 834–836:349–354.

Leonowicz A, Cho N, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtaś-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J (2001) Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J Basic Microbiol* 41:185–227.

Leonowicz A, Edgehill RU, Bollag J (1984) The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Arch Microbiol* 137:89–96.

Leonowicz A, Szklarz G, Wojtaś-Wasilewska M (1985) The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (peritan Na). *Phytochem* 24:393–396.

Lestan D, Lamar RT (1996) Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 62:2045–2052.

Lin SY (1992) Isolation of lignin from pulp. In: Lin SY, Dence C (Hrsg.) (1992) *Methods in lignin chemistry*, 1. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg, S 71–74 und S 217–232.

Lin SY, Dence C (Hrsg.) (1992) *Methods in lignin chemistry*, 1. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg, S 71–74.

Liu SY, Freyer AJ, Bollag JM (1991) Microbial dechlorination of the herbicide metolachlor. *J Agric Food Chem* 39:631–636.

Loborzewski J, Trojanowski J, Wojtaś-Wasilewska M (1982) The effects of fungal peroxidase on Na-lignosulfonates. *Holzforschung* 36:173–176.

Lobos S, Larraín J, Salas L, Cullen D, Vicuña R (1994) Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiol* 140:2691–2698.

Loomis AK, Childress AM, Daigle D, Bennett JW (1997) Alginate encapsulation of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Curr Microbiol* 34:127–130.

Lora J (2008) Industrial commercial lignins: sources, properties and applications. In: Gandini MNB (Hrsg.) *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Elsevier, Amsterdam, S 225–241.

Madad N, Chebil L, Charbonnel C, Ioannou I, Ghoul M (2013) Enzymatic polymerization of sodium lignosulfonates: effect of catalysts, initial molecular weight, and mediators. *Can J Chem* 91:220–225.

Mäkelä MR, Donofrio N, de Vries RP (2014) Plant biomass degradation by fungi. *Fungal Genet Biol* 72:2–9.

Maloney SE (2001) Pesticide degradation. In: Gadd GM (Hrsg.) *Fungi in bioremediation*, Cambridge University Press, Cambridge, S 224–241.

Mangiapan S, Benfenati E, Grasso P, Terreni M, Pregnotato M, Pagani G, Barceló D (1997) Metabolites of alachlor in water: identification by mass spectrometry and chemical synthesis. *Environ Sci Technol* 31:3637–3646.

Mansouri NE, Salvadó J (2006) Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: application to liginosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins. *Ind Crops Prod* 24:8–16.

Martínez AT (2007) High redox potential peroxidases. In: Polaina J, MacCabe A (Hrsg.) *Industrial enzymes. Structure, function and applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, S 477–488.

Martínez AT, Rencoret J, Nieto L, Jiménez-Barbero J, Gutiérrez A, del Río JC (2011) Selective lignin and polysaccharide removal in natural fungal decay of wood as evidenced by in situ structural analyses. *Environ Microbiol* 13:96–107.

Martínez MJ, Ruíz-Duenas FJ, Guillen F, Martínez AT (1996) Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur J Biochem* 237:424–432.

Matsuzaki F, Wariishi H (2004) Functional diversity of cytochrome P450s of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 324:387–393.

Marzullo L, Cannio R, Giardina P, Santini MT, Sannia G (1995) Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J Biol Chem* 270:3823–3827.

Mendonça Maciel MJ, Castro e Silva A, Camarão Telles Ribeiro H (2010) Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electr J Biotechnol*. <http://dx.doi.org/10.2225/vol13>

Michel Jr FC, Grulke EA, Reddy CA (1992) Determination of the respiration kinetics for mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58:1740–1745.

Monrroy M, Ibañez J, Melin V, Baeza J, Mendonça RT, Contreras D, Freer J (2010) Bioorganosolv pretreatments of *P. radiata* by a brown rot fungus (*Gloeophyllum trabeum*) and ethanolysis. *Enzyme Microb Technol* 47:11–16.

Moreira PR, Almeida-Vara E, Malcata FX, Duarte JC (2007) Lignin transformation by a versatile peroxidase from a novel *Bjerkandera* sp. strain. *Int Biodeterior Biodegrad* 59:234–238.

Mougin C, Laugero C, Asther M, Dubroca J, Frasse P, Asther M (1994) Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 60:705–708.

Murphy CD (2003) A Review. New frontiers in biological halogenation. *J Appl Microbiol* 94:539–548.

Myrvold BO (2008) A new model for the structure of lignosulphonates: Part 1. Behaviour in dilute solutions. *Ind Crops Prod* 27:214–219.

Nada AMA, El-Saied H, Ibrahim AA, Yousef MA (1987) Waste liquors from cellulosic industries. IV. Lignin as a component in phenol formaldehyde resol resin. *J Appl Polym Sci* 33:2915–2924.

Nagasaki K, Kumazawa M, Murakami S, Takenaka S, Koike K, Aoki K (2008) Purification, characterization, and gene cloning of *Ceriporiopsis* sp. strain MD-1 peroxidases that decolorize human hair melanin. *Appl Environ Microbiol* 74:5106–5112.

Nakayama J, Sugihara Y (1997) The chemistry of thiophene 1-oxides. *Sulfur Rep* 19:349–375.

Nemergut DR, Wunch KG, Johnson RM, Bennett JW (2000) Benzo[a]pyrene removal by *Marasmiellus troyanus* in soil microcosms. *J Ind Microbiol Biotech* 25:116–119.

Nicole D, Delpuech J, Wierzbicki M, Cagniant D (1980) Hindered rotation around the aryl-to-nitrogen bond of n-acetyl, n-ethoxycarbonylmethyl-2-amino, 5-nitrothiophen. *Tetrahedron* 36:3233–3240.

Niemenmaa O, Uusi-Rauva A, Hatakka A (2008) Demethoxylation of [$O^{14}CH_3$]-labelled lignin model compounds by the brown-rot fungi *Gloeophyllum trabeum* and *Poria (Postia) placenta*. *Biodegrad* 19:555–565.

Novick NJ, Alexander M (1985) Cometabolism of low concentrations of propachlor, alachlor, and cycloate in sewage and lake water. *Appl Environ Microbiol* 49:737–743.

Ouyang X, Qiu X, Chen P (2006) Physicochemical characterization of calcium lignosulfonate—a potentially useful water reducer. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 282-283:489–497.

Paliwal R, Rawat AP, Rawat M, Rai JPN (2012) Bioligninolysis: recent updates for biotechnological solution. *Appl Biochem Biotechnol* 167:1865–1889.

Park C, Lee B, Han E, Lee J, Kim S (2006) Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization. *Enzyme Microbial Technol* 39:371–374.

Pérez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K, Martínez AT (2005) Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *J Mol Biol* 354:385–402.

Polaina J, MacCabe AP (2007) *Industrial enzymes: structure, function and applications*. Springer, Dordrecht.

Polizeli MTM, Rai M (2013) *Fungal enzymes*. CRC Press, Boca Raton.

Pollegioni L, Tonin F, Rosini E (2015) Lignin-degrading enzymes. *FEBS J* 282:1190–1213.

Pointing S (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:20–33.

Pothuluri JV, Evans FE, Doerge DR, Churchwell MI, Cerniglia CE (1997) Metabolism of metolachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Arch Environ Contam Toxicol* 32:117–125.

Pothuluri JV, Freeman JP, Evans FE, Moorman TB, Cerniglia CE (1993) Metabolism of alachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *J Agric Food Chem* 41:483–488.

Purnomo AS, Mori T, Kamei I, Kondo R (2011) Basic studies and applications on bioremediation of DDT: a review. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:921–930.

Racke KD (2003) Release of pesticides into the environment and initial concentrations in soil, water, and plants. *Pure Appl Chem* 75:1905–1916.

Rademacher PM, Woods CM, Huang Q, Szklarz GD, Nelson SD (2012) Differential oxidation of two thiophene-containing regioisomers to reactive metabolites by cytochrome P450 2C9. *Chem Res Toxicol* 25:895–903.

Rebich RA, Coupe RH, Thurman EM (2004) Herbicide concentrations in the Mississippi River Basin—the importance of chloroacetanilide herbicide degradates. *Sci Total Environ* 321:189–199.

Reddy AC, Mathew Z (2001) Bioremediation potential of white rot fungi. In: Gadd GM (Hrsg.) *Fungi in bioremediation*, Cambridge University Press, Cambridge, S 52–78.

Reddy GVB, Gold MH (2000) Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. *Microbiol* 146:405–413.

Regalado C, García-Almendárez B, Duarte-Vázquez M (2004) Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev* 3:243–256.

Reid ID, Paice MG (1994) Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 13:369–375.

Renganathan V, Miki K, Gold MH (1987) Haloperoxidase reactions catalyzed by lignin peroxidase, an extracellular enzyme from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem* 26:5127–5132.

Richardson SD (2012) Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 84:747–778.

Richardson SD, Ternes TA (2005) Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 77:3807–3838.

Riechers DE, Fuerst EP, Miller KD (1996) Initial metabolism of dimethenamid in safened and unsafened wheat shoots. *J Agric Food Chem* 44:1558–1564.

Ringena, O (2006) Fraktionierung und Charakterisierung von elektrochemisch behandelten Magnesium-Sulfitablaugen. Dissertation, Universität Hamburg.

Ringena O, Saake B, Lehnen R (2005) Isolation and fractionation of liginosulfonates by amine extraction and ultrafiltration: a comparative study. *Holzforschung* 59:405–412.

Ritter D, Jaklin-Farcher S, Messner K, Stachelberger H (1990) Polymerization and depolymerization of liginosulfonate by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on foam. *J Biotechnol* 13:229–241.

Rivera-Hoyos CM, Morales-Álvarez ED, Poutou-Piñales RA, Pedroza-Rodríguez AM, Rodríguez-Vázquez R, Delgado-Boada JM (2013) Fungal laccases. *Fungal Biol Rev* 27:67–82.

Rodakiewicz-Nowak J, Jarosz-Wilkolazka A, Luterek J (2006) Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents. *Appl Catal A* 308:56–61.

Rodríguez J, Parra C, Contreras D, Freer J, Baeza J (2001) Dihydroxybenzenes: driven Fenton reactions. *Water Sci Technol* 44:251–256.

Rühl M (2009) Laccases and other ligninolytic enzymes of the basidiomycetes *Coprinopsis cinerea* and *Pleurotus ostreatus* - submerged and solid state fermentation, morphological studies of liquid cultures and characterisation of new laccases. Dissertation, Georg-August-University Göttingen.

Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol Microbiol* 31:223–235.

Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, Garcia E, Miki Y, Martínez MJ, Martínez AT (2009) Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J Exp Bot* 60:441–452.

- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, Mate MJ, Romero A, Martínez MJ, Smith AT, Martínez AT** (2008) Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Biochem* 47:1685–1695.
- Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, Perez-Boada M, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K, Martínez AT** (2007) Manganese oxidation site in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase: a site-directed mutagenesis, kinetic, and crystallographic study. *Biochem* 46:66–77.
- Sanlier SH, Gider S, Köprülü A** (2013) Immobilization of laccase for biotechnology applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 41:259–263.
- Sáez-Jiménez V, Acebes S, Guallar V, Martínez AT, Ruiz-Dueñas FJ** (2015) Improving the oxidative stability of a high redox potential fungal peroxidase by rational design. *PLOS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0124750.
- Sandín-España P, Sevilla-Morán B** (2012) Pesticide degradation in water. In: Rathore HS, Nollet LML (Hrsg.) *Pesticides. Evaluation of environmental pollution*. CRC Press, Boca Raton, S 79–130.
- Sanyal D, Kulshrestha G** (2002) Metabolism of metolachlor by fungal cultures. *J Agric Food Chem* 50:499–505.
- Schlenk D, Bevers RJ, Vertino AM, Cerniglia CE** (1994) P450 catalysed S-oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Xenobiotica* 24:1077–1083.
- Schüttmann I, Bouws H, Szweda RT, Suckow M, Czermak P, Zorn H** (2014) Induction, characterization, and heterologous expression of a carotenoid degrading versatile peroxidase from *Pleurotus sapidus*. *J Mol Catal B: Enzym* 103:79–84.
- Seigle-Murandi F, Krivobok S, Steiman R, Thiault G, Benoit-Guyod J** (1991) Biotransformation of 2-acetylthiophene by micromycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:436–440.
- Selin J, Sundman V, Rähä M** (1975) Utilization and polymerization of lignosulfonates by wood-rotting fungi. *Arch Microbiol* 103:63–70.

Sheng D, Gold MH (1997) Haloperoxidase activity of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Arch Biochem and Biophys 345:126–134.

Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2007) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc 1:2856–2860.

Shimokawa T, Nakamura M, Hayashi N, Ishihara M (2004) Production of 2,5-dimethoxyhydroquinone by the brown-rot fungus *Serpula lacrymans* to drive extracellular Fenton reaction. Holzforschung 58:305–310.

Simons BH, Barnett P, Vollenbroek EGM, Dekker HL, Muijsers AO, Messerschmidt A, Wever R (1995) Primary structure and characterization of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. Eur J Biochem 229:566–574.

Singh AP, Singh T (2014) Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. Biomass Bioenergy 62:198–206.

Sivey JD, McCullough CE, Roberts AL (2010) Chlorine monoxide (Cl₂O) and Molecular Chlorine (Cl₂) as active chlorinating agents in reaction of dimethenamid with aqueous free chlorine. Environ Sci Technol 44:3357–3362.

Sixta H (2006) Handbook of pulp. Wiley-VCH, Weinheim.

Słaba M, Szewczyk R, Piątek MA, Długoński J (2013) Alachlor oxidation by the filamentous fungus *Paecilomyces marquandii*. J Hazard Mat 261:443–450.

Smith AE, Phillips DV (1975) Degradation of alachlor by *Rhizoctonia solani*. Agron J 67:347–349.

Song Q, Wang F, Xu J (2012) Hydrogenolysis of lignosulfonate into phenols over heterogeneous nickel catalysts. Chem Commun 48:7019.

Stamper DM, Tuovinen OH (1998) Biodegradation of the acetanilide herbicides alachlor, metolachlor, and propachlor. Crit Rev Microbiol 24:1–22.

Stormo KE, Crawford RL (1992) Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. Appl Environ Microbiol 58:727–730.

Strassberger Z, Tanase S, Rothenberg G (2014) The pros and cons of lignin valorisation in an integrated biorefinery. *RSC Adv* 4:25310–25318.

Sundaramoorthy M, Turner J, Poulos TL (1995) The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase–cytochrome P450 functional hybrid. *Struct* 3:1367–1378.

Taboada-Puig R, Junghanns C, Demarche P, Moreira M, Feijoo G, Lema J, Agathos S (2011a) Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. *Bioresour Technol* 102:6593–6599.

Taboada-Puig R, Lú-Chau T, Moreira MT, Feijoo G, Martínez MJ, Lema JM (2011b) A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase. *World J Microbiol Biotechnol* 27:115–122.

Tanaka H, Enoki A, Fuse G (1986) Correlation between ethylene production from alpha-oxo-gamma-methylthiobutyric acid and degradation of lignin dimeric model compounds by wood-inhabiting fungi. *MOKUZAI GAKKAISHI* 32:125–135.

Tanaka T, Takahashi M, Hagino H, Nudejima S, Usui H, Fujii T, Taniguchi M (2010) Enzymatic oxidative polymerization of methoxyphenols. *Chem Engin Sci* 65:569–573.

Thiemann T, Walton DJ, Brett AO, Iniesta J, Marken F, Li Y (2009) The chemistry of thiophene S-oxides¹ and related compounds. *Arch Org Chem* 9:96–113.

Thomas JA, Morris DR, Hager LP (1970) Chloroperoxidase: VII. Classical peroxidatic, catalytic, and halogenating forms of the enzyme. *J Biol Chem* 245:3129–3134.

Tiedje JM, Hagedorn ML (1975) Degradation of alachlor by a soil fungus, *Chaetomium globosum*. *J Agric Food Chem* 23:77–81.

Tortella GR, Diez MC, Durán N (2005) Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critic Rev Microbiol* 31:197–212.

Touahar IE, Haroune L, Ba S, Bellenger J, Cabana H (2014) Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Sci Total Environ* 481:90–99.

Treiber A, Dansette PM, El Amri H, Girault J, Ginderow D, Mornon J, Mansuy D (1997) Chemical and biological oxidation of thiophene: preparation and complete characterization of thiophene S-oxide dimers and evidence for thiophene S-oxide as an intermediate in thiophene metabolism *in vivo* and *in vitro*. *J Am Chem Soc* 119:1565–1571.

Tsukihara T, Honda Y, Sakai R, Watanabe T (2008) Mechanism for oxidation of high-molecular-weight substrates by a fungal versatile peroxidase, MnP2. *Appl Environ Microbiol* 74:2873–2881.

Tychanowicz GK, de Souza DF, Souza CGM, Kadowaki MK, Peralta RM (2006) Copper improves the production of laccase by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. *Brazil Arch Biol Technol* 49:699–704.

Ulčnik A, Kralj Cigić I, Pohleven F (2013) Degradation of lindane and endosulfan by fungi, fungal and bacterial laccases. *World J Microbiol Biotechnol* 29:2239–2247.

Varela E, Tien M (2003) Effect of pH and oxalate on hydroquinone-derived hydroxyl radical formation during brown rot wood degradation. *Appl Environ Microbiol* 69:6025–6031.

Vasiljević T, Grujić S, Radišić M, Dujaković, Laušević M (2012) Pesticide residues in surface water and groundwater. In: Rathore HS, Nollet LML (Hrsg.) *Pesticides. Evaluation of environmental pollution*. CRC Press, Boca Raton, S 259–300.

Vázquez-Duhalt R, Ayala M, Márquez-Rocha FJ (2003) Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago* *Phytochem* 58:929–933.

Wariishi H, Valli K, Gold MH (1991) Depolymerization of lignin by manganese peroxidase of. *Biochem Biophys Res Commun* 176:269–275.

Welinder KG (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol* 2:388–393.

Wexler AS (1964) Characterization of liginosulfonates by ultraviolet spectrometry. Direct and difference spectrograms. *Anal Chem* 36:213–221.

Widsten P, Kandelbauer A (2008) Laccase applications in the forest products industry: a review. *Enzyme Microb Technol* 42:293–307.

Wojtaś-Wasilewska M, Trojanowski J (1975) Studies on the decomposition of liginosulfonates by the fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes pubescens*. *Acta Microbiol Pol B* 7:77–90.

Wojtaś-Wasilewska M, Trojanowski J, Luterek J (1980) Biotransformation of sodium liginosulfonates of different molecular-weights by the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Acta Microbiol Pol* 29:353–364.

Wolfenden BS, Willson RL (1982) Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2[prime or minute]-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J Chem Soc Perkin Trans 2*:805–812.

Wong DWS (2009) Structure and action mechanism of liginolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol* 157:174–209.

Wünning P (2001) Applications and use of lignin as raw material. In: Steinbüchel A, Hofrichter M (Hrsg.) *Biopolymers*, 1. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim, S 117–128.

Xu G, Goodell B (2001) Mechanisms of wood degradation by brown-rot fungi: chelator-mediated cellulose degradation and binding of iron by cellulose. *J Biotechnol* 87:43–57.

Yang D, Qiu X, Zhou M, Lou H (2007) Properties of sodium liginosulfonate as dispersant of coal water slurry. *Energy Convers Manage* 48:2433–2438.

Yelle DJ, Ralph J, Lu F, Hammel KE (2008) Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. *Environ Microbiol* 10:1844–1849.

Ylittervo P, Franzén CJ, Taherzadeh MJ (2011) Ethanol production at elevated temperatures using encapsulation of yeast. *J Biotechnol* 156:22–29.

Yokley RA, Mayer LC, Huang S, Vargo JD (2002) Analytical Method for the determination of metolachlor, acetochlor, alachlor, dimethenamid, and their corresponding ethanesulfonic and oxanillic acid degradates in water using SPE and LC/ESI-MS/MS. *Anal Chem* 74:3754–3759.

Zablotowicz RM, Hoagland RE, Locke MA, Hickey WJ (1995) Glutathione-S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61:1054–1060.

Zakzeski J, Bruijninx PCA, Jongerius AL, Weckhuysen BM (2010) The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chem Rev* 110:3552–3599.

Zimmerman LR, Schneider RJ, Thurman EM (2002) Analysis and detection of the herbicides dimethenamid and flufenacet and their sulfonic and oxanillic acid degradates in natural water. *J Agric Food Chem* 50:1045–1052.

A Anhang

A.1 NMR-Analyse

Metabolit M1 (4 Isomere):

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6,77, 6,75, 6,70, 6,69 (CH, s, 4-H), 4,29, 4,20, 4,09 (CH, m, 7-H), 3,87, 3,86, 3,71, 3,70 (CH_2 , s, 12-H), 3,61, 3,53, 3,43, 3,41, 3,38 (CH_2 , dd, 9-H), 3,26, 3,24, 3,23, 3,17 (CH_3 , s, 10-H), 2,28, 2,27, 2,26 (CH_3 , s, 6-H), 2,02, 2,01, 2,00 (CH_3 , s, 5-H), 1,35, 1,29, 1,27, 1,19 (CH_3 , d, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 166,50, 166,38, 165,91, 165,76 (C-q, C-11), 151,76, 151,28, 149,75, 149,21 (C-q, C-1), 144,89, 144,55, 144,10 (C-q, C-3), 137,68, 137,32, 136,85, 136,82 (C-q, C-2), 130,97, 130,49, 129,94, 129,78 (CH, C-4), 73,85, 73,73, 73,52, 73,36 (CH_2 , C-9), 58,57, 58,53, 58,42, 58,37 (CH_3 , C-10), 56,27, 55,68, 55,65, 55,33 (CH, C-7), 42,26, 42,17, 42,13, 42,06 (CH_2 , C-12), 15,79, 15,50, 15,15, 14,97 (CH_3 , C-5), 14,77, 14,76, 14,56, 14,16 (CH_3 , C-6), 11,66, 11,58, 11,19, 11,13 (CH_3 , C-8).

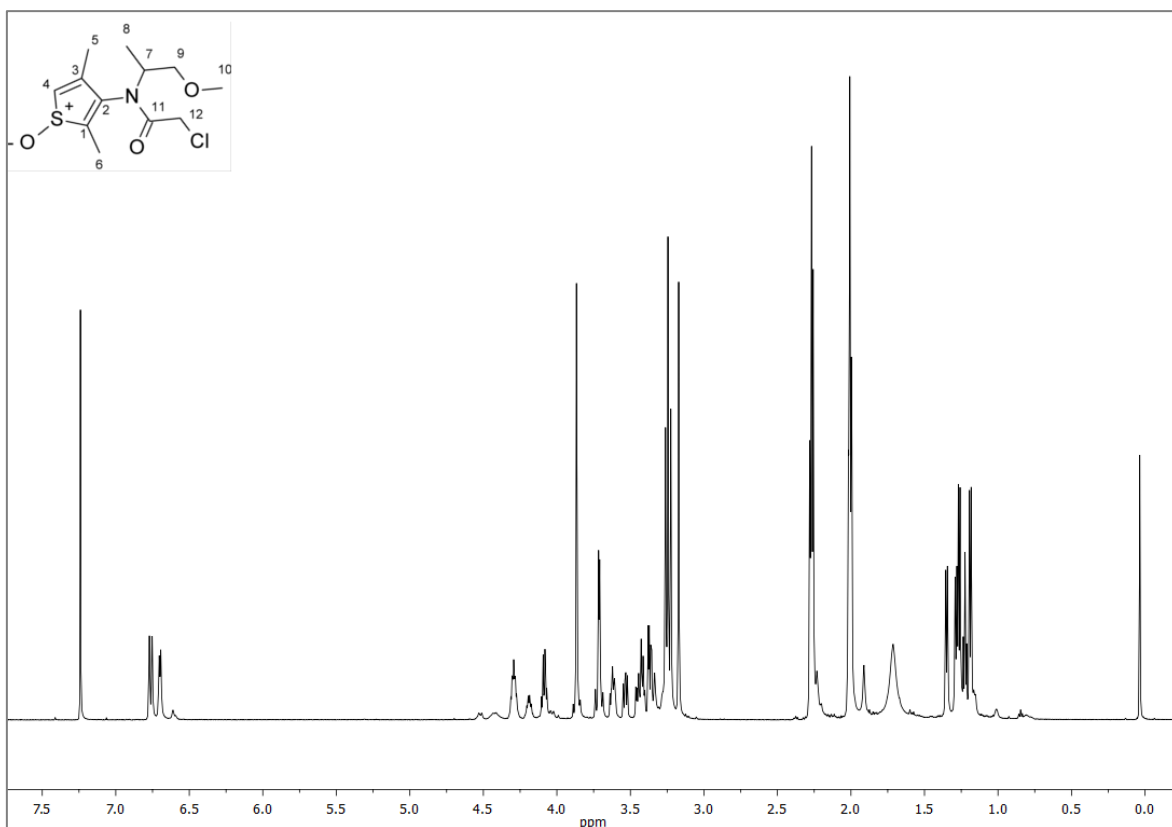


Abbildung A1.1: ^1H , Metabolit M1.

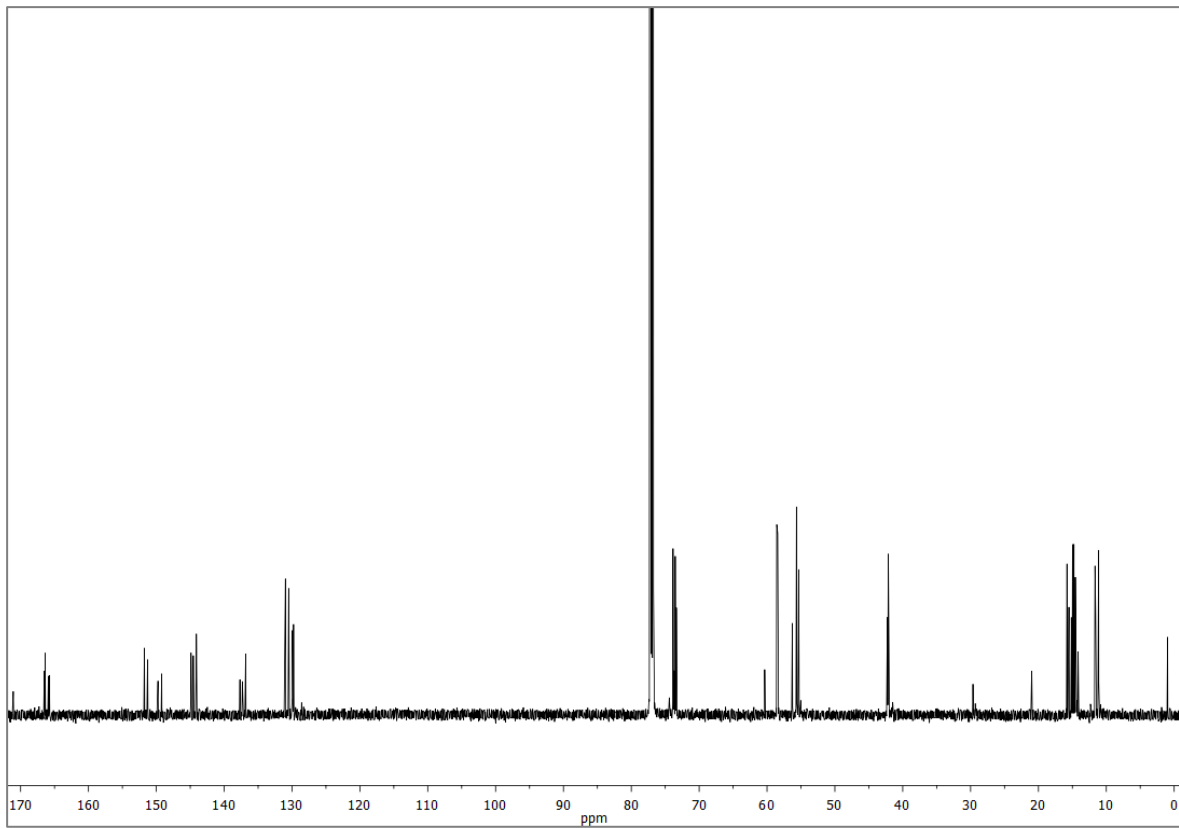
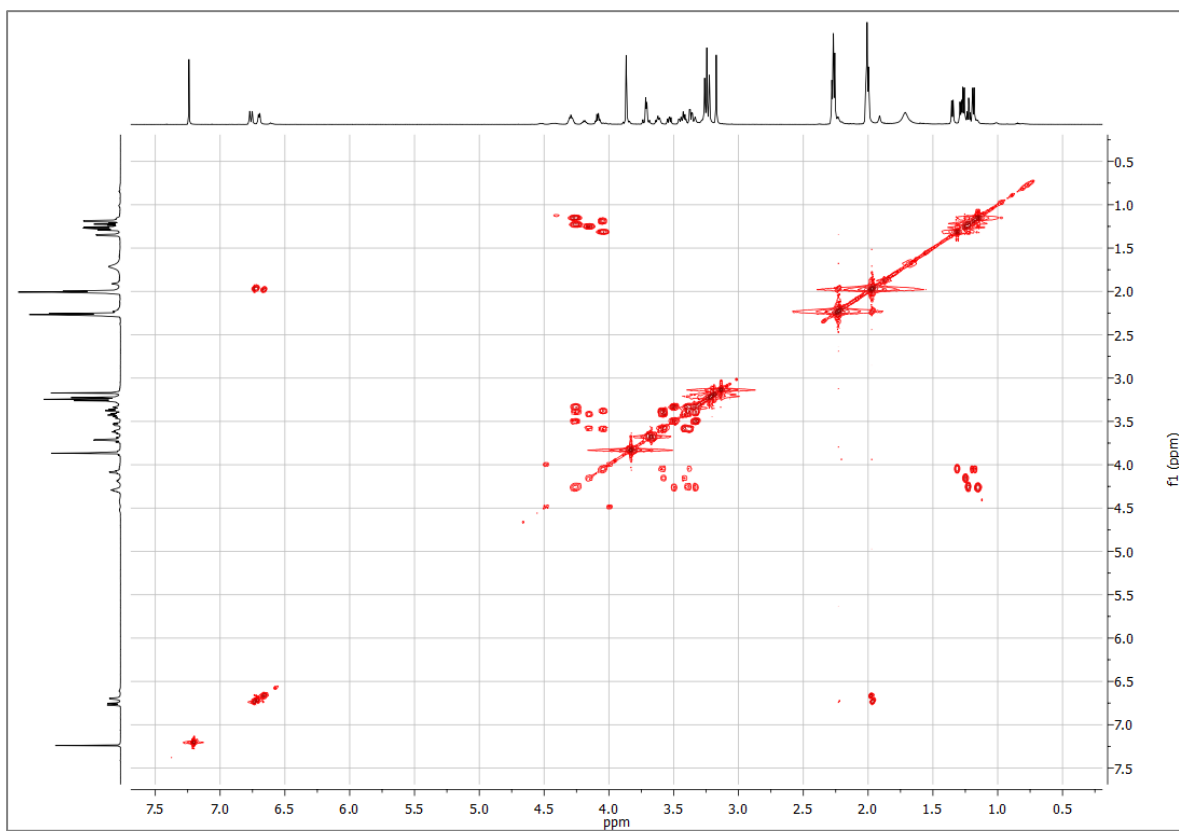
Abbildung A1.2: ^{13}C , Metabolit M1.

Abbildung A1.3: H,H-COSY, Metabolit M1.

Metabolit M2 (2 Isomere):

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6,97, 6,94 (CH, s, 4-H), 4,74, 4,73 (CH, m, 7-H), 4,68, 4,53 (CH_2 , dd, 6-H), 3,75, 3,62 (CH_2 , dd, 12-H), 3,74, 3,41 (CH_2 , dd, 9-H), 3,35, 3,29 (CH_3 , s, 10-H), 2,12, 2,03 (CH_3 , s, 5-H), 1,40, 1,03 (CH_3 , d, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 167,55, 166,91 (C-q, C-11), 141,79, 140,14 (C-q, C-1), 136,85, 135,49 (C-q, C-3), 134,80, 133,43 (C-q, C-2), 120,70, 120,68 (CH, C-4), 74,54, 73,79 (CH_2 , C-9), 58,76, 58,57 (CH_3 , C-10), 56,82, 56,69 (CH_2 , C-6), 52,59 (CH, C-7), 42,89, 42,75 (CH_2 , C-12), 15,46, 14,78 (CH_3 , C-8), 14,34, 14,22 (CH_2 , C-5).

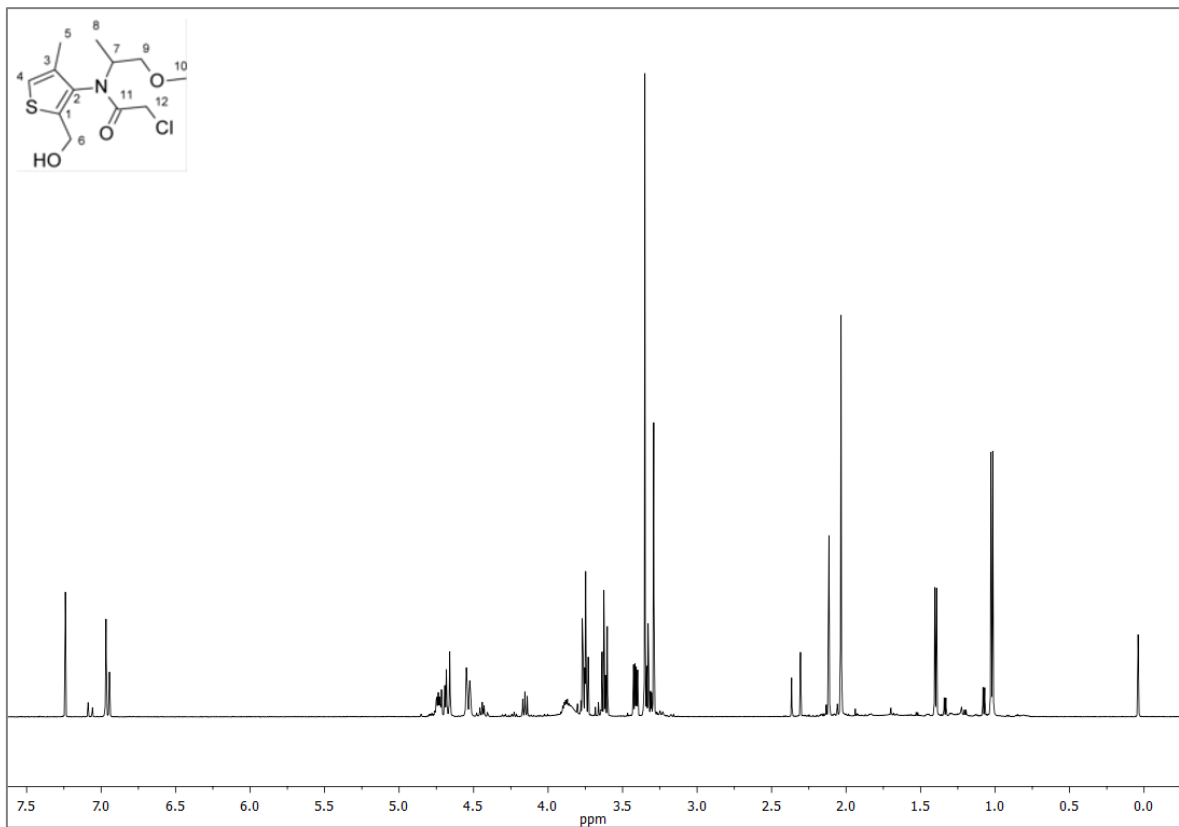


Abbildung A1.4: ^1H , Metabolit **M2**.

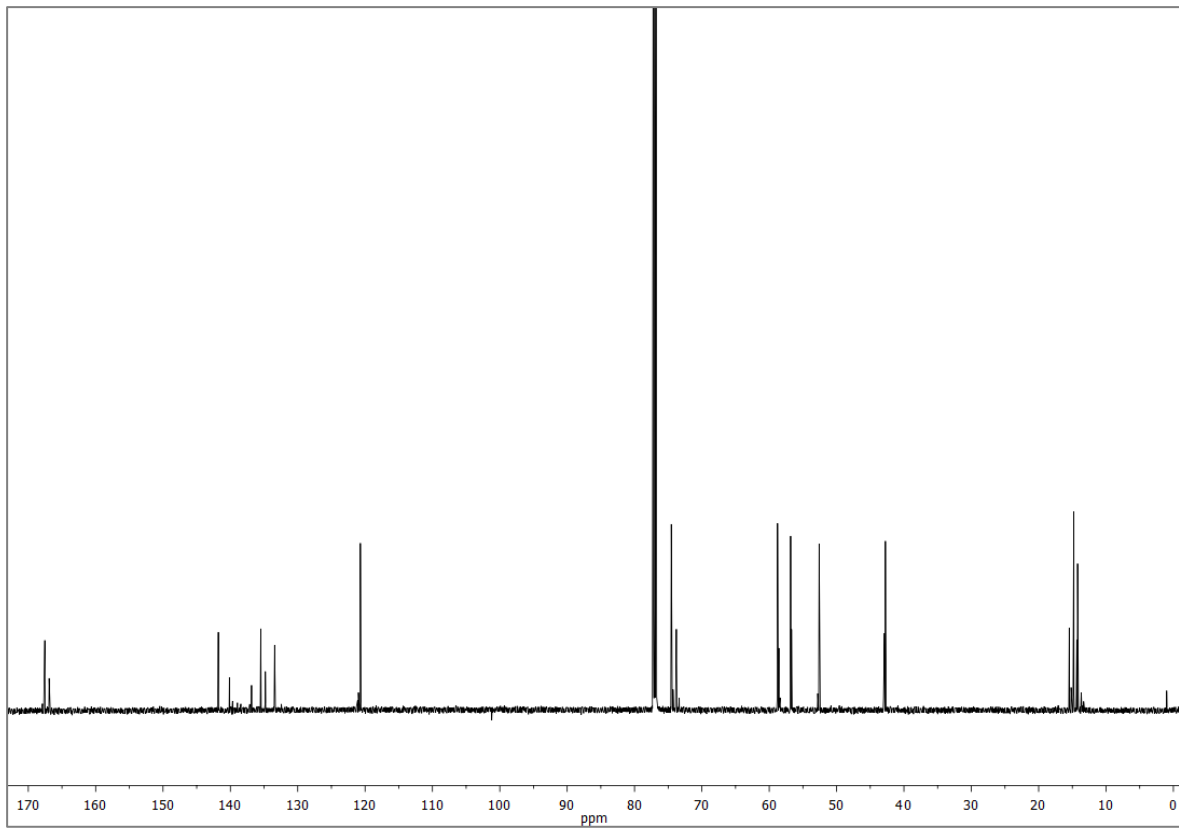
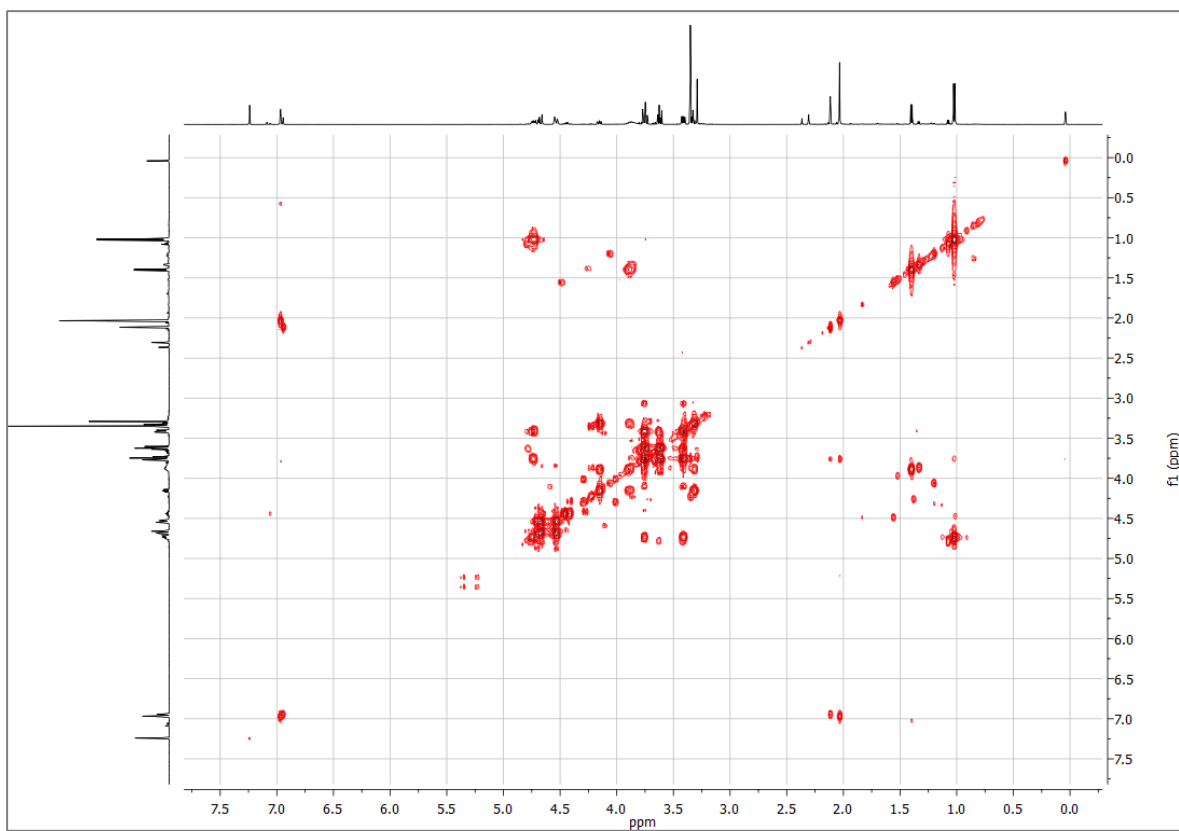
Abbildung A1.5: ^{13}C , Metabolit M2.

Abbildung A1.6: H,H-COSY, Metabolit M2.

Metabolit M3A:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,49 (CH, q, 1-H), 4,26 (CH, m, 7-H), 3,88 (CH₂, s, 12-H), 3,72, 3,29 (CH₂, dd, 9-H), 3,24 (CH₃, s, 10-H), 1,83 (CH₃, s, 5-H), 1,56 (CH₃, d, 6-H), 1,39 (CH₃, d, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 196,04 (C-q, C-4), 165,07 (C-q, C-11), 160,94 (C-q, C-2), 137,29 (C-q, C-3), 72,83 (CH₂, C-9), 58,77 (CH₃, C-10), 56,26 (CH, C-7), 45,74 (CH, C-4), 41,17 (CH₂, C-12), 18,95 (CH₃, C-6), 16,02 (CH₃, C-5), 11,07 (CH₃, C-8).

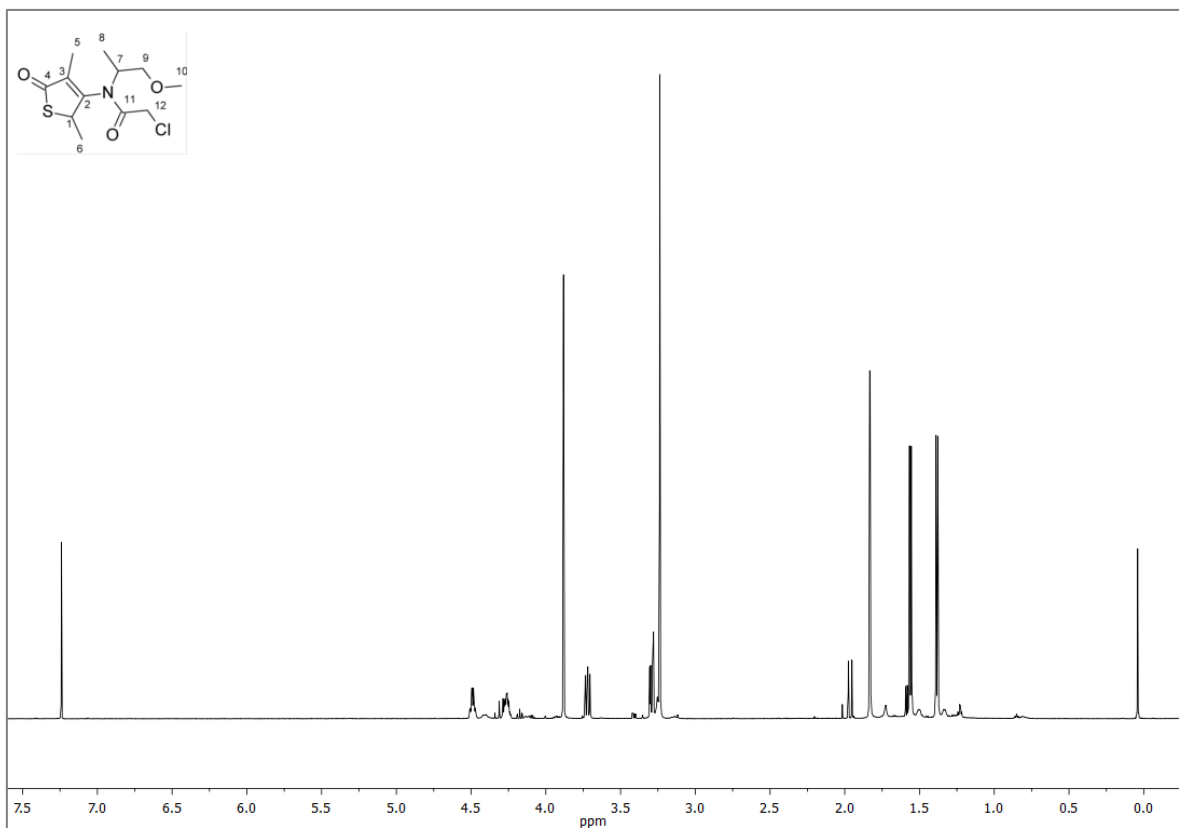


Abbildung A1.7: ^1H , Metabolit M3A.

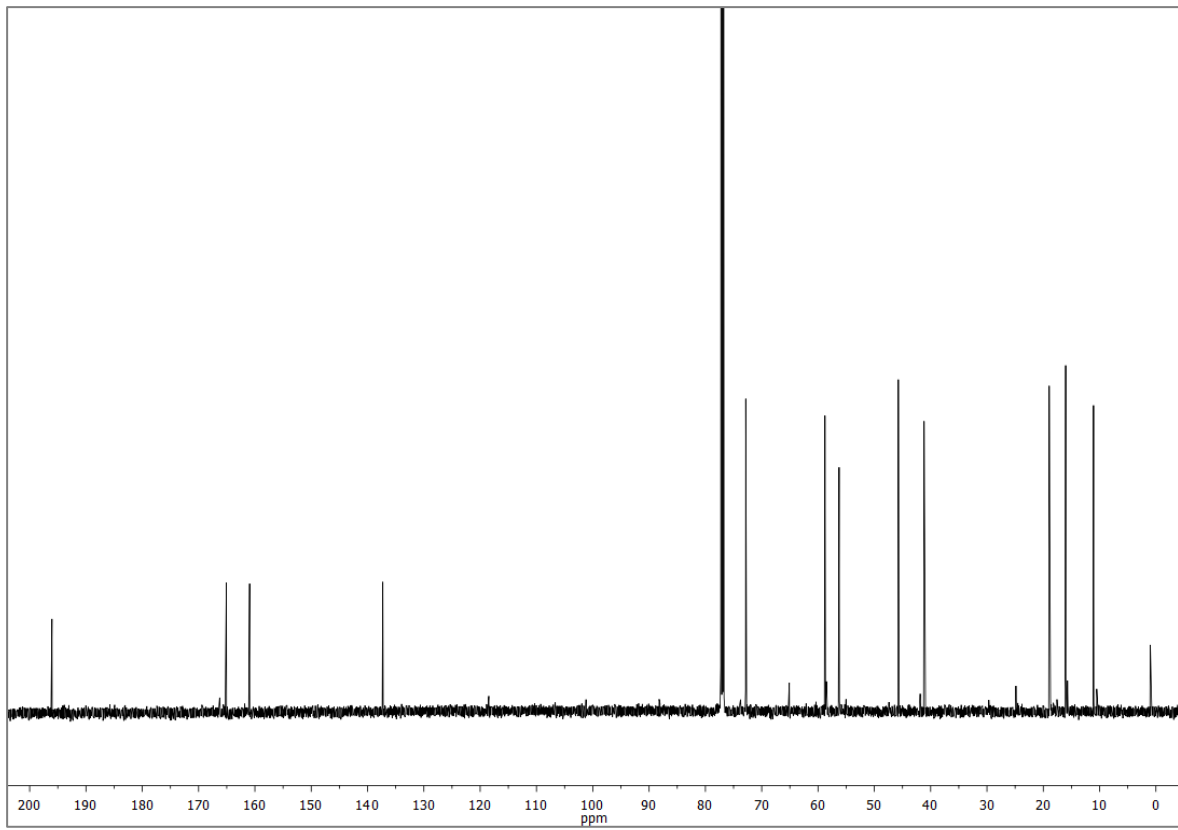
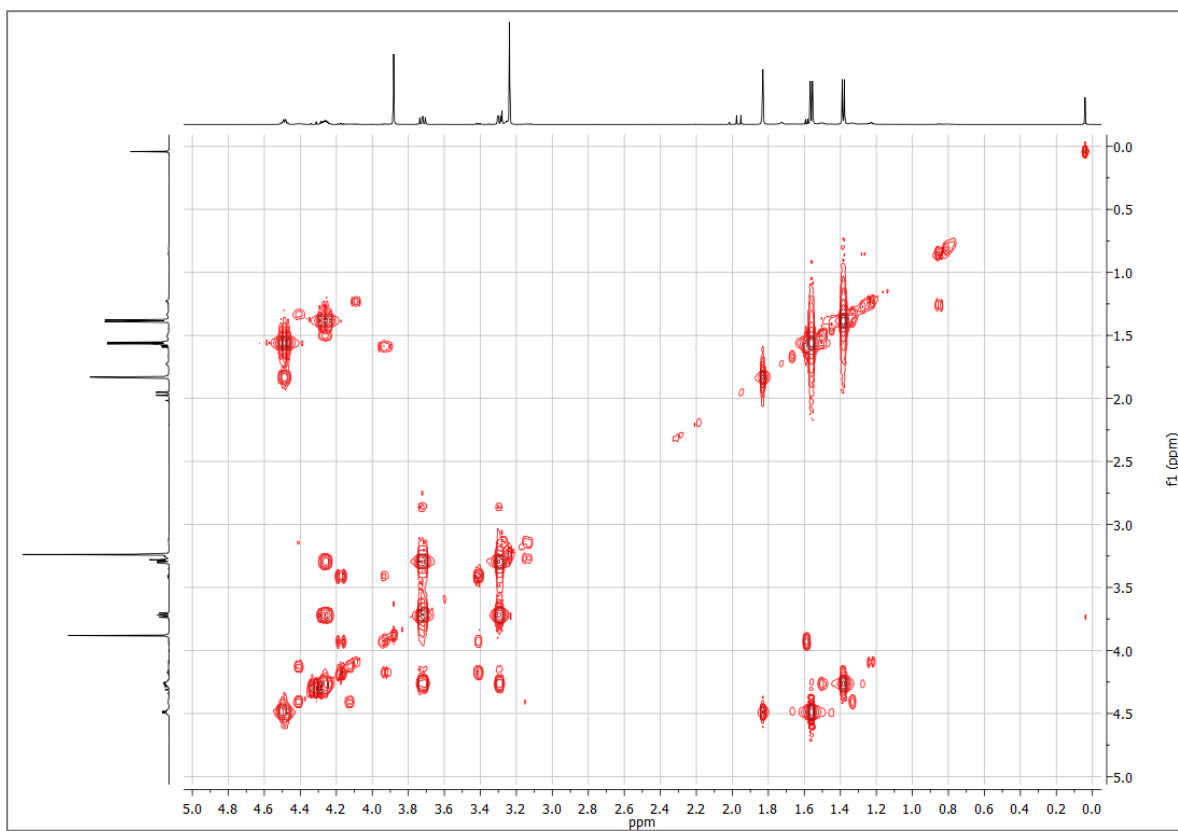
Abbildung A1.8: ^{13}C , Metabolit M3A.

Abbildung A1.9: H,H-COSY, Metabolit M3A.

Metabolit M3B:

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,61 (CH, m, 7-H), 4,51 (CH, m, 1-H), 3,89 (CH₂, s, 12-H), 3,59 (CH₂, dd, 9-H), 3,32 (CH₃, s, 10-H), 1,80 (CH₃, s, 5-H), 1,54 (CH₃, d, 6-H), 1,15 (CH₃, d, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 195,96 (C-q, C-4), 165,32 (C-q, C-11), 160,14 (C-q, C-2), 138,38 (C-q, C-3), 74,09 (CH₂, C-9), 58,82 (CH₃, C-10), 53,86 (CH, C-7), 45,05 (CH, C-1), 41,26 (CH₂, C-12), 18,76 (CH₃, C-6), 14,18 (CH₃, C-5), 11,18 (CH₃, C-8).

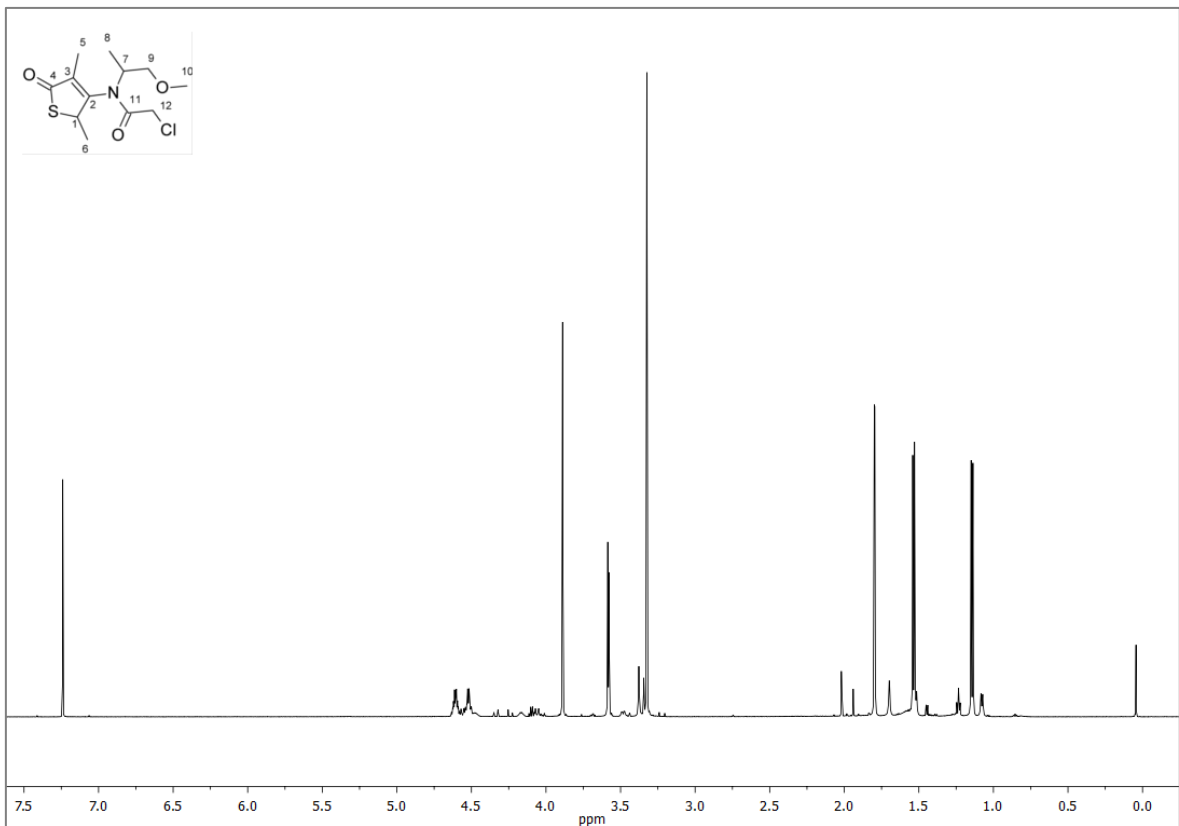
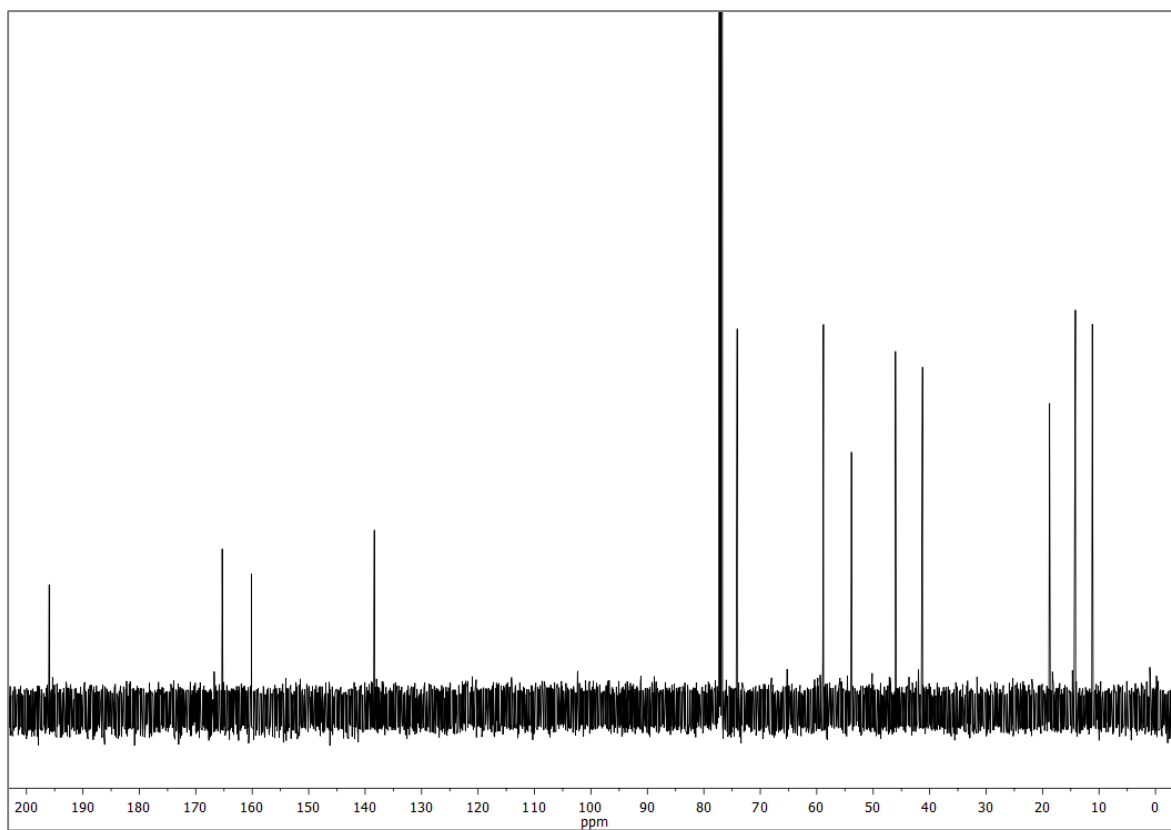
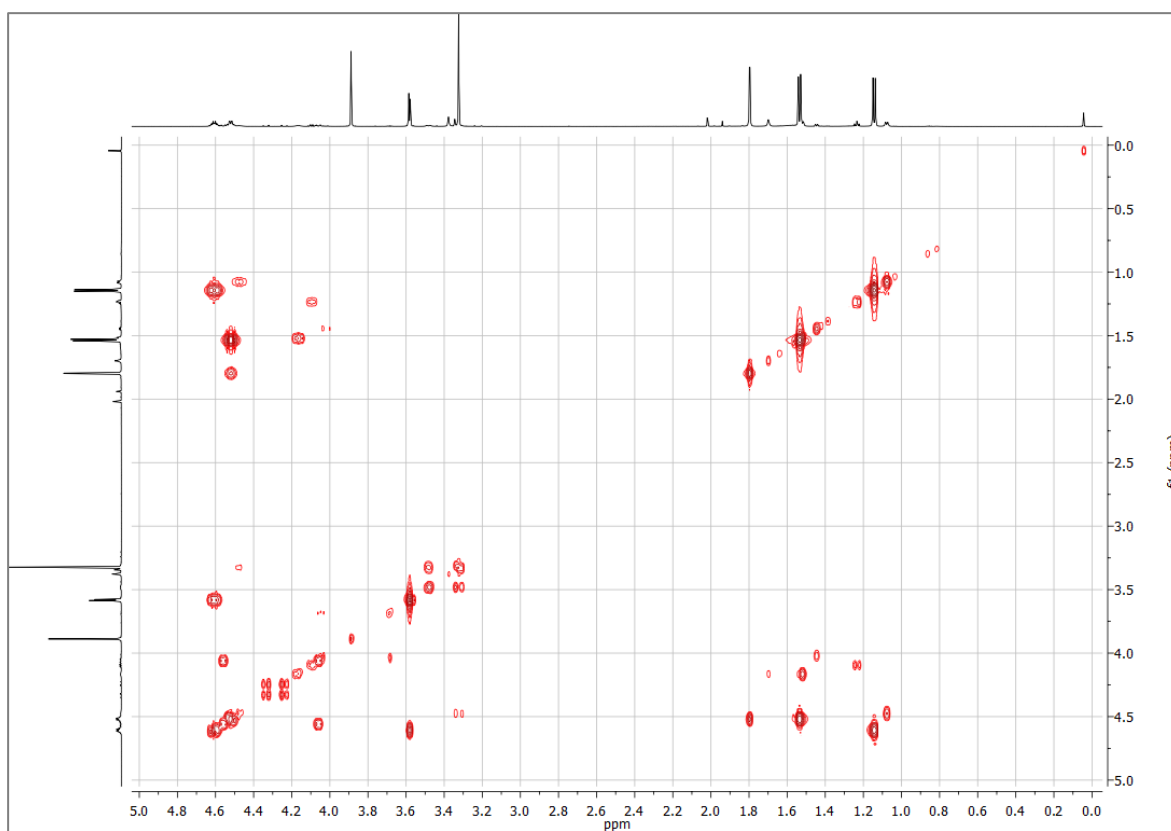


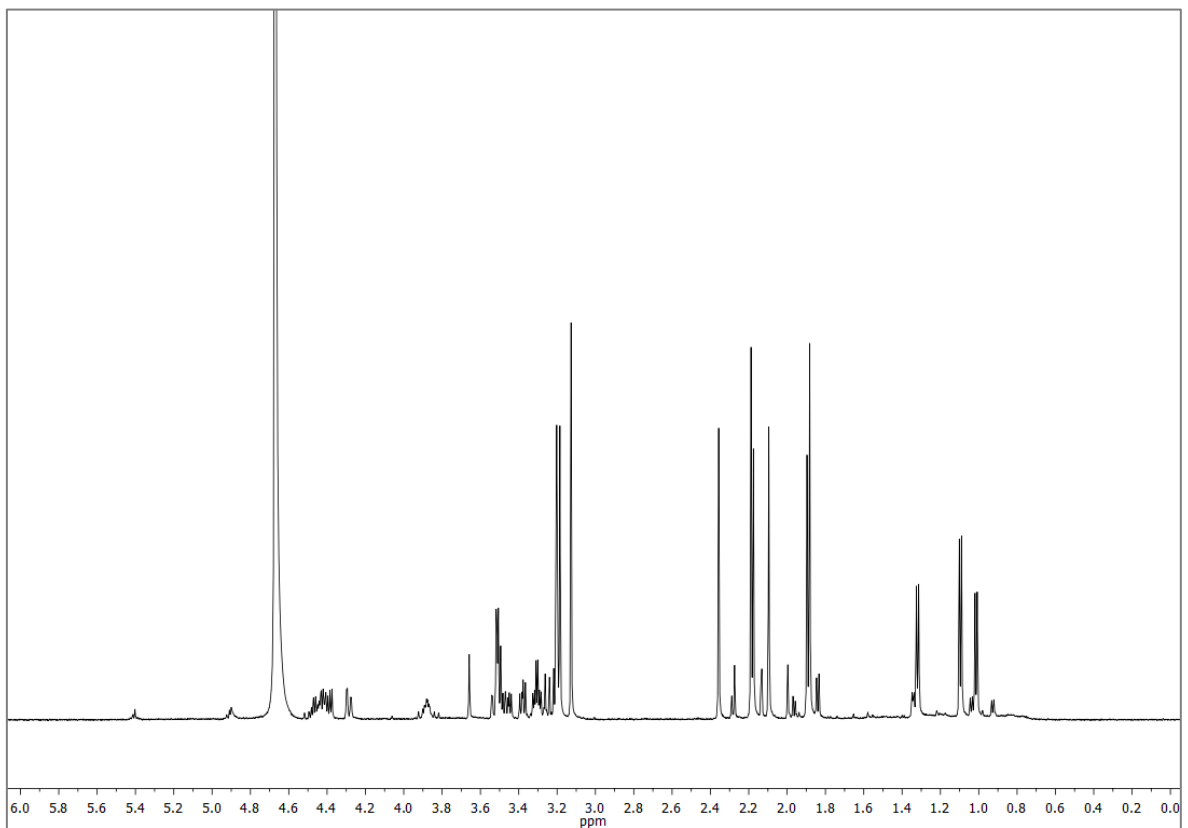
Abbildung A1.10: ^1H , Metabolit **M3B**.

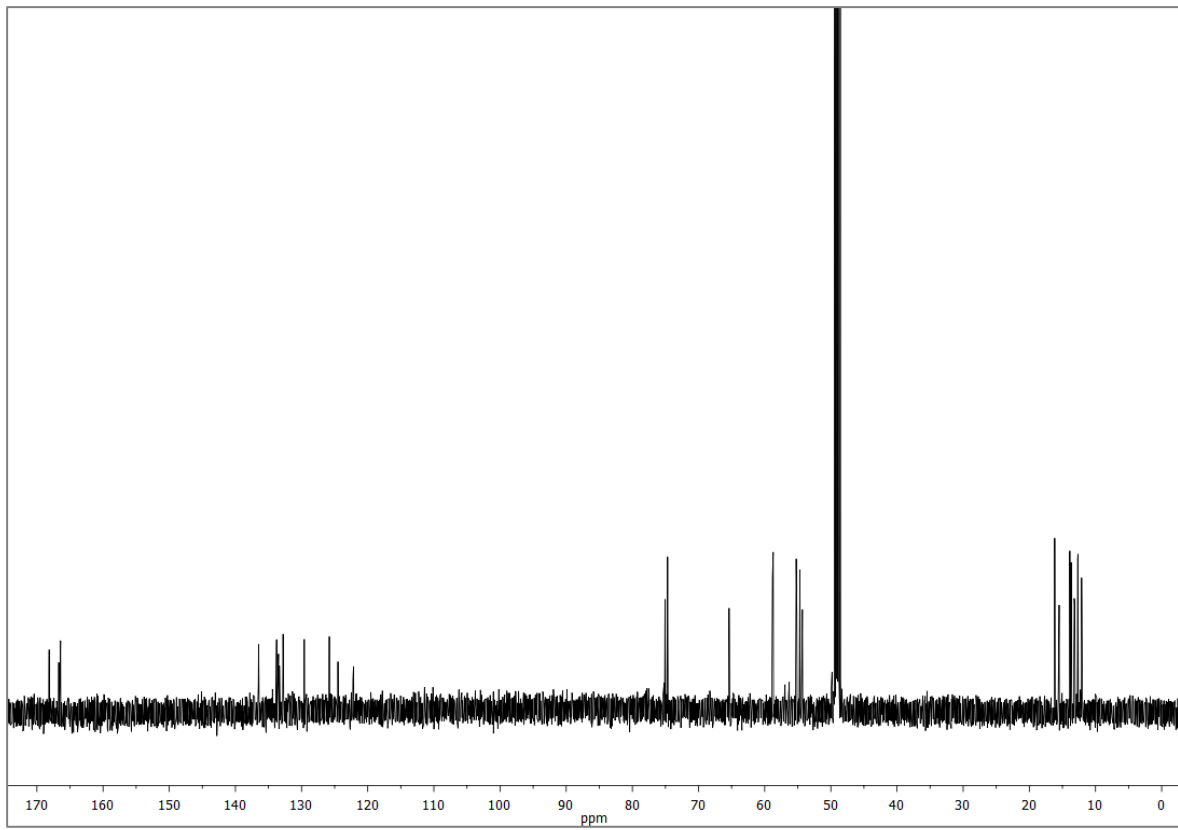
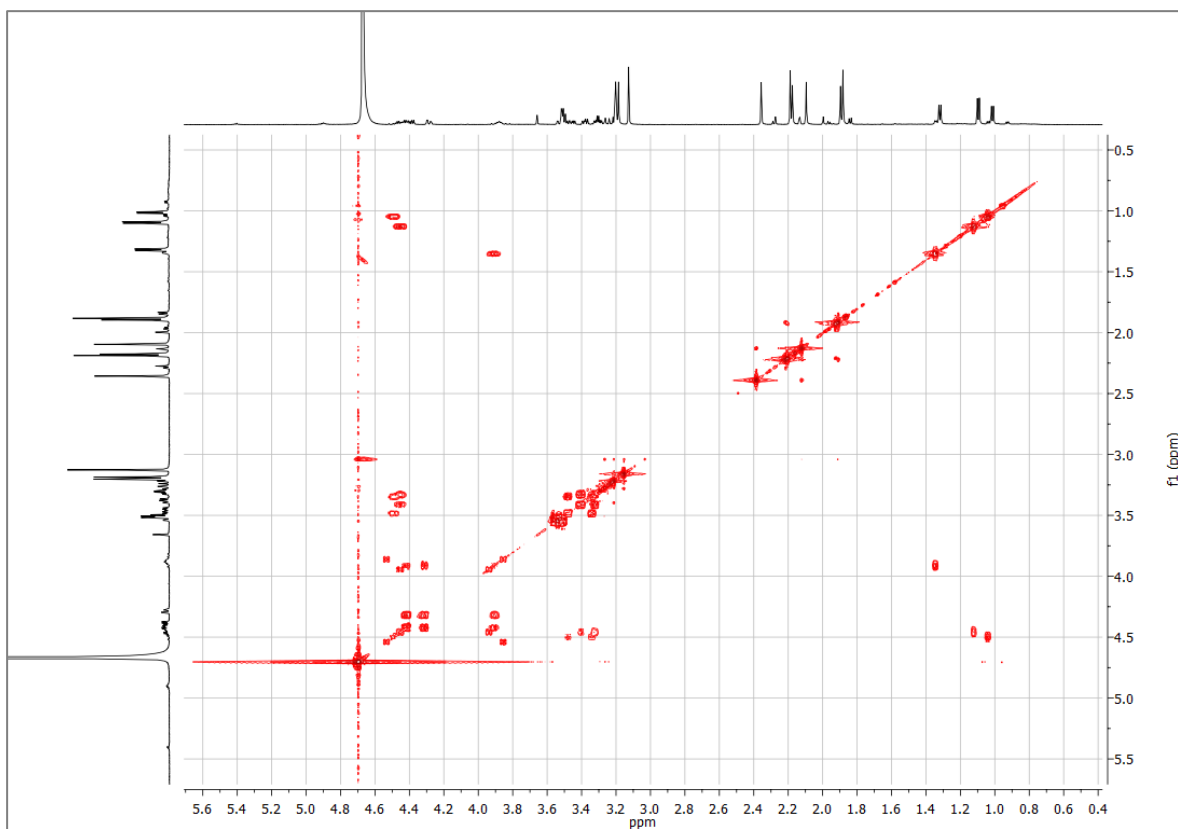
Abbildung A1.11: ^{13}C , Metabolit **M3B**.Abbildung A1.12: H,H-COSY, Metabolit **M3B**.

Metabolit M27Cl (3 Isomere):

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1), δ (ppm): 4,52-4,32 (CH, m, 7-H), 3,52–3,49 (CH₂, d, 12-H), 3,46, 3,38, 3,30 (CH₂, dd, 9-H), 3,20, 3,19 (CH₃, s, 10-H), 2,36, 2,19, 2,18 (CH₃, s, 5-H), 2,11, 1,90, 1,88 (CH₃, s, 6-H), 1,33, 1,10, 1,02 (CH₃, d, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (600 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ 9:1), δ (ppm): 168,15, 166,70, 166,43 (C-q, C-11), 136,53, 136,49, 132,74 (C-q, C-4), 133,80, 133,77, 129,58 (C-q, C-1), 1133,49, 133,34, 125,81 (C-q, C-3), 124,50, 122,16, 122,15 (CH, C-2), 75,07, 74,67 (CH₂, C-9), 58,85, 58,82, 58,71 (CH₃, C-10), 55,24, 55,14, (CH₂, C-12), 54,67, 54,30 (CH, C-7), 16,16, 15,49, 13,67 (CH₃, C-8), 13,88, 12,69, 12,66 (CH₃, C-5), 13,21, 13,16, 12,10 (CH₃, C-6).

Abbildung A1.13: ^1H , Metabolit **M27Cl**.

Abbildung A1.14: ^{13}C , Metabolit **M27Cl**.Abbildung A1.15: H,H-COSY, Metabolit **M27Cl**.

A.2 ITS-Sequenz *Irpex consors*

```
AATCGGACTTGTGCACACTTTGTTCAATTCCAATTCTCATACACCTCTGTGCACT
TTTCATAGGTTTAATGTGGAAAAGGTCTCTGGCCTTGGAAATATTAGCCTATG
TATTTACAAACGCTTTAGTTTTAGAAATGTTAATCGCGTATAACGCAATAAATAC
AACTTTTAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGG
TATTCTCAATACCCTAAATCTTTGCGGATGAGGGTGTATTGGACTTGGAGGTT
TTTGCAGGCAATATTACTTTGTCGGCTCCTCTTAAATACATTAGCAGAGATATT
ACTGCTACTCTCCAGCGTGATAATTGTCTACGCTGTTAGTAGTGCGGTATATA
AACATCTATGCTTCTAATCGT
```

Abbildung A2.1: ITS-Sequenzierung von *Irpex consors* (DSMZ-Stamm-Nr. 7382).