Bioaktive Inhaltsstoffe der Speisepilze *Pleurotus eryngii* und *Agrocybe aegerita*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Chem. Annette Meyer
geboren am 18. Februar 1981 in Göttingen

2010

Referent: Prof. Dr. Dr. Ralf. G. Berger
Korreferent: Prof. Dr. Peter Winterhalter
Tag der Promotion: 21. Dezember 2009

Hiermit erkläre ich, Annette Meyer, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Unterlagen und Arbeiten dem Wortlaut oder dem Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.
Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nicht als Masterarbeit oder ähnliche Prüfungsleistung verwendet wurde.

Annette Meyer

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen. Ich möchte einigen von ihnen an dieser Stelle explizit danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten und vielseitigen Themas und die Betreuung der Arbeit.
Herrn Dr. Ulrich Krings danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die Einführung in die Massenspektrometrie.
Herrn Prof. Dr. Peter Winterhalter, der mir die Möglichkeit gab, an seinem Institut in Braunschweig mit der Gegenstromverteilungschromatographie zu arbeiten und der freundlicherweise ein Referat übernahm, danke ich sehr herzlich.

Beim FAEN Forschungsverbund Agrar- und Ernährungswissenschaften bedanke ich mich für die Finanzierung dieses Projektes.

Ganz besonderer Dank gebührt Frau Dr. Silke Hillebrand und Herr Dr. Gerold Jerz, die mich bei meiner Arbeit in Braunschweig immer mit Tipps und sauberen Glasgeräten unterstützt haben.

Für die Aufnahme von NMR-Spektren danke ich Frau Monika Rettstadt und Frau Dagmar Körtje vom Institut für Organische Chemie. Herrn Dr. Thomas Hackl danke ich für die Einführung in die zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Für die Erstellung der Direkteinlass-EI-Massenspektren danke ich Herrn Mihail Astratov.
Für die Unterstützung bei der Durchführung des Comet-Assays bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Anaclet Ngezahayo und Frau Sabrina Schlie vom Institut für Biophysik.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit und die gute Kameradschaft.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die dieses Vorhaben immer unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 1

Abstract 2

I Einleitung 3

II Theoretischer Teil 6

II.1 Auswahl der Bioaktivitätstests 6

II.1.1 Antioxidative Assays 8
II.1.2 Inhibierung der Xanthinoxidase 10
II.1.3 Inhibierung der Cyclooxygenase 11

II.2 Basidiomyceten 13

II.2.1 *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) 13
II.2.2 *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. 14
II.2.3 *Pleurotus ostreatus* (Jaqc.: Fr.) P. Kumm. 15

III Material und Methoden 18

III.1 Bioassays 18

III.1.1 DPPH-Test 18
III.1.2 Oxygen Radical Absorbance Capacity-Test 18
III.1.3 Oxygen Radical Absorbance Capacity-Test – lipophile Variante 20
III.1.4 Xanthinoxidase-Assay 20
III.1.5 Cyclooxygenase-Assay 20
III.1.6 Comet-Assay 22

III.2 Isolierung 24

III.2.1 Probenmaterial 24
III.2.2 Extrakte für Vortests 24
III.2.3 Extraktion der Fruchtkörper von *Pleurotus eryngii* 24
III.2.4 Highspeed Countercurrent Chromatography (HSCCC) 24
III.2.5 Gaschromatographie 25

III.2.6 High Performance Liquid Chromatography 27
III.2.7 Medium Pressure Liquid Chromatography 29
III.2.8 Säulenchromatographie 29
III.2.9 Dünnschichtchromatographie 30
III.2.10 Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie 30
III.2.11 Direkteinlass-EI-MS 31
III.2.12 Extrakte von *Agrocybe aegerita* 31

III.3 Synthesen 32

III.3.1 Synthesestrategie für Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol 32
III.3.2 Synthese des Ergosterolacetats 32
III.3.3 Synthese des Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetats 33
III.3.4 Synthese des Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ols 35
III.3.5 Synthese der Derivate zur massenspektrometrischen Untersuchung 36

III.4 Kultivierung 36

III.4.1 Kulturen 36
III.4.2 Medien 37
III.4.3 Kulturführung 38

III.5 Geräte, Chemikalien und Entsorgungshinweise 40

III.5.1 Allgemeine Geräte 40
III.5.2 Chemikalien 41
III.5.3 Entsorgungshinweise 44

IV Ergebnisse und Diskussion 45

IV.1 Vorversuche 45

IV.2 Extrakte 48

IV.2.1 Extraktion von *Pleurotus eryngii* 48
IV.2.2 ORAC-Assay 49
IV.2.3 Comet-Assay 50
IV.2.4 Xanthinoxidase-Assay 51

IV.3 HSCCC-Trennung von Extrakten aus Pleurotus eryngii 53

IV.3.1 Hexan-Extrakt von *Pleurotus eryngii* 53

IV.3.2 Dichlormethan-Extrakt von *Pleurotus eryngii* 62
IV.3.3 Trenneigenschaften der HSCCC 76
IV.3.4 Unterfraktionen der HSCCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von *Pleurotus eryngii* 78

IV.4 Aktivitäten der Einzelsubstanzen 82

IV.4.1 ORAC-Assay 82
IV.4.2 COX-Assay 83

IV.5 Dichlormethan-Extrakt von Agrocybe aegerita 84

IV.6 Kultivierung 91

IV.6.1 Biomasse 91
IV.6.2 Bioaktivität 94
IV.6.3 Sterole 96

IV.7 Isolierte und identifizierte Substanzen 98

IV.8 Bioaktivitätstests 106

IV.8.1 Antioxidative Assays 106
IV.8.2 Cyclooxygenase-Assay 110
IV.8.3 Xanthinoxidase-Assay 110
IV.8.4 Aussagekraft der Bioassays auf Wirkungen *in vivo* 111

IV.9 Zusammenfassung und Ausblick 113

V Anhang 115

V.1 Chromatogramme und Massenspektren 115

V.1.1 Hexan-Extrakt von *Pleurotus eryngii* 115
V.1.2 Dichlormethan-Extrakt von *Pleurotus eryngii* 118
V.1.3 Dimethyloxazolin-Derivate 127
V.1.4 Dichlormethan-Extrakt von *Agrocybe aegerita* 129
V.1.5 Kultivierung 134
V.1.6 Synthetisierte Stoffe 135

V.2 NMR-Spektroskopie 136

V.2.1 Identifizierte Stoffe 138

V.2.2 Synthetisierte Stoffe 139

VI Verzeichnisse 144

VI.1 Abkürzungsverzeichnis 144

VI.2 Abbildungsverzeichnis 146

VI.3 Tabellenverzeichnis 150

VI.4 Literaturverzeichnis 152

Zusammenfassung

Durch ein aktivitätsgeleitetes Screening wurden aus den Extrakten der Fruchtkörper der Speisepilze *Pleurotus eryngii* (Kräuterseitling) und *Agrocybe aegerita* (Samthaube) bioaktive Substanzen isoliert. In den Aktivitätstests wurden die radikaleinfangende Wirkung mit Hilfe des Diphenylpikrylhydrazylradikals (DPPH), die antioxidative Kapazität mit dem Oxygen Radical Absorbance Capacity-Assay (ORAC) und die antioxidative Wirkung im Comet-Assay sowie die Inhibierung der Xanthinoxidase und der Cyclooxygenase-Isoenzyme untersucht.

Die Dichlormethan-Extrakte beider Basidiomyceten wurden mittels High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit GC-MS und LC-MS untersucht.

In den Fruchtkörpern von *Pleurotus eryngii* wurden die Fettsäuren Pentadecan-, Palmitin-, Öl- und Linolsäure sowie die Sterole Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (Ergosterol), Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol nachgewiesen sowie Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergosta-5,7-dien-3-ol, Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol) und Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (Cerevisterol) anhand von massenspektroskopischen Literaturdaten identifiziert. Diese Sterole wurden bisher noch nicht in *P. eryngii* beschrieben.

In *Agrocybe aegerita* wurden die Sterole Ergosterol, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergosta-5,7-dien-3-ol, Fungisterol und Cerevisterol, Ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Lichesterol), Ergosta-7,24(28)-dien-3-ol (Episterol), Ergost-8-en-3-ol und 19-Norergosta-5,7,9,22-tetraen-3-ol (Neoergosterol) sowie Lanosterol, 4-Methylfecosterol, 4,4-Dimethylfecosterol und Eburicol identifiziert. Neu für *A. aegerita* waren 4-Methylfecosterol, 4,4-Dimethylfecosterol und Eburicol, Lichesterol, Neoergosterol, Episterol und Cerevisterol. Das Vorhandensein von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol konnte durch die Synthese einer Referenzsubstanz abgesichert werden.

Die Aktivität der Sterole im ORAC-Assay und bei der Inhibierung der Cyclooxygenase wurde durch Standardsubstanzen nachgewiesen.

Schlagwörter: aktivitätsgeleitetes Screening, Mykosterole, *Pleurotus eryngii*, *Agrocybe aegerita.*

Abstract

Fruiting bodies of *Pleurotus eryngii* (king oyster mushroom) and *Agrocybe aegerita* (black poplar mushroom) were extracted and bioactive substances were detected by a bioassay guided screening. Bioassays used were radical scavenging activity by the diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH), antioxidant capacity by the oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) and antioxidative activity by the comet assay. Additionally, inhibition of xanthine oxidase and cyclooxygenase isoenzymes was measured.

Dichloromethane extracts of both basidiomycetes were fractionated by high speed countercurrent chromatography (HSCCC). Fractions were further analyzed by GC-MS and LC-MS.

Fruiting bodies of *Pleurotus eryngii* contained fatty acids (pentadecanoic, palmitic, oleic and linoleic acid) along with sterols ergosta-5,7,22-trien-3-ol (ergosterol) and ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol. Ergosta-7,22-dien-3-ol, ergosta-5,7-dien-3-ol, ergost-7-en-3-ol (fungisterol) and ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (cerevisterol) were identified by comparison with published mass spectroscopic data. All sterols were not described in *P. eryngii* so far.

The following sterols were detected in *Agrocybe aegerita:* ergosterol, ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, ergosta-7,22-dien-3-ol, ergosta-5,7-dien-3-ol, fungisterol, cerevisterol, ergosta-5,8,22-trien-3-ol (lichesterol), ergosta-7,24(28)-dien-3-ol (episterol), ergost-8-en-3-ol and 19-norergosta-5,7,9,22-tetraen-3-ol (neoergosterol) along with lanosterol, 4-methylfecosterol, 4,4-dimethylfecosterol and eburicol. 4-Methylfecosterol, 4,4-dimethylfecosterol, eburicol, lichesterol, neoergosterol, episterol and cerevisterol were new in *A. aegerita*. Furthermore, the existence of ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol was established by a synthesized reference substance.

Activity of sterols in the ORAC assay and inhibition of cyclooxygenase was proven by reference substances.

Keywords: bioassay-guided screening, mycosterols, *Pleurotus eryngii*, *Agrocybe aegerita*

I Einleitung

Speisepilze werden schon seit Jahrtausenden vom Menschen als Nahrungs-, Genuss- und Heilmittel verwendet. Sie sind aufgrund ihres Aromareichtums als kulinarische Delikatesse anerkannt und wegen ihres hohen Protein- und Ballaststoffgehaltes sowie ihres niedrigen kalorischen Brennwertes ein ernährungsphysiologisch empfehlenswertes Nahrungsmittel.

Im asiatischen Raum besteht eine lange Tradition, Pilze als Heilmittel zu nutzen. Dort wird auch zwischen medizinischen und kulinarischen Pilzen unterschieden. Ein weit verbreiteter und gut beforschter Heilpilz ist *Ganoderma lucidum*, der Glänzende Lackporling. Das Triterpen Ganoderiol F (Abbildung I.1) aus diesem Pilz besitzt Wirksamkeit gegen das HI-Virus. *Australic Acid* besitzt zytotoxische Wirksamkeit. Verschiedene Ganodersäuren besitzen hepatoprotektive, entzündungshemmende und antioxidative Eigenschaften. Polysaccharide aus dem Fruchtkörper von *G. lucidum* werden als „Ganopoly“ im asiatischen Raum vermarktet und führten in einer klinischen Studie zu einer Verbesserung der Lebensqualität bei fortgeschrittenem Lungenkrebs [1, 2].

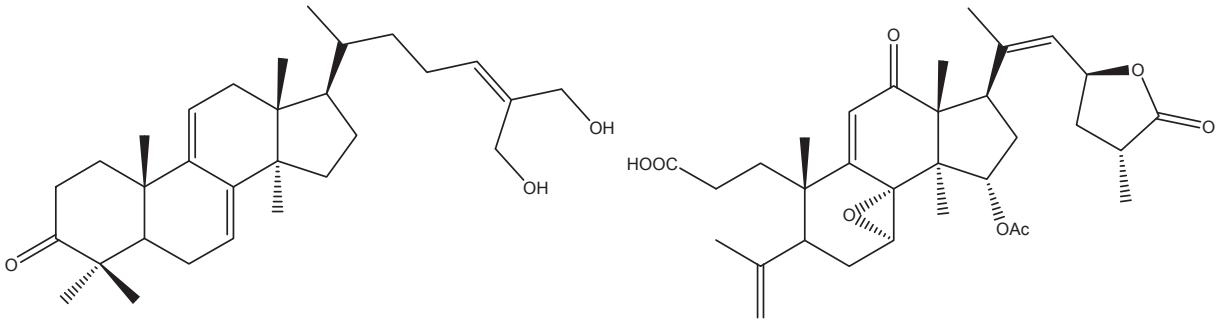

Abbildung I.1 Ganoderiol F (links) und *Australic Acid* (rechts) aus *Ganoderma lucidum*.

Den Fruchtkörpern des Speisepilzes *Lentinus edodes* (Shiitake) werden unter anderem antibakterielle, antivirale, den Blutzucker und das Immunsystem modulierende und den Cholesterinwert senkende Eigenschaften zugesprochen [3]. Er soll krebshemmende bzw. krebsheilende Eigenschaften haben und ein Stärkungsmittel für Niere und Leber sein, außerdem die Auswirkungen von Stress reduzieren und aphrodisierende Wirkungen besitzen. Diese Wirkungen können beim Shiitake-Pilz auf verschiedene Inhaltsstoffe zurückgeführt werden: Eritadenin ist für

eine cholesterinsenkende Wirkung, die auch am Menschen nachgewiesen wurde [4], verantwortlich, während ein β-D-Glucan namens Lentinan für die krebshemmende Wirkung verantwortlich ist [5] (Abbildung I.2).

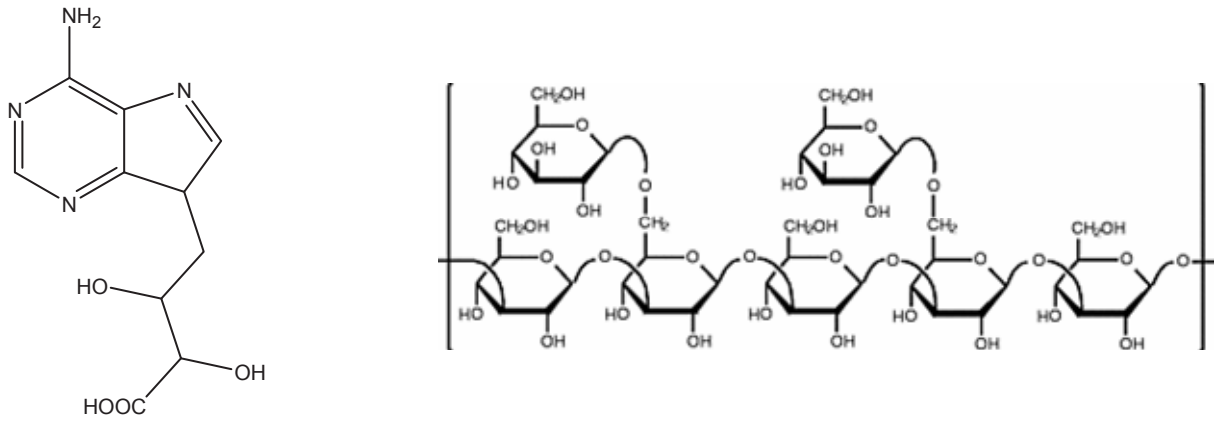

Abbildung I.2 Eritadenin (links) und Lentinan (rechts).

Viele europäische Speisepilze sind noch wenig erforscht, aber es steht zu vermuten, dass auch heimische Pilze bioaktive Inhaltsstoffe enthalten, die dem Auftreten von Krankheiten und deren Vorstufen vorbeugen oder auch zu Behandlung eingesetzt werden können. Im Sinne einer vorbeugenden Wirkung können solche Substanzen auch als „gesundheitsfördernd“ bezeichnet werden.

In dieser Arbeit sollen bioaktive Stoffe mit Hilfe einer aktivitätsgeleiteten Fraktionierung identifiziert werden. Die zu untersuchenden Fruchtkörper werden dazu nach einem Zellaufschluss extrahiert. Die gewonnenen Extrakte werden in verschiedene Aktivitätstest (Bioassays) eingeschleust und die aktiven Extrakte weiter gereinigt. Die daraus erhaltenen Fraktionen und Unterfraktionen werden immer wieder in den Bioassays getestet, bis schließlich aktive Einzelsubstanzen übrig bleiben (vgl. Abbildung I.3).

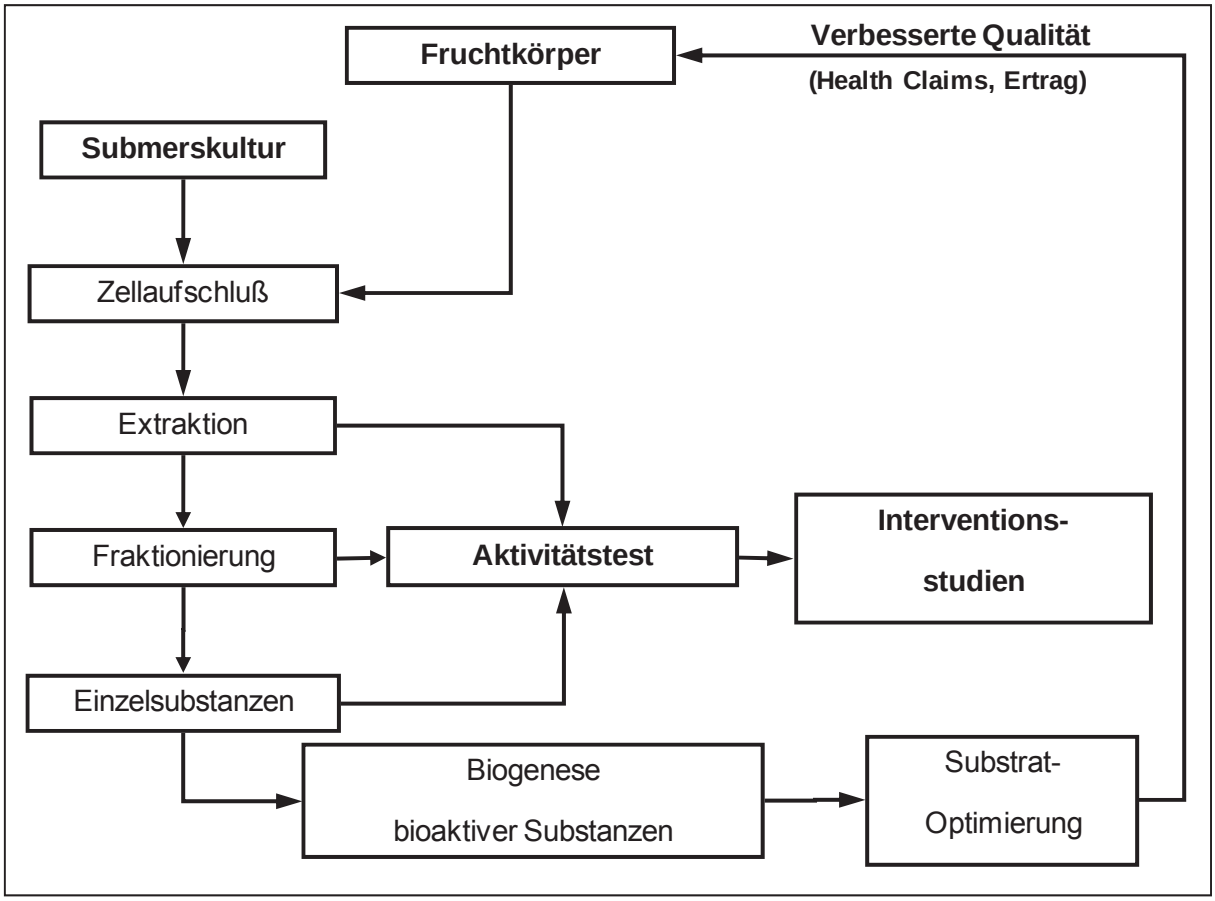

Abbildung I.3 Schema der Arbeitsgänge des Projektes.

Die Biogenese der aktiven Einzelsubstanzen wird anschließend untersucht und zur Optimierung des Substrates bei der Pilzzucht eingesetzt. Ganze Pilze, Extrakte oder Einzelsubstanzen werden von einer weiteren Arbeitsgruppe in einer Interventionsstudie auf ihre Wirksamkeit *in vivo* beim Menschen überprüft. Am Ende des Projektes soll ein Pilz stehen, der dem Erzeuger nicht nur eine bessere Ernte, sondern auch über die *in vivo* nachgewiesenen gesundheitsfördernden Eigenschaften eine bessere Vermarktung ermöglicht.

Als Untersuchungsobjekte wurden die Basidiomyceten *Pleurotus eryngii* (Kräuterseitling), *Agrocybe aegerita* (Samthaube) und *Pleurotus ostreatus* (Austernseitling) ausgewählt. Diese Pilze sind kulinarisch geschätzte Edelpilze und werden kommerziell in Deutschland angebaut, so dass sie in gleichbleibender Qualität jahreszeitenunabhängig untersucht werden können.

II Theoretischer Teil

In diesem Abschnitt werden kurz die Auswahlkriterien der Bioassays skizziert und anschließend die biologischen Testsysteme und die untersuchten Pilze kurz vorgestellt.

II.1 Auswahl der Bioaktivitätstests

Die Bioaktivitätstests wurden in enger Abstimmung mit dem Institut für Lebensmittelwissenschaften und Ökotrophologie der Leibniz Universität Hannover ausgewählt und mussten folgende Kriterien erfüllen:

- Das untersuchte System musste eine Relevanz für die menschliche Gesundheit haben.
- Das untersuchte System musste Aussagekraft für den menschlichen Stoffwechsel besitzen. Das Ziel(enzym) des Assays musste in medizinischen Labors routinemäßig bestimmt werden können, um spätere Humanstudien zu ermöglichen.
- Die bei einem bestimmten Assay zu erwartenden aktiven Verbindungen mussten im menschlichen Körper resorbierbar sein, um Effekte an Menschen nicht von vornherein unbeobachtbar zu machen.
- Der Test durfte nicht ein Stoffwechselsystem involvieren, das in späteren Humanstudien nur an kranken Personen wie z.B. Diabetikern untersucht werden konnte, denen keine optimale Behandlung während der Studie gewährt werden konnte.
- Der Assay sollte *in vitro* erfolgen und kein Tierversuch sein. Er durfte nicht Techniken wie z.B. Szintillationsmessungen erfordern, die zu zeitintensiv waren.
- Der Test musste aus leicht herstellbaren oder käuflichen Komponenten bestehen.

Weil antioxidative Tests in der Literatur weit verbreitet und häufig einfach durchzuführen sind, wurden einige antioxidative Tests ausgewählt [6-12]. Die Kombination verschiedener antioxidativer Assays kann dabei ein umfassendes Licht

auf die antioxidativen Eigenschaften werfen, die sich aus Radikal einfangenden, chelatisierenden und reduzierenden Wirkungen zusammensetzen. Als Testsysteme wurden der Oxygen Radical Absorbance Capacity-Test (ORAC) und der Diphenylpikrylhydrazyl-Test (DPPH) ausgewählt, weil beide Assays auch mit lipophilen, nur schlecht wasserlöslichen Substanzen durchführbar waren. Um einen Ausblick auf die Wirkung *in vivo* zu haben, wurde ein zellbasierter Assay (Comet-Assay) eingesetzt.

Nach einer weiteren intensiven Literaturrecherche wurden einige realisierbare enzymbasierte Bioassays identifiziert: Dazu gehörte u.a. die Inhibierung des Angiotensin Converting Enzyme (ACE) [13, 14], das an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist. Die Inhibierung verschiedener Enzyme, die Entzündungssymptome hervorrufen (Cyclooxygenase I und II, 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase, Interleukin-1β Converting Enzyme, Adenosin-Kinase, Griess-Assay), wurde ebenfalls erwogen [15-23]. Des Weiteren wurde die Inhibierung der HMG-CoA-Reduktase (Schlüsselenzyms der Cholesterolbiosynthese) [24, 25] und der Acyl-CoA:Cholesterol-O-Acyltransferase (ACAT) [26] sowie die Inhibierung der Xanthinoxidase (Schlüsselenzym des Purinstoffwechsels) [27-29], der Aldose-Reduktase (Enzym des Polyol-Wegs der Zucker) [30-32] und der Tyrosinase (Enzym der Hautpigmentierung) [33, 34] in Betracht gezogen. Zusätzlich wurden auch mikrobielle Ziele wie die Inhibierung der Aspartyl-Semialdehyd-Dehydrogenase aus *Helicobacter pylori*, dem Erreger vieler Magengeschwüre, diskutiert [34].

Die Inhibierung des ACE schied aus, weil in der Literatur gezeigt wurde, dass häufig die aktiven Verbindungen Peptide waren – und eine mangelhafte Resorption dieser Peptide *in vivo* erfolgte [35]. Somit wäre eine Studie an Menschen von vornherein zum Scheitern verurteilt gewesen.

Die 3α-Hydroxysteroid-Dehydrogenase schied dagegen aus, weil sie nicht kommerziell verfügbar war, während beim Griess-Assay die Makrophagen-Kultivierung nicht möglich war.

Die Wirksamkeit eines Aldose-Reduktase-Hemmers hätte aus ethischen Gründen nicht an Menschen untersucht werden können, weil dies nur bei schlecht auf Insulin eingestellten Diabetikern beobachtbar gewesen wäre.

Die Tyrosinase war lediglich in kosmetischer, aber nicht in pharmakologischer Hinsicht ein interessantes Enzym.
Von den vielen möglichen Angriffsstellen im Entzündungsprozess wurde die Cyclooxygenase ausgewählt, weil sie eine Schlüsselstelle in der Prostaglandinbiosynthese besetzt und der Angriffspunkt vieler nicht-steroidaler Analgetika ist.
Die folgenden Assays wurden ausgewählt und etabliert:

- Antioxidative Assays: Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), Diphenylpikrylhydrazylradikal (DPPH), Comet-Assay
- Purinstoffwechsel: Xanthinoxidase (XOD)
- Entzündungshemmende Wirkung: Cyclooxygenase I und II (COX)

II.1.1 Antioxidative Assays

Da bei vielen Krankheitsbildern oxidierte Verbindungen eine Rolle spielen, werden antioxidativ wirksamen Substanzen vielfach gesundheitsfördernde Eigenschaften zugesprochen. Sie sollen antikanzerogen wirken, das Altern verlangsamen und unter anderem vor Arteriosklerose, Diabetes und chronischen Entzündungen bewahren [6, 36-38].

II.1.1.1 DPPH-Radikal

Das Diphenylpikrylhydrazylradikal ist tiefviolett gefärbt (λ_{max} = 517 nm). Es wird beim Assay zum gelb gefärbten Hydrazin reduziert (Abbildung II.1) [39].

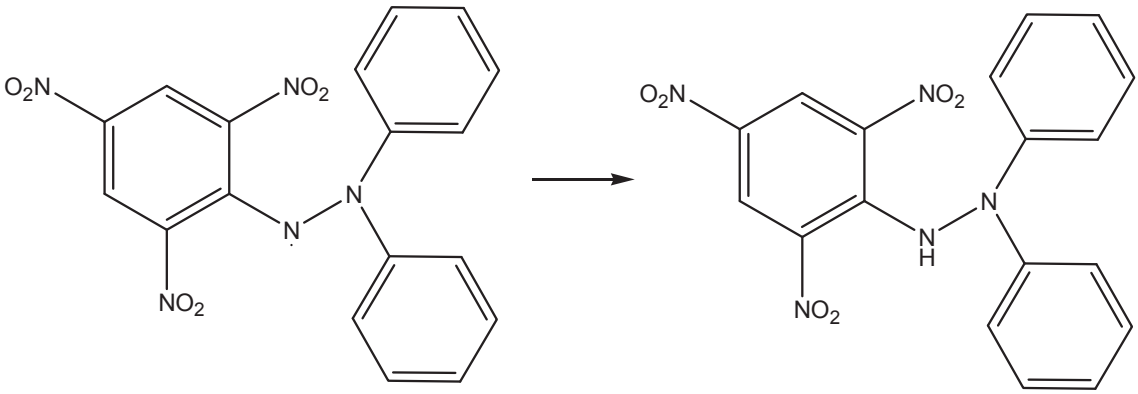

Abbildung II.1 Reaktion des DPPH-Radikals

Entgegen früherer Annahmen, dass es sich bei dieser Reaktion um einen direkten Wasserstofftransfer z.B. von einem Phenol auf das DPPH-Molekül handelt [39], wird inzwischen davon ausgegangen, dass es mehrere Reaktionswege gibt. In den häufig angewendeten alkoholischen Lösungen liegt hauptsächlich ein schneller Elektronentransfer vor [6, 40]. Dies muss beachtet werden, wenn die Aussagen des DPPH-Assays auf andere antioxidative Systeme übertragen werden sollen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass das Radikal keine strukturelle Ähnlichkeit mit den häufig *in vivo* auftretenden Peroxyl- oder Hydroxylradikalen hat. Es ist sterisch sehr gehindert, so dass sich größere Moleküle als inert erweisen können. Rückschlüsse auf Wirkungen *in vivo* sind nur eingeschränkt möglich.
Weil das Radikal stabil und käuflich ist und weil es durch seine intensive Färbung leicht messbar ist, ist der DPPH-Assay dennoch einer der am häufigsten angewandten antioxidativen Tests [6, 37].

II.1.1.2 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

Beim Oxygen Radical Absorbance Capacity-Assay sorgt ein stetiger Strom von *in situ* generierten Peroxylradikalen für ein Abnehmen der Fluoreszenz eines Zielmoleküls. Bei Anwesenheit eines Antioxidans bleibt die Fluoreszenz noch eine Zeit lang erhalten. Die Fluoreszenz wird typischerweise über 80 min gemessen, so dass Antioxidantien mit und ohne Latenzphase gemessen werden können. Durch die Verwendung von Cyclodextrinen als Lösevermittler können hydrophile und lipophile Substanzen in diesem System vermessen werden [7, 12].
Dieser Assay wird vor allem im nordamerikanischen Markt dazu genutzt, die antioxidativen Kapazitäten verschiedener Lebens- und Nahrungsergänzungsmittel zu vergleichen und zu bewerben [41, 42].

II.1.1.3 Comet-Assay

Die Comet-Assay ist ein zellbasierter Assay, der zur Beurteilung von zytotoxischen [43] und antioxidativen Eigenschaften [44, 45] eingesetzt werden kann. Die Zellen (z.B. Endothel- und Muskelzellen oder Vollblut) werden mit dem zu untersuchenden Stoff behandelt. Zur Messung der antioxidativen Eigenschaften werden anschließend die Zellen mit Wasserstoffperoxid oder einem anderen Zellgift versetzt. Nach einer Lyse und Einzelzellelektrophorese kann das Ausmaß der Schädigung im Vergleich zu einer Kontrolle bewertet werden. Je nachdem ob die Elektrophorese mit

neutralem oder alkalischem Puffer durchgeführt wird, kann zwischen Einzel- und Doppelstrangbrüchen unterschieden werden.

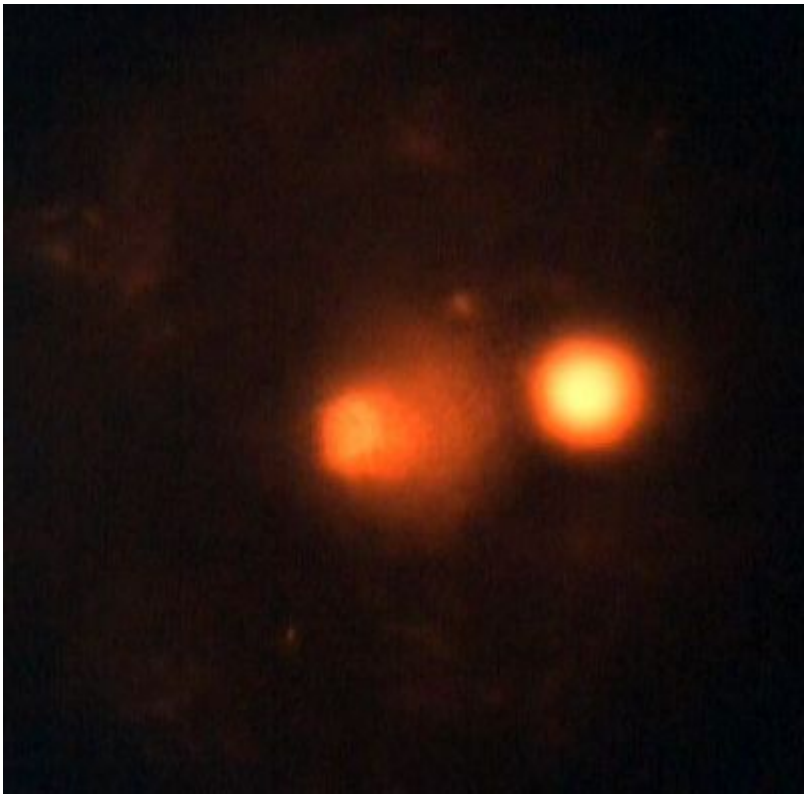

Abbildung II.2 Stark (links) und wenig (rechts) geschädigte Zelle im Comet-Assay.

Dieser Test ist sehr aufwändig, da eine breite statistische Basis zur Auswertung geschaffen werden muss. Die Proben werden in der Regel auf mindestens drei Petrischalen getestet, aus denen jeweils drei Objektträger beschichtet werden. Von jedem Objektträger werden hundert Zellen ausgewertet, so dass für eine Probe in einer Konzentration ohne dazugehörige Kontrollen 900 Fotos ausgewertet werden müssen. Trotz dieses hohen Aufwands wird dieser Test häufig angewandt, denn durch den Einsatz lebender Zellen kann besser als mit reinen *in vitro* Tests auf mögliche Wirkungen *in vivo* geschlossen werden.

II.1.2 Inhibierung der Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidase ist ein wichtiges Enzym im Purinstoffwechsel. Es katalysiert die Umsetzung von Xanthin zu Harnsäure (Abbildung II.3).

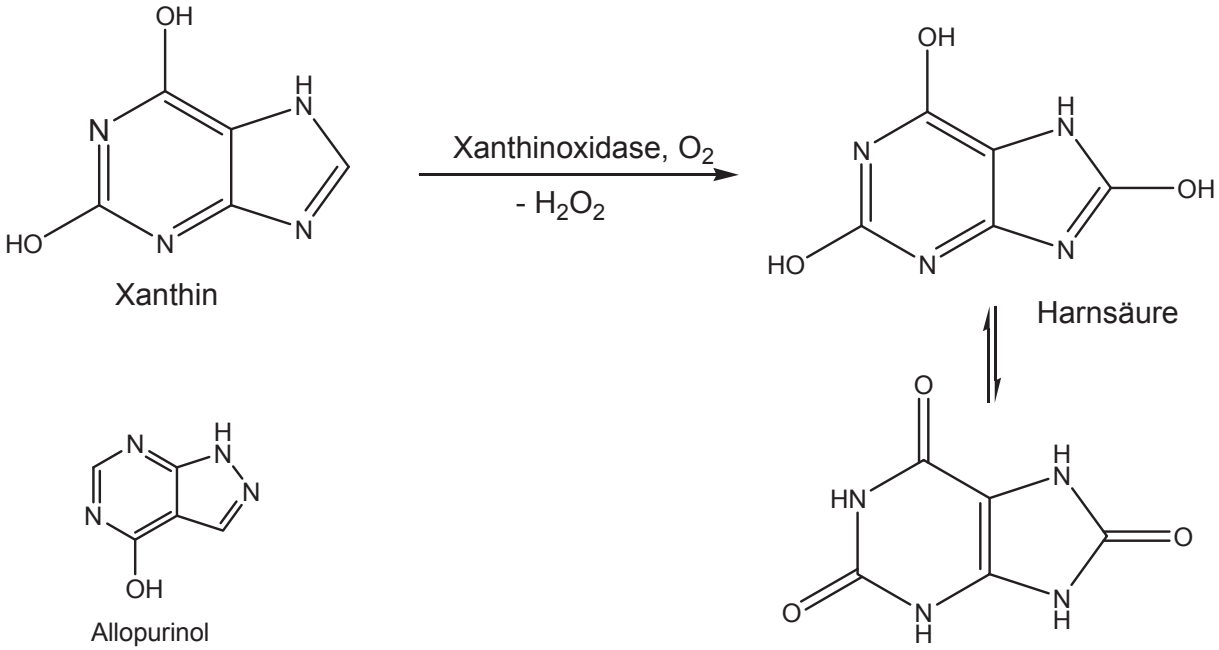

Abbildung II.3 Umsetzung von Xanthin durch Xanthinoxidase und Struktur von Allopurinol.

Steigt der Harnsäurespiegel im Blut stark an, kann Harnsäure in den Gelenken auskristallisieren und schmerzhafte Gichtanfälle auslösen. Wiederholte Anfälle können zu Arthritis in den betroffenen Gelenken führen. Die Ursache für den Anstieg kann eine Störung der Harnsäureausscheidung in der Niere, aber auch eine Überproduktion von Harnsäure sein. Ein akuter Gichtanfall kann durch eine purinreiche Ernährung ausgelöst werden [46]. Er wird meist mit entzündungshemmenden Medikamenten behandelt. Zur Dauerbehandlung dienen Urikosurika, die die Harnsäureausscheidung steigern, oder Urikostatika, die die Xanthinoxidase hemmen. Bisher ist nur ein kommerziell genutztes Urikostatikum bekannt, der Xanthinoxidase-Inhibitor Allopurinol (1*H*-Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-ol, vgl. Abbildung II.3 unten links).

II.1.3 Inhibierung der Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase (COX) ist das Schlüsselenzym der Prostaglandinbiosynthese. Sie katalysiert die Umsetzung von Arachidonsäure in PGH_2 (Abbildung II.4) [47]. Dazu verfügt sie über zwei aktive Zentren, die zuerst die Cyclisierung und danach eine Reduktion ermöglichen.

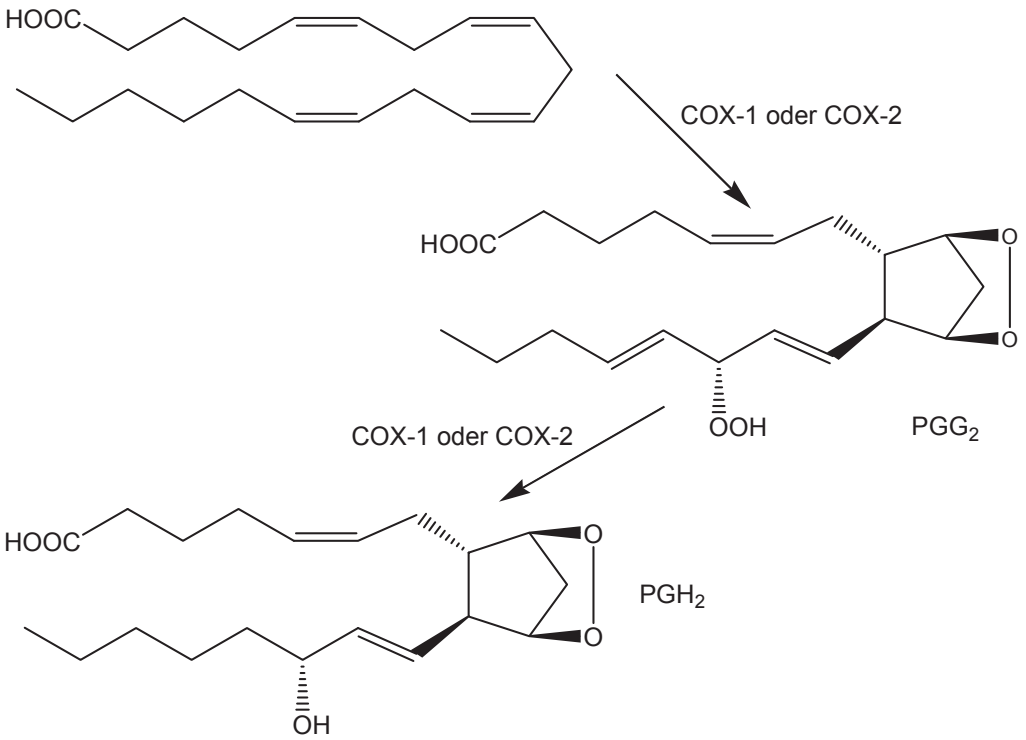

Abbildung II.4 Umwandlung von Arachidonsäure zu PGH_2 in der Prostaglandinbiosynthese.

Von der Cyclooxygenase existieren zwei Isoenzyme. COX I ist im gesunden Zustand das vorherrschende Enzym, während bei Entzündungsprozessen COX II aktiv wird. Werden diese Entzündungen chronisch, so sind selektive COX II-Inhibitoren sinnvoll, um die normalen Stoffwechselprozesse nicht zu beeinträchtigen [47]. Bekannte COX-Hemmer sind Aspirin (Acetylsalicylsäure), Naproxen ((*S*)-2-(6-Methoxy-2-naphthyl)propionsäure) und Celecoxib (4-(5-p-Tolyl-3-trifluoromethyl-pyrazol-1-yl)-benzensulfonamid), von denen nur Celecoxib selektiv auf die COX II wirkt (Abbildung II.5).

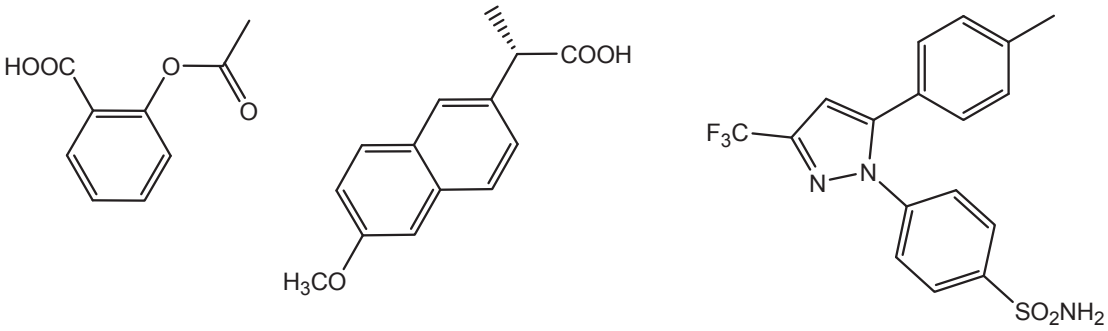

Abbildung II.5 Aspirin, Naproxen und Celecoxib (von links nach rechts).

Will man auf inhibierende Eigenschaften testen, ist es zweckmäßig, die Inhibierung der Cyclisierung zu betrachten, da die Inhibierung der Reduktion durch reduzierend wirkende Probensubstanzen aufgehoben werden kann.

II.2 Basidiomyceten

II.2.1 *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.)

Der Kräuterseitling *Pleurotus eryngii* gehört in die Klasse der *Basidiomyceten* (Ständerpilze). Er gehört der Unterklasse der *Agaricomycetidae* (Hutpilze) und der Ordnung der *Agaricales* (Blätterpilze) an. In der Familie der *Pleurotaceae* (Seitlingsartige) ist er in die Gattung der *Pleurotus* (Seitlinge) einzuordnen.
Seinen Namen erhielt *P. eryngii* von einer seiner Wirtspflanzen, dem Mannstreu (*Eryngium*) [48], auf welchem er als Wurzelparasit in baumloser Steppe lebt [49]. Er kommt auch auf anderen Doldengewächsen vor und gilt als guter Speisepilz [48, 49].

Abbildung II.6 *Pleurotus eryngii* aus agroindustriellem Anbau.

In der kommerziellen Produktion wird der Kräuterseitling meist auf Sägespänen und Weizenstrohschäben gezüchtet, es wurden aber auch andere Substrate getestet [50].
Aus *P. eryngii* wurde bisher u.a. ein Hemolysin [51] und einige Ceramide [52] isoliert. Außerdem existiert eine Studie zum Einfluss eines Heißwasserextraktes auf die Aktivität verschiedener Marker im Knochenmetabolismus. Bei den an Osteoporose leidenden Ratten wurde der Abbau der Spongiosa durch die Gabe des Extrakts vermindert [53].

II.2.2 *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing.

Die Samthaube *Agrocybe aegerita* (*Agrocybe cylindracea* (DC.: Fr.), *Pholiota cylindracea* (DC. ex Fr.); *Pholiota aegerita*, Südlicher Pappelschüppling, Südlicher Ackerling, Toskana-Pilz, Piopino) [54] gehört wie *P. eryngii* der Ordnung der *Agaricales* (Blätterpilze) an. Dort gehört sie zur Familie der *Bolbitiaceae* (Mistpilzartige) in der Gattung der *Agrocybe* (Ackerlinge).

Abbildung II.7 *Agrocybe aegerita* auf Anzuchtbeutel.

Samthauben sind sehr wärmeliebend und treten in Mitteleuropa eher selten auf [55]. Sie wachsen auf Pappeln oder Pappelstrünken, selten auch auf anderen Laubbäumen. Wegen ihres starken Waldpilzaromas sind Samthauben sehr begehrte Speisepilze, die schon von den Römern kultiviert wurden.

In China werden Extrakten aus *A. aegerita* antioxidative und alterungsverzögernde Effekte zugeschrieben, die durch Experimente an Fruchtfliegen gestützt wurden [56].

Aus der Submerskultur von *A. aegerita* wurden bereits zu Beginn der 1990er Jahre Sesquiterpendiole mit fungizider Wirkung auf *Candida spp.* isoliert. Es handelte sich dabei um Substanzen mit einem Illudin-Grundgerüst [57]. In neuerer Zeit wurden die Cyclooxygenase inhibierenden Eigenschaften der Fruchtkörper untersucht, und Ergosterol, Ergosterolperoxid sowie eine Fettsäurefraktion als Inhibitoren identifiziert.

Diese Verbindungen zeigten auch antioxidative Eigenschaften bei der Oxidation von Liposomen [23].

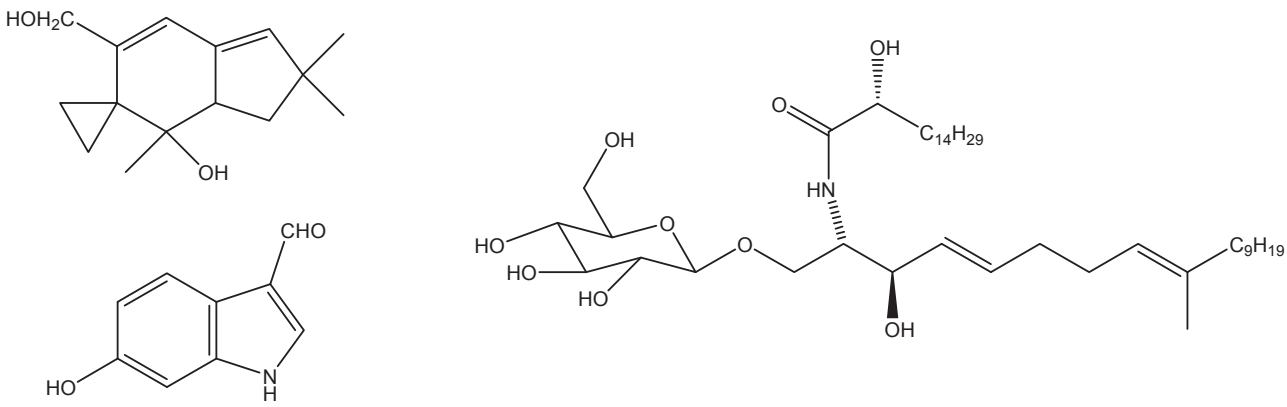

Abbildung II.8 Ein Illudin aus [57] (oben links), ein Indol aus [58] (unten links) und das Ceramid aus [59] (rechts).

Ein Ceramid aus *A. aegerita* zeigte ebenfalls COX inhibierende Eigenschaften und hemmte zusätzlich das Wachstum einiger Tumorzelllinien *in vitro* [59]. Aus den Fruchtkörpern wurden auch zwei schwach antioxidativ wirksame Indole isoliert [58], ein fungizid wirkendes Peptid (Agrocybin) [60] und ein Glucan, das in Mäusen hypoglykämisch wirkte [61].

II.2.3 *Pleurotus ostreatus* (Jaqc.: Fr.) P. Kumm.

Der Austernseitling *Pleurotus ostreatus* (Austernpilz, Kalbfleischpilz) wird wie *P. eryngii* in die Gattung der Seitlinge (*Pleurotus*) eingeordnet. Seinen Namen verdankt der Austernpilz seinem muschelförmigen Hut (*ostrea* (lat.) = Auster, Muschel) [48].

Der Fruchtkörper hat einen dunkelgrauen bis hellbraunen, fünf bis fünfzehn Zentimeter großen und fleischigen Hut. Das Fleisch ist weiß und hat einen angenehm milden Geruch und Geschmack, ältere Fruchtkörper werden jedoch zäh. Der Austernpilz ist ein schmackhafter, leicht zu züchtender Speisepilz [55]. Mit einem Brennwert 47 kJ pro 100 g, einem hohen Anteil Zink (866 µg pro 100 g) und Kalium (254 mg pro 100 g) ist er ein ernährungsphysiologisch wertvolles Lebensmittel [62].

Die Kultivierung erfolgt meist auf Stroh, Weizenschäben oder ähnlichen Nebenströmen aus der Landwirtschaft. Das Substrat wird in Plastiksäcke verpackt und gewässert. Eine Fermentation mit Milchsäurebakterien kann durch die

Absenkung des pH-Wertes eine Infektion mit Schimmelpilzen verhindern, ohne dass durch die Anwendung von Fungiziden das Wachstum von *P. ostreatus* gehemmt wird [63]. Nach dem Beimpfen durchwächst das Myzel das Substrat. Die Fruktifikation wird durch einen höheren Kohlenstoffdioxidgehalt gefördert und durch einen Lichtreiz ausgelöst.

Abbildung II.9 *Pleurotus ostreatus* (aus [64], S. 282)

In der Natur kommt der Pilz vor allem auf toten Stümpfen und Stämmen von Laubbäumen vor, befällt manchmal aber auch lebendes Holz und erzeugt dort Weißfäule [65].

Der Austernpilz ist der Pilz, der die größten Erntemengen unter den hier vorgestellten aufweist. Es gibt eine Vielzahl von Publikationen zu den Wirkungen seiner Extrakte, zu seinen Inhaltsstoffen, Aromastoffen, seiner Kultivierung, seiner Enzymausstattung und zu möglichen industriellen Anwendungsgebieten.

Mit *P. ostreatus* sowie mit daraus isoliertem β-Glucan wurde eine Fütterungsstudie an Ratten durchgeführt, bei denen bei Gabe des ganzen Pilzes, nicht aber bei Gabe des isolierten β-Glucans, der Cholesterolgehalt in Leber und Serum sank [66]. Ein β-Glucan (Pleuran) wurde auch in einer anderen Studie als Lebensmittelzusatz in einem Joghurt getestet und da die sensorische Qualität gut blieb, erwarteten die

Autoren eine baldige industrielle Anwendung dieses Produktes, das zu Verminderung wiederkehrender und chronischer sowie onkologischer und Autoimmun-Erkrankungen führen soll [67].

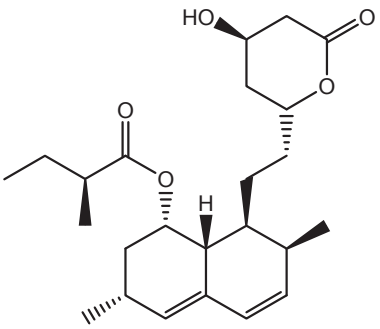

Abbildung II.10 Mevinolin.

Als Einzelstoff ist insbesondere Mevinolin (Lovastatin, Abbildung II.10) bekannt, das in vielen *Pleurotus spp*. zu finden ist. Mevinolin inhibiert die Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase und wird daher auch in der Medizin zur Hemmung der Cholesterolbiosynthese eingesetzt wird [68, 69].

Aus *P. ostreatus* wurden auch ein Lektin mit starker Aktivität gegen Hepatome und Sarkome isoliert [70].

III Material und Methoden

III.1 Bioassays

Für alle Bioassays mit Ausnahme des Comet-Assays wird ein Mikrotiterplattenlesegerät Synergy 2 (BioTek, Winooski, Vermont, USA), ausgestattet mit der Gen5-Software, verwendet. Als Werte werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Die Standardabweichung wird nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Formel 1 s: Standardabweichung, x_i: Messwert, $\bar{x}$: Mittelwert, n: Anzahl der Messwerte

III.1.1 DPPH-Test

Reagenzien: Ethanol, 96%, unvergällt
Diphenylpikrylhydrazyl-Radikal (DPPH), 1,65 mM in Ethanol
Butylhydroxyanisol (BHA), 55 µM bis 1320 µM in Ethanol

Das Mikrotiterplattenlesegerät wird vor jeder Messreihe auf 37 °C vorgewärmt. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden 200 µL des DPPH-Reagenzes pipettiert, für 10 min inkubiert und die Absorption wird bei 517 nm gemessen. 50 µL Probenflüssigkeit oder Standards werden hinzufügt und die Abnahme der Extinktion bei 517 nm über 30 min verfolgt. Es wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt.
Die Absorptionsdifferenz zwischen erster und letzter Messung wird gebildet und eine Regression der Werte durchgeführt. Die radikaleinfangende Kraft wird als BHA-Äquivalente (BHA-E) in µM angegeben.

III.1.2 Oxygen Radical Absorbance Capacity-Test

Reagenzien: Ethanol, 96%, unvergällt
Phosphatpuffer 75 mM, pH 7,4
Fluorescein-dinatriumsalz, 117 nM in Puffer

6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox), 1 bis 8 µM in Puffer

2,2'-Azobis(2-methylpropionamidin)dihydrochlorid (AAPH), 40 mM in Puffer

Das Mikrotiterplattengerät wird auf 37°C vorgewärmt. Die Wells der Zeilen A und H sowie der Spalten 1 und 12 werden mit 300 µL Wasser gefüllt (Tabelle III-1).

Tabelle III-1 Platten-Layout des ORAC-Testes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O
B	H_2O	BLK	Trolox 1µM	Trolox 3µM	Trolox 6µM	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	H_2O
C	H_2O	BLK	Trolox 1µM	Trolox 3µM	Trolox 6µM	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	H_2O
D	H_2O	BLK	Trolox 1µM	Trolox 3µM	Trolox 6µM	SPL1	SPL3	SPL5	SPL7	SPL9	SPL11	H_2O
E	H_2O	CTL	Trolox 2µM	Trolox 4µM	Trolox 8µM	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	H_2O
F	H_2O	CTL	Trolox 2µM	Trolox 4µM	Trolox 8µM	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	H_2O
G	H_2O	CTL	Trolox 2µM	Trolox 4µM	Trolox 8µM	SPL2	SPL4	SPL6	SPL8	SPL10	SPL12	H_2O
H	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O

Die restlichen Näpfchen werden mit 120 µL Fluorescein-Lösung gefüllt und mit 20 µL Probe (c = 0,1 mg mL^{-1} in Ethanol) versetzt und für 15 min inkubiert. 60 µL AAPH-Lösung werden hinzugeben und über 80 min die Veränderung der Fluoreszenz (Exzitation 485 nm, Emission 520 nm) gemessen. Die Mikrotiterplatte wird dazu einige Sekunden geschüttelt und danach jede Minute ein Messwert aufgenommen. Es werden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zur Auswertung werden die Fluoreszenzwerte durch Multiplikation mit dem Faktor $\text{Fluoreszenz}_{\text{Blank, t=0}} / \text{Fluoreszenz}_{\text{Sample, t=0}}$ normalisiert und die Fläche unter der Fluoreszenzabklingkurve (AUC) nach folgender Formel berechnet [7]:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} \frac{f_i}{f_0}$$

Formel 2 AUC: Fläche unter der Fluoreszenzabklingkurve, f_i: Fluoreszenz zum Zeitpunkt i, f_0: Fluoreszenz zum Zeitpunkt t=0

Die antioxidative Kapazität wird als Trolox-Äquivalente in µM angegeben oder auf die erhaltene Menge Extrakt umgerechnet.

III.1.3 Oxygen Radical Absorbance Capacity-Test – lipophile Variante

Reagenzien: wie in III.1.2

Aceton

zufällig methyliertes β-Cyclodextrin

Der ORAC-Test in der lipophilen Variante unterscheidet sich vom ORAC-Test in III.1.2 nur dadurch, dass als Lösungsmittel für Proben und Standards ein Aceton-Wassergemisch mit 50% Aceton und 7% zufällig methyliertem β-Cyclodextrin (w/v) eingesetzt wird [12].

III.1.4 Xanthinoxidase-Assay

Reagenzien: Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,5

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Allopurinol, 9 bis 90 µM in DMSO

Xanthin, 1 mM in DMSO

Xanthinoxidase, in Puffer, 3 mU pro Well

Das Mikrotiterplattengerät auf 30°C vorwärmen.

In die Näpfchen einer UV-transparenten Mikrotiterplatte wird 250 µL Puffer vorlegt, mit 10 µL Probe in Ethanol oder Allopurinol als Standard und 20 µL Xanthinoxidase-Lösung versetzt und für 10 min inkubiert. Die Absorption wird bei 293 nm gemessen. Mit 20 µL Xanthin wird die Reaktion gestartet. Die Lösung muss schnell zugegeben und im Well mit der Mehrkanalpipette kurz vermischt werden. Die Bildung von Harnsäure führt zu einer Zunahme der Absorption bei 293 nm und wird für 30 min verfolgt. Störungen durch andere Stoffe, die bei 293 nm absorbieren, können durch eine Kontrolle ohne Substrat sowie eine ohne Enzym erkannt werden.

Die Auswertung erfolgt über die Differenz der Absorption zu Beginn und zum Ende der Messung. Die Gehalte werden als Allopurinol-Äquivalente in µM angegeben.

III.1.5 Cyclooxygenase-Assay

Der Cycloxygenase-Assay wird mit dem Kit „COX Inhibitor Screening Assay“ von Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA) nach Anweisung durchgeführt.

In einer Cyclooxygenase-Reaktion wird Arachidonsäure von COX I oder COX II in einer Pufferlösung bei 37 °C zu PGH_2 umgesetzt. Bei dieser Reaktion werden zwei Kontrollen (Umsetzung mit Lösungsmittel ohne Probe (100 % Aktivität, IA) und mit Hitze inaktiviertem Enzym (BG)) mitgeführt. Die Reaktion wird mit Salzsäure gestoppt und PGH_2 wird mit Zinn(II)chlorid zu $PGF_{2\alpha}$ reduziert. Die Reaktionsmischung wird mit einem Puffer für den Enzymimmunoassay 2000fach verdünnt. Eine mit monoklonalen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte wird 50 µL Probe bzw. Prostaglandinstandard gefüllt und jeweils 50 µL Prostaglandin Screening Tracer und Antiserum hinzugefügt. Außerdem werden Kontrollen für nicht-spezifische Bindung (NSB), maximale Bindung (B_{max}) und Aktivität des Tracers angelegt. Die Platte wird 18 h bei Raumtemperatur inkubiert. Am Ende der Inkubation werden die Wells geleert und fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. In die leeren Näpfchen wird Ellmans Reagenz (200 µL) pipettiert. Die Platte wird 60 min im Dunklen inkubiert und danach die Absorption bei 412 nm gemessen. Die Absorption in den Kontrollen mit der maximalen Bindung soll zwischen 0,3 und 0,8 liegen.
Zur Auswertung werden die Werte normiert:

$$x_{norm} = \frac{x - NSB}{B_{max} - NSB} \cdot 100$$

Formel 3 x_{norm}: normierter Absorptionswert, NSB: Absorptionswert der nicht-spezifischen Bindung, B_{max}: Absorptionswert der maximalen Bindung.

Mit den Standards wird eine halblogarithmische Regression durchgeführt, indem die Absorption gegen die logarithmierte Konzentration aufgetragen wird. Mit dieser Regression wird der Prostaglandingehalt in den Proben und Kontrollen bestimmt. Der Restgehalt in der Kontrolle mit inaktiviertem Enzym (BG) wird von den Proben und der vollen Aktivität (IA) abgezogen. Die Inhibierung wird durch den Vergleich mit der Kontrolle mit 100% Aktivität (IA) ermittelt:

$$Inhibition\ [\%] = \frac{c_{Probe} - c_{IA}}{c_{IA}} \cdot 100$$

Formel 4 c_{Probe}: Konzentration der Probe, c_{IA}: Konzentration der Kontrolle mit 100% Aktivität

Außerdem wird ein Cold Spike Protokoll getestet [71]. Dabei werden die Proben, bevor sie auf die Mikrotiterplatte aufgetragen werden, in zwei Aliquote aufgeteilt. Ein Aliquot wird mit 5 µL eines Prostaglandinstandards (20 ng mL^{-1}) aufgestockt. Beide

Aliquote werden nach Anleitung vermessen und zunächst wie oben angegeben ausgewertet. Danach wird die Wiederfindungsrate (WFR) bestimmt:

$$WFR\ [\%] = \frac{c_{Probe,spiked} - c_{Probe}}{c_{Spike}} \cdot 100$$

Formel 5 WFR: Wiederfindung, $c_{Probe,\ spiked}$: Konzentration der aufgestockten Probe, c_{Probe}: Konzentration der nicht aufgestockten Probe, c_{Spike}: Konzentration des zugesetzten Prostaglandinstandards

Mit der der Wiederfindungsrate kann die tatsächliche Konzentration der Probe berechnet werden:

$$c_{Probe,wahr} = \frac{c_{Probe} \cdot 100}{WFR}$$

Formel 6 $c_{Probe,\ wahr}$: tatsächliche Konzentration der nicht aufgestockten Probe, c_{Probe}: Konzentration der nicht aufgestockten Probe, WFR: Wiederfindung

III.1.6 Comet-Assay

Angeraute Objektträger werden mit Agarose (1,5 g Agarose pro 250 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)) beschichtet und über Nacht getrocknet.

Es wird eine Stocklösung des Lysepuffers aus 146,1 g Natriumchlorid, 37,2 g Dinatrium-EDTA, 10,0 g N-Laurylsarcosin-Natriumsalz und 1,2 g Tris pro 1000 mL hergestellt.

Endothelzellen (2 mL) werden für 3 Stunden mit der Testsubstanz (200 µL, max. 0,5% DMSO) bei 37 °C inkubiert. Nach 150 min wird Wasserstoffperoxid (200 mM, 4,4 µL) hinzugefügt.

Das Medium wird abgenommen und die Zellen mit 250 µL Enzymlösung (0,25 % Trypsin in PBS mit EDTA, pH 7,4) abgelöst. Die Reaktion wird mit 500 µL Medium gestoppt und die Zellsuspension bei 10000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit 150 µL Medium resuspendiert.

50 µL Zelllösung werden mit 100 µL Low Melt Agarose bei 37 °C gemischt und 100 µL dieses Gemischs auf einen vorbeschichteten Objektträger gegeben. Nach dem Aushärten bei 4 °C für 10 min wird der Objektträger nochmals mit 100 µL Low Melt Agarose bedeckt. Nach dem zweiten Aushärten werden die Zellen bei 4 °C 90 min lysiert. Die Arbeitslösung des Lysepuffers besteht aus 4,45 mL Stocklösung, 500 µL DMSO und 50 µL Triton X-100.

Die Objektträger werden in eine Elektrophoresekammer gelegt und zum Entwinden der DNA 40 min auf Eis im Elektrophoresepuffer (12 g NaOH und 0,37 g Na_2-EDTA pro 1000 mL) equilibriert. Danach wird bei 25 V und 300 mA 20 min die Elektrophorese durchgeführt. Die Objektträger werden einmal mit Puffer (Tris-HCl, 0,4 M, pH 7,4) und zweimal mit destilliertem Wasser je 5 min neutralisiert.

Die Objektträger werden getrocknet, mit Ethidiumbromid (0,02 mg mL^{-1}) angefärbt, unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert. Die Auswertung der „Kometschweife“ erfolgt mit dem Programm CometScore 1.5 (TriTek Corp., Summerduck, Virginia, USA) [72].

a) Kulturführung der Zellen

   Die Zellen (Endothelzellen GM 7373) werden bei 37 °C im Dunklen in einer CO_2-Atmosphäre (5 %) auf Petrischalen mit 35 mm Durchmesser kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in einem 1:1 Gemisch aus Dulbecco‘s Modified Eagle Medium und Ham’s F-12 (Biochrom AG, Berlin) mit 5 % fötalem Kälberserum unter Zusatz von Penicillin und Streptomycin (pH 7,4, 300 mOsmol). Die Zellen wachsen nach der letzten Passage 2 Tage zu einem Monolayer.

b) Statistische Auswertung

   Die Proben werden in zwei verschiedenen Konzentrationen auf je drei Platten getestet. Aus jeder Platte werden 3 Objektträger mit Zellen belegt.

   Die Kontrollen (Medium und Lösungsmittel mit und ohne Wasserstoffperoxid) werden auf 2 Platten ausgebracht und auf insgesamt 5 Objektträger verteilt.

   Zunächst werden von jedem Objektträger mindestens 100 Zellen ausgewertet, um eventuelle Ausreißer erkennen zu können. Von den ausgewählten Objektträgern wird der Mittelwert des Tail Moments („Schweif“ der Zellen) sowie der Standardfehler (SEM) berechnet. Der Standardfehler ist definiert als:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Formel 7 SEM: Standardfehler, s: Standardabweichung (vgl. Formel 1), n: Anzahl der Messwerte

III.2 Isolierung

III.2.1 Probenmaterial

Die verwendeten Fruchtkörper wurden von den Firmen Margot Rühl Edelpilze und Druid Austernpilze (beide Ottrau-Immichenheim) bezogen.

III.2.2 Extrakte für Vortests

Für Vortests werden gefriergetrocknete und gemahlene Fruchtkörper von *P. eryngii*, *P. ostreatus* und *A. aegerita* im Extraktor nach Soxhlet entweder sukzessive mit Pentan : Ether = 1 : 1,12 und 96 %igem Ethanol (unvergällt) oder direkt mit Ethanol extrahiert. Die Extrakte werden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt und bei Raumtemperatur gelagert.

III.2.3 Extraktion der Fruchtkörper von *Pleurotus eryngii*

Es werden 9,3 kg Fruchtkörper von *Pleurotus eryngii* grob geschnitten und gefriergetrocknet. Dadurch werden 1,25 kg gefriergetrocknete Fruchtkörper erhalten. Diese werden zunächst zwei Tage bei Raumtemperatur in Braunglasflaschen mit 20 L Hexan, danach zweimal für eine Woche mit 15 L Methanol extrahiert.
Die Methanol-Extrakte werden vereinigt, auf 2,25 L eingeengt und mit der doppelten Menge Wasser versetzt. Der vereinigte Extrakt wird sukzessive mit jeweils 8 L Hexan, Dichlormethan und Essigsäureethylester extrahiert. Die Extrakte werden bei 40 °C am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, mit Wasser versetzt und gefriergetrocknet.
Die beiden Hexan-Extrakte werden gemeinsam bearbeitet.

III.2.4 Highspeed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Die stationäre Phase Hexan wird mit der mobilen Phase Acetonitril im Scheidetrichter gesättigt und *vice versa*. Die gesättigten Phasen werden getrennt und im Ultraschallbad entgast.
Die Probe wird in 25 mL eines Gemischs beider Phase gelöst, filtriert und in die CCC-Anlage injiziert. Die Trennung wird in einem Chromatograph CCC-1000

(Pharma-Tech Research Corporation, Baltimore, MD, USA) mit drei präparativen Spulen durchgeführt. Die Spulen bestehen aus PTFE (160 m x 2.6 mm Innendurchmesser) und besitzen in Reihe geschaltet ein Gesamtvolumen von 850 mL. Alle Lösungsmittel werden mit einer Biotronik HPLC-Pumpe BT 3020 (Jasco, Groß-Umstadt) gefördert.

Die Elution wird mit einer Flussrate 3 mL min^{-1} Acetonitril bei 1000 rpm gestartet. Die Detektion erfolgt bei 200 nm (UV-Detektor K-2501, Knauer) und wird einem Schreiber SE120 (BBC Goertz Metrawatt) aufgezeichnet. Nach 260 min werden die auf dem Coil verblieben Substanzen mit 5 mL min^{-1} Hexan bei 800 rpm extrudiert. Die Fraktionen werden in einem Fraktionensammler (Multirack 2111, Pharmacia) aufgefangen. Alle 4 min wird ein neues Gläschen benützt.

III.2.5 Gaschromatographie

Die Extrakte werden auf eine Konzentration von 200 ng μL^{-1} im Lösemittel eingestellt und gemessen. Der Ofen wird wie folgt programmiert:

60 °C 3 min, 5 K min^{-1} auf 300 °C, 25 K min^{-1} auf 325 °C, 325 °C 5 min

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der Retentionszeiten, der Kovatsindices und durch den Vergleich mit den Spektrenbibliotheken NIST MS Library und Wiley 2008 [73].

Der Kovatsindex (KI) berechnet sich nach:

$$KI = 100z + 100\frac{\lg t_{Rx} - \lg t_{Rz}}{\lg t_{Rz+1} - \lg t_{Rz}}$$

Formel 8 KI: Kovatsindex, t_R: Nettoretentionszeit, x: Probensubstanz, z: Anzahl der C-Atome des vorher eluierenden Alkans, z+1: Anzahl der C-Atome des später eluierenden Alkans

III.2.5.1 Messungen am GC-FID

GC	HP 6890 (Hewlett-Packard, heute: Agilent Technologies, Böblingen) mit Autosampler und Kaltaufgabesystem KAS 3 (Gerstel, Mühlheim an der Ruhr).
Injektion	100 °C auf 240 °C mit 10 K s^{-1}, 240 °C 3 min halten, Split 1:10, 1 µL
Fluss	Wasserstoff, 2 mL min^{-1}
Detektor	280 °C
Brenngase	Wasserstoff 40 mL min^{-1}, Luft 450 mL min^{-1}
Make Up-Gas	Stickstoff 43,5 mL min^{-1}

Säule	HP-5, 30 m x 0,32 mm ID x 0,25 µm d_F (Agilent Technologies)
Software	Chemstation B.04.01 (Agilent Technologies)

III.2.5.2 Messungen am GC-MS (CCC-Fraktionen)

GC	GC 8000 mit Quadrupol-Massenspektrometer MD 800 (Fisons Instruments, heute Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Injektion	On-column, 1 µL
Fluss	Helium, 1,2 mL min^{-1}
Interface	280 °C
MS	Source 200 °C, EI 70 eV, Scanbereich 33-500 amu
Säule	HP-5MS, 30 m x 0,32 mm ID x 0,25 µm d_F (Agilent Technologies)
Software	Xcalibur 1.2 (Finnigan, heute Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

III.2.5.3 Messungen am GC-MS (einzelne Proben)

GC	CP-3800 mit Massenspektrometer 1200 (Varian, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Injektion	250 °C, Split 1:10, 1 µL
Fluss	Helium, 1,2 mL min^{-1}
Interface	280 °C
MS	Source 200 °C, EI 70 eV, Scanbereich 33-500 amu
Säule	HP-5MS, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm d_F (Agilent Technologies)
Software	Varian MS Workstation 6.9.1 (Varian, Palo Alto, Kalifornien, USA)

III.2.5.4 Messung der acetylierten Proben

Am GC-FID wie unter III.2.5.1, GC-MS wie unter III.2.5.3 beschrieben, aber mit dem folgendem Temperaturprogramm und Splitverhältnis:

Temperaturprogramm	60 °C 3 min, 5 K min^{-1} auf 350 °C, 350 °C 5 min
Injektion	Split 1:5
Scanbereich	33-800 amu

III.2.6 High Performance Liquid Chromatography

III.2.6.1 LC-MS

Das System besteht aus einer HPLC Pumpe 1100 und einem Autosampler 1200 (Agilent Technologies, Böblingen). Das Massenspektrometer ist ein Quadrupol-MS^2 (Esquire-LC, Bruker Daltonics, Bremen). Die Ionisierungsbedingungen im APCI-Modus sind:

Capillary	4500 V
Corona	2800 V
APCI Temperatur	400 °C
Nebulizer Gas	45 psi
Dry Gas	7 L min^{-1}
Dry Temperatur	350 °C
Scanbereich	50-2000 amu

Das System wird über die Software Chemstation A.06.01 (Agilent) und Esquire Control Version 4.0 (Bruker Daltonics) gesteuert.

Säule	LiChrospher RP18-5 (Merck, Darmstadt), 250 x 4,6 mm	
Flussrate	0,8 mL min^{-1}	
Injektionsvolumen	5 µL	
Laufmittel	A	TBMe : MeOH : H_2O = 4 : 92 : 4
	B	TBMe : MeOH : H_2O = 90 : 6 : 4

Die Laufmittel werden vor der Verwendung in einem Scheidetrichter gemischt und von einer zweiten Phase befreit.

Tabelle III-2 Gradientenprogramm (linear) der LC-APCI-MS

Zeit	A [%]	B [%]
0	100	0
10	100	0
20	50	50
30	0	100
50	0	100
55	100	0
60	100	0

III.2.6.2 Präparative HPLC

Das System besteht aus zwei HPLC Pumpen PU-980 und einem UV-Detektor UV-1570 (Jasco, Groß-Umstadt), einem Degasser Degas (Shodex, Kawasaki, Japan) und einem Fraktionensammler SF-3120 (Advantec, Dublin, Kalifornien, USA). Das System wird über die Software Clarity (DataApex, Prag, Tschechische Republik) gesteuert.

Säule	Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel, Düren), 250 x 16 mm	
Flussrate	5 mL min^{-1}	
Injektionsvolumen	500 µL	
Detektionswellenlänge	205 nm	
Laufmittel	A	MeOH
	B	MeOH : H_2O = 80 : 20

Tabelle III-3 Gradientenprogramm (linear) der präparativen HPLC

Zeit	A [%]	B [%]
0	25	75
10	25	75
40	100	0
60	100	0
65	25	75
75	25	75

Nach Elution des Totvolumens wird jede Minute eine neue Fraktion begonnen, bei Bedarf auch manuell ein weiteres Gläschen gefüllt.

III.2.7 Medium Pressure Liquid Chromatography

Das MPLC-System besteht aus einer HPLC-Pumpe, einer Säule mit nicht end-capped RP18-Material (Merck, Darmstadt) und einem Fraktionensammler Multirack 2111 (LKB, Bromma).

Die Probe wird auf die Säule gegeben und mit verschiedenen Laufmitteln eluiert. Die Flussrate beträgt 2 mL min^{-1} und die Fraktionen werden 1 min pro Glas gesammelt.

a) Trennung DCM-CCC-F12-14 (*P. eryngii*)

Die Probe wird zunächst für 5 h 45 min mit 95 %igen Methanol, danach für 80 min mit reinem Methanol und zuletzt mit Methanol : Ethanol = 1:1 eluiert. Das Eluat wird in einer Vakuumzentrifuge eingeengt und nach Vergleich des DC-Profils vereinigt.

III.2.8 Säulenchromatographie

Das System zur Säulenchromatographie besteht aus einer Säule mit Kühlmantel (Besta-Technik für Chromatographie, Wilhelmsfeld) und einem Fraktionensammler Multirack 2111 (LKB, Bromma). Die Säule wird mit Kieselgel 60 (Fluka, Buchs, Schweiz) gegossen.

a) Trennung der Endfraktion DCM-CCC-F24 (*P. eryngii*)

Die Trennung von 210 mg Material erfolgt mit dem Stufengradienten aus Tabelle III-4. Der Fraktionensammler benutzt alle 60 s ein neues Gläschen, für die abschließende Elution mit reinem Methanol alle 90 s.

Tabelle III-4 Gradient der Säulenchromatographie

Pentan [%]	Dichlormethan [%]	Methanol [%]	Volumen [mL]
75	25	0	250
25	75	0	250
0	100	0	250
0	99	1	250
0	90	10	250
0	85	15	250
0	50	50	250
0	0	100	500

III.2.9 Dünnschichtchromatographie

Die Proben werden auf Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator (Fluka, Buchs, Schweiz) oder RP18-DC-Platten mit Fluoreszenzindikator (Merck, Darmstadt) getüpfelt und mit unterschiedlichen Lösungsmitteln entwickelt. Die DCs werden im UV-Licht betrachtet (254 nm und 366 nm) und mit Anisaldehyd-Sprühreagenz angefärbt.

Das Sprühreagenz hat die folgende Zusammensetzung [74]:

1 ml Anisaldehyd
2 ml konzentrierte Schwefelsäure
ad 100 mL mit Eisessig

Die DCs werden fotografiert und mit der Autokorrektur-Funktion des Microsoft Office Picture Managers (Microsoft, Redmond, Washington, USA) bearbeitet.

III.2.10 Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie

Die NMR-Untersuchungen werden an einem DPX 400 (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) bei 300 K in deuteriertem Chloroform ohne Zusatz von Trimethylsilan durchgeführt.

III.2.11 Direkteinlass-EI-MS

Die Spektren werden an einem VG Autospec Sektorfeldmassenspektrometer (VG Analytical Ltd., Ipswich, England) mit Direkteinlass gemessen. Die Ionisierungsenergie beträgt 70 eV und der Scanbereich 50-600 Masseneinheiten.

III.2.12 Extrakte von *Agrocybe aegerita*

Gefriergetrocknete, gemahlene Fruchtkörper von *Agrocybe aegerita* werden im Soxhlet-Extraktor sukzessive mit Pentan und Methanol extrahiert. Der Methanol-Extrakt wird mit Wasser verdünnt und mit Hexan, Dichlormethan und Ethylacetat extrahiert. Der entstehende Dichlormethan-Extrakt wird wie unter III.2.4 beschrieben in der High Speed Countercurrent Chromatography getrennt, und wie in III.3.5.2 beschrieben, derivatisiert und vermessen.

III.3 Synthesen

III.3.1 Synthesestrategie für Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol

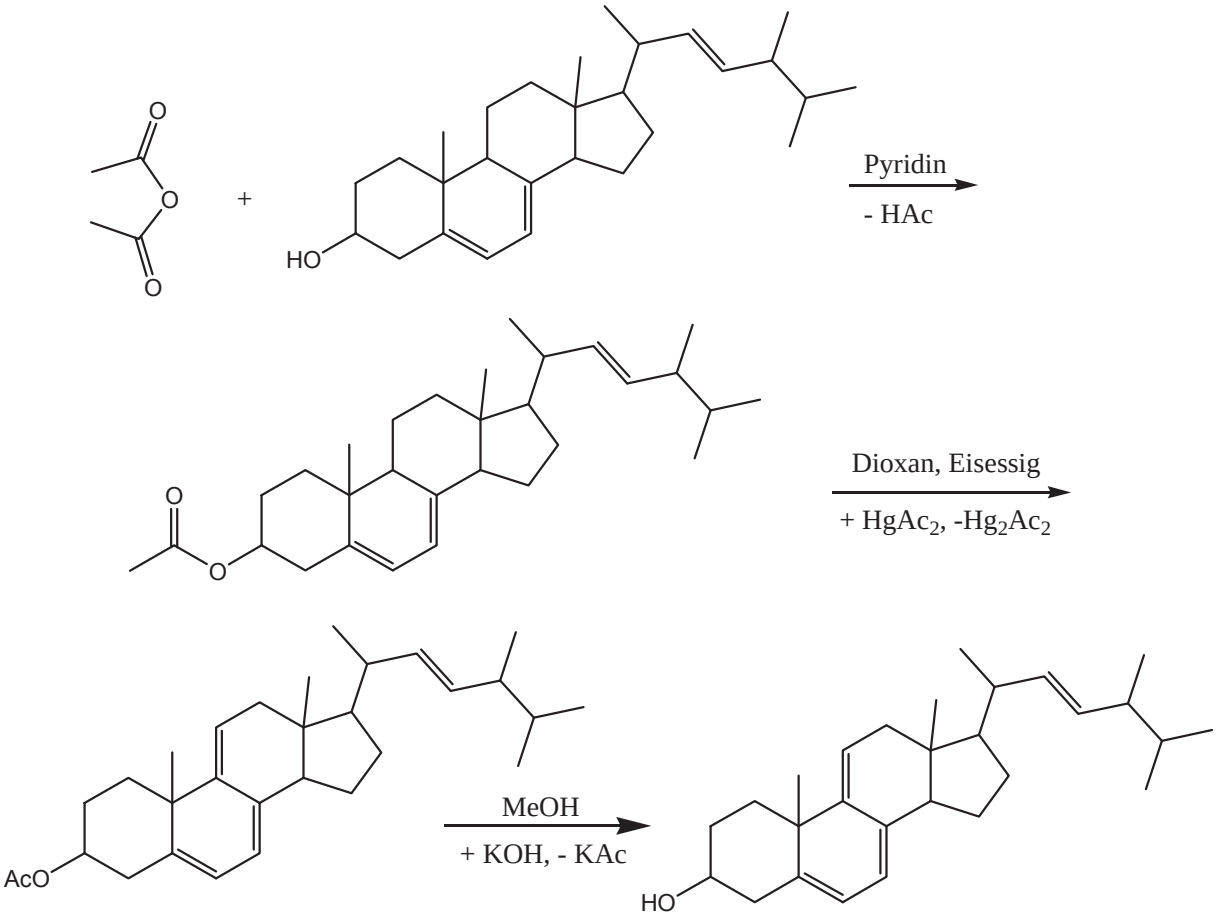

Abbildung III.1 Synthesestrategie für Ergostatetraenol nach Recherche in Beilstein Crossfire.

III.3.2 Synthese des Ergosterolacetats

Die Synthese erfolgt in Anlehnung an [75, 76].

Ergosterol (2 g) wird mit 5 mL trockenem Pyridin und 5 mL frisch destilliertem Acetanhydrid versetzt und für 1 Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird abgekühlt. Danach werden 10 mL 10%ige Salzsäure hinzugefügt. Die Mischung wird in 30 mL Eiswasser gegeben, auf pH 6 eingestellt und über eine Nutsche filtriert. Der Filterkuchen wird mit Eisessig, Eiswasser und Methanol gewaschen und aus Ethylacetat umkristallisiert. Es wurden 1,183 g Ergosterolacetat (54 % Ausbeute) erhalten.

Die Identität wurde per GC-MS, ^{1}H- und ^{13}C-NMR sowie durch den Vergleich mit [77] bestätigt.

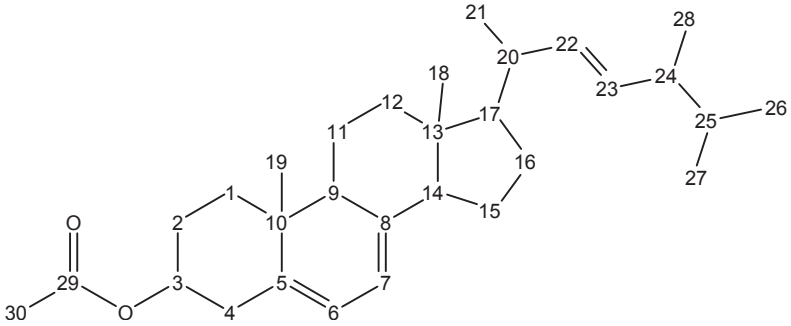

Abbildung III.2 Nummerierung der Sterole am Beispiel des Ergosterolacetats

GC-MS: m/z 438 (11%), 378 (100), 363 (35), 337 (5), 253 (35), 157 (24)

^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 0,65 (s, C18), 0,85 (2xd, J = 6,3/6,4 Hz, C26/27), 0,94 (d, J = 6,8 Hz, C28), 0,98 (s, C19), 1,06 (d, J = 6,4 Hz, C21), 2,07 (s, C30), 2,38 (m, C12), 2,51 (m, C4), 2,54 (m, C4), 4,73 (m, C3), 5,22 (m, C22/C23), 5,4 (m, C7), 5,59 (m, C6)

Hinzu kommen einander stark überlappende Multipletts im Bereich von 1,25 bis 2,10 ppm.

^{13}C-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 12,1 (C-18), 16,2 (C-19), 17,6 (C-28), 19,7 , 20,0, 21,4 (C-21, -26, -27), 21,0 (C-30), 21,1 (C-11), 23,0 (C-15), 28,1 (C-2), 28,3 (C-16), 33,1 (C-25), 36,7 (C-4), 37,1 (C-10), 37,9 (C-1), 39,0 (C-12), 40,4 (C-20), 42,8 (C-24, C-13), 46,0 (C-9), 54,5 (C-14), 55,7 (C-17), 72,8 (C-3), 116,3 (C-7), 120,2 (C-6), 132,0 (C-23), 135,6 (C-22), 138,6 (C-5), 141,5 (C-8), 170,6 (C-29)

Die Spektren sind grafisch im Anhang zu finden (Abbildung V.16, Abbildung V.22 und Abbildung V.23).

III.3.3 Synthese des Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetats

Die Synthese erfolgt in Anlehnung an [78].

Ergosterolacetat (500 mg) wird in 7,5 mL absolutem Dioxan zum Sieden erhitzt. Quecksilber(II)acetat (1,5 g) wird unter Erwärmen in 8,5 mL Eisessig gelöst. Die Quecksilberacetat-Eisessig-Mischung wird zum siedenden Dioxan hinzugefügt und der Reaktionsansatz 9 min unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird im Eisbad auf etwa 15 °C abgekühlt. Ausgefallenes gelbes Quecksilber(I)acetat wird durch einen Faltenfilter abgetrennt. Das Filtrat wird mit 12 mL 60 %igen Methanol versetzt und

das Rohprodukt kristallisiert bei -18 °C aus. Nach Filtration wurden 264 mg Rohprodukt erhalten.

Das Rohprodukt wird in Benzen gelöst und durch Aluminiumoxid (2,74 g) filtriert. Das Aluminiumoxid wird mit der dreifachen Menge Benzen gespült. Das Benzen wird am Rotationsverdampfer eingeengt und mit Methanol bis zur Bildung erster Kristalle versetzt. Die Kristallisation wird über Nacht bei -18 °C vervollständigt. Nach Filtration wurden 100,2 mg eines gelben Pulvers von Ergostatetraenolacetat (20 % Ausbeute) erhalten. Die Identität wurde mittels GC-MS, ^{1}H-, und ^{13}C-NMR bestätigt.

Die chemischen Verschiebungen der ^{13}C-Atome und die Schwerpunkte der Multipletts im ^{1}H-Spektrum sind dem HSQC entnommen, die ^{1}H-Kopplungen den ^{1}H-Spektrum (Tabelle III-5). Die Spektren sind als Grafik im Anhang zu finden (Abbildung V.17 sowie Abbildung V.24 bis Abbildung V.26).

GC-MS: m/z 436 (7%), 376 (100), 361 (15), 251 (40)

Tabelle III-5 NMR-Daten aus HSQC für Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetat

^{13}C	^{1}H	Multiplizität	*J* [Hz]	Position
11,6	0,60	s		C18
17,6	0,94	d	6,9	C28
19.7/20.0	0.84/0.86	2 x d	6,2	C26/C27
20,6	1,04	d	6,7	C21
21,4	2,05	s		C30
22,8	1.40/1.77	m		C15
28,3	1.78/1.98	m		C2
29,0	1.36/1.84	m		C16
37,4	2.43/2.56	m		C4
38,1	1.60/1.74	m		C1
42,9	2.20/2.38	m		C12
30,3	1,28	s		C19
33,1	1,50	m		C25
39,4	-			C10
42,1	-			C13
40,4	2,06	m		C20
42,8	1,88	m		C24
51,0	2,25	m		C14
56,1	1,34	m		C17
74,0	4,68	m		C3
115,7	5,42	m		C7
119,1	5,71	m		C6
122,5	5,53	m		C11
132,1	5,26	m		C23
135,5	5,18	m		C22
135,6	-			C5
140,1	-			C8
144,1	-			C9
170,4	-			C29

III.3.4 Synthese des Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ols

Die Synthese erfolgt in Anlehnung an [76].

Ergostatetraenolacetat (80 mg) wird mit 15 mL 10%iger methanolischer Kalilauge 30 min unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten werden 15 mL Wasser hinzugefügt und die ausgefallenen Nadeln über eine Nutsche filtriert. Der Filterkuchen wird mit etwas Methanol und Ethanol gewaschen. Es wurden 31,1 mg Ergostatetraenol (43 % Ausbeute) erhalten. Die Identität wurde mittels GC-MS sowie ^{1}H- und ^{13}C-NMR bestätigt.

Die chemischen Verschiebungen der ^{13}C-Atome und die Schwerpunkte der Multipletts im ^{1}H-Spektrum sind dem HSQC entnommen, die ^{1}H-Kopplungen den ^{1}H-Spektrum (Tabelle III-6). Die Spektren sind als Grafik im Anhang zu finden (Abbildung V.18 sowie Abbildung V.27 bis Abbildung V.29).

GC-MS: m/z 394 (30%), 376 (38), 361 (12), 251 (100), 209 (17)

Tabelle III-6 NMR-Daten aus HSQC für Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol

13C	1H	Multiplizität	*J* [Hz]	Position
11,6	0,60	s		C18
17,6	0,94	d	6,8	C28
19,7/20,0	0,93/0,85	2 x d	6,8/6,3	C26/C27
20,8	1,04	d	6,7	C21
22,9	1.42/1.76	m		C15
32,3	1.73/1.95	m		C2
29,0	1.36/1.84	m		C16
41,6	2.40/2.49	m		C4
38,4	1.56/1.74	m		C1
43,0	2.19/2.38	m		C12
30,6	1,27	s		C19
33,2	1,50	m		C25
39,4	-			C10
42,2	-			C13
40,5	2,07	m		C20
42,8	1,88	m		C24
51,2	2,25	m		C14
56,3	1,35	m		C17
72,6	3,62	m		C3
115,5	5,42	m		C7
118,3	5,69	m		C6
122,4	5,54	m		C11
132,1	5,25	m		C23
135,4	5,19	m		C22
135,6	-			C5
141,2	-			C8
144,3	-			C9
-	1,65	s, breit		OH

III.3.5 Synthese der Derivate zur massenspektrometrischen Untersuchung

III.3.5.1 Trimethylsilylether

1 mg Probensubstanz wird mit 1 mL eines frisch hergestellten Gemisches aus 1 Teil Trimethylsilylimidazol und 4 Teilen trockenem Pyridin versetzt. Der Reaktionsansatz wird 2 h auf 60 °C erhitzt [79] und danach direkt am GC-MS-System III.2.5.3 vermessen.

III.3.5.2 Acetate

Die Probensubstanz wird mit 300 µL eines Gemischs aus 1 Teil frisch destilliertem Acetanhydrid und 2 Teilen trockenem Pyridin über Nacht bei 50 °C acetyliert [80]. Nach Zugabe von 200 µL Methanol wird die Probe im Stickstoffstrom zur Trockne gebracht, in Ethylacetat aufgenommen und mit dem GC-MS-System III.2.5.3 vermessen.

III.3.5.3 4,4-Dimethyloxazolin-Derivate (DMOX)

Die Probensubstanz wird mit der 500fachen Menge 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP) versetzt und über Nacht bei 160 °C im Trockenschrank erhitzt. Das Reaktionsgemisch wird in Dichlormethan gelöst, mit Wasser ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und im Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird in Pentan aufgenommen und per GC-MS nach III.2.5.3 vermessen.

III.4 Kultivierung

III.4.1 Kulturen

Für die Submerskultivierung werden folgende Stämme eingesetzt:

- *Pleurotus eryngii* CBS 458.79 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande)
- *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)
- *Agrocybe aegerita* Sylvan 4021 (Sylvan Inc., Horst, Niederlande).

III.4.2 Medien

III.4.2.1 SNL-Medium nach Sprecher

Das SNL-Medium nach Sprecher [81] enthält die in Tabelle III-7 genannten Verbindungen sowie eine Spurenelement-Lösung, deren Zusammensetzung in Tabelle III-8 aufgeführt ist.

Tabelle III-7 SNL-Medium

Verbindung	Konzentration [g L^{-1}]
Glucose-Monohydrat	30,0
Asparagin-Monohydrat	4,5
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5
Magnesiumsulfat	0,5
Hefeextrakt	3,0
Spurenelementlösung	1,0 mL

Tabelle III-8 Spurenelement-Lösung

Verbindung	Konzentration [mg L^{-1}]
Eisen(III)chlorid Hexahydrat	80
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	5
Mangan(II)sulfat Hydrat	30
Zink(II)sulfat Heptahydrat	90
Titriplex III	400

Der pH-Wert des Mediums wird vor dem Autoklavieren auf 6,0 eingestellt.

III.4.2.2 Minimalmedium

Das Minimalmedium wird wie das SNL-Medium, aber unter Verzicht auf Glucose, Asparagin und Hefeextrakt hergestellt.

III.4.2.3 Medien mit Nebenströmen

Für die Kultivierung auf Nebenströmen werden Rapspresskuchen (Teutoburger Ölmühle GmbH & Co. KG, Ibbenbüren), Biertreber (Hofbrauhaus Wolters GmbH, Braunschweig), Möhrentrester (Wesergold Getränkeindustrie GmbH & Co. KG,

Rinteln) und Weißkohlabschnitte (Alfred-Paulsen GmbH & Co. KG, Otterndorf) verwendet. Die Nebenströme werden nach Tabelle III-9 eingewogen, mit 100 mL Minimalmedium versetzt und autoklaviert.

Tabelle III-9 Einwaage der Nebenströme

Nebenstrom	Einwaage [g] ± 0,1g
Biertreber	20,0
Möhrentrester	20,0
Rapspresskuchen	5,0
Weißkohlabschnitte	25,0

Das Autoklavieren der Medien erfolgte bei 121 °C für 20 min.

III.4.3 Kulturführung

III.4.3.1 Vorkultur

Zum Animpfen der Vorkultur wird ein 1 cm² großes, gut bewachsenes Agar-Stück, in 200 ml SNL-Medium mit einem Ultraturrax-Stab (Miccra D-9, ART-moderne Labortechnik, Müllheim-Hügelheim) dispergiert (16.000 rpm, 15 s). Die Vorkulturen werden 7 Tage bei 24 °C statisch kultiviert.

III.4.3.2 Hauptkultur

Das aufschwimmende Myzel der Vorkultur wird zunächst mit dem Ultraturrax dispergiert. Nach Zentrifugieren (4000 rpm, 5 min, 4 °C) wird abdekantiert. Das Myzel wird zweimal mit 25 ml Minimalmedium gewaschen und schließlich in 25 ml Minimalmedium resuspendiert. Damit werden die Hauptkulturen auf Nebenströmen sowie eine Kontrolle mit 100 ml SNL-Medium inokuliert. Die Hauptkulturen wachsen statisch 19 Tage bei 24 °C.

III.4.3.3 Kulturernte

Das auf der Kulturoberfläche schwimmende Myzel wird abgenommen und vorsichtig von anhaftendem Nebenstrom befreit und gefriergetrocknet. Das Kulturmedium wird eingefroren.

III.4.3.4 Probenvorbereitung für die Assays

100 mg gefriergetrocknetes Myzel bzw. gefriergetrocknete Fruchtkörper zum Vergleich werden über Nacht mit 4 mL Ethanol bei 60 °C extrahiert. Für den ORAC-Assay werden die Proben 1:50 mit Methanol verdünnt, für den DPPH-Assay 1:5 mit Ethanol.

III.4.3.5 Probenvorbereitung für die gaschromatographische Analyse

100 mg des gefriergetrockneten Myzels werden mit 4 mL 10%iger methanolischer Kalilauge 3 h bei 60 °C unter Zusatz von Cholesterol als internem Standard (10 µg mL^{-1}, 30 µL) verseift. Nach dem Abkühlen wird die Probe 15 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 3 mL des Überstands werden mit 2 mL Hexan und 3 mL Wasser versetzt und 30 min lang ausgeschüttelt [82]. Nach einer zweiten Zentrifugation wird 1 mL der Hexan-Phase in ein Vial überführt und im Stickstoffstrom getrocknet. Der Rückstand wird wie unter III.3.5.2 beschrieben acetyliert.

III.5 Geräte, Chemikalien und Entsorgungshinweise

III.5.1 Allgemeine Geräte

Tabelle III-10 Allgemeine Geräte

Gerät	Typ	Firma	Ort
Waage	SI-234	Denver Instruments	Denver, Colorado, USA
Wasseraufbereiter	GenPure UC-TOC/UF	TKA	Niederelbert
Gefriertrockner	Vaco 2-5	Zirbus	Bad Grund
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph Instruments	Schwabach
Rotationsverdampfer	Laborota 4002 digital	Heidolph Instruments	Schwabach
Autoklav	Varioklav 75S	H+P Labortechnik	Oberschleißheim
pH-Meter	UB-5	Denver Instruments	Denver, Colorado, USA
Wasserbad		Memmert	Schwabach
Zentrifuge	RT 7 plus	Sorvall	Waltham, Massachusetts, USA
Vakuumzentrifuge	Speedvac	Thermo	Waltham, Massachusetts, USA
Evaporator	EC-1	VLM	Bielefeld
Kühlaggregat	Minichiller	Huber	Offenburg
Ultraschallbad	Sonorex AK 100 H	Bandelin	Berlin
Sterilbank		Clean Air	Minneapolis, Minnesota, USA
Schüttler und Inkubationshaube	Certomat R und HK	Sartorius	Göttingen

III.5.2 Chemikalien

Tabelle III-11 Chemikalien für Bioassays

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
2,2'-Azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid (AAPH)	97%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	97%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Allopurinol		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Butylhydroxyanisol (BHA)	98%	Fluka	Buchs, Schweiz
COX Inhibitor Screening Assay		Cayman Chemical Company	Ann Arbor, Michigan, USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	99%	Fluka	Buchs, Schweiz
Diphenylpikrylhydrazyl-Radikal (DPPH)	90%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Fluorescein-Natriumsalz	für Fluoreszenz	Fluka	Buchs, Schweiz
Methyliertes β-Cyclodextrin		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Naproxen	purum 98 %	Fluka	Buchs, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	99%	Fluka	Buchs, Schweiz
Xanthin	99%	Fluka	Buchs, Schweiz
Xanthinoxidase		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Ergosterol	HPLC	Fluka	Buchs, Schweiz
Ölsäure	purum	Fluka	Buchs, Schweiz
Linolsäure	GC	Carl Roth	Karlsruhe
Linolsäuremethylester	GC	Carl Roth	Karlsruhe
Elaidinsäure	GC	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Palmitinsäure	rein	Henkel	Düsseldorf
Palmitinsäuremethylester	GC	Fluka	Buchs, Schweiz
Palmitoleinsäure	puriss. p.a.	Fluka	Buchs, Schweiz
Bis(Ethylhexyl)phthalat	99%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Natriumchlorid	p.a.	Carl Roth	Karlsruhe
Normal Melt Agarose		Peqlab	Erlangen
Low Melt Agarose		Biozym	Hess. Oldendorf
Tris	99,5%	Carl Roth	Karlsruhe
Tris-HCl	99%	Carl Roth	Karlsruhe

Fortsetzung Tabelle III-11 Chemikalien für Bioassays

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure (Na_2EDTA)	p.a.	Merck	Darmstadt
N-Laurylsarcosin Natriumsalz	für biochemische Zwecke	Merck	Darmstadt
NaOH	p.a.	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	98%	Carl Roth	Karlsruhe
Triton X-100		Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

Tabelle III-12 Lösungsmittel

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
Aceton	Hochschullieferung		
Acetonitril	HPLC	Fisher Scientific	Schwerte
Chloroform-d	99,96%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Dichlormethan	Hochschullieferung		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	99,5%	Riedel-de Haën	Seelze
Ethanol	Hochschullieferung		
Ethylacetat	Hochschullieferung		
Hexan	HPLC	Fisher Scientific	Schwerte
Methanol	Hochschullieferung		
Methanol (HPLC)	Gradient grade	Carl Roth	Karlsruhe
Pentan	Hochschullieferung		
tert.-Butylmethylether (TBMe)	HPLC	Fisher Scientific	Schwerte

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

Tabelle III-13 Chemikalien für Synthesen

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
Acetanhydrid	zur Synthese	Merck	Darmstadt
Aluminiumoxid	für Chromatographie	Fluka	Buchs, Schweiz
2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP)		Fluka	Buchs, Schweiz
Anisaldehyd	zur Synthese	Merck	Darmstadt
Benzol	p.a.	Fluka	Buchs, Schweiz
Dioxan, absolut	99,8%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Eisessig	99,8%	Fluka	Buchs, Schweiz
Ergosterol	95%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Kaliumhydroxid	p.a.	Merck	Darmstadt
Natriumsulfat, wasserfrei	puriss. p.a. 99 %	Fluka	Buchs, Schweiz
Pyridin	99,8% GC	Fluka	Buchs, Schweiz
Quecksilber(II)acetat	98%	Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Salzsäure	25%	Roth	Karlsruhe
Schwefelsäure	p.a.	Carl Roth	Karlsruhe
Trimethylsilylimidazol	GC	Carl Roth	Karlsruhe

Tabelle III-14 Chemikalien für Nährmedien

Chemikalie	Qualität	Hersteller	Ort
Agar-Agar	für die Mikrobiologie	Merck	Darmstadt
D-Glucose-Monohydrat	für die Mikrobiologie	Merck	Darmstadt
Eisen(III)chlorid-Hexahydrat	reinst	Riedel-de Haën	Seelze
Hefeextrakt	für die Mikrobiologie	Merck	Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	p. a.	Riedel-de Haën	Seelze
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	99%	Fluka	Buchs, Schweiz
L-Asparagin-Monohydrat	für die Biochemie	Merck	Darmstadt
Magnesiumsulfat	Rein	Riedel-de Haën	Seelze
Mangan(II)sulfat-Hydrat	>98%	Fluka	Buchs, Schweiz
Titriplex III (EDTA)	>99%	Merck	Darmstadt
Zink(II)sulfat-Heptahydrat	>99%, p. a.	Fluka	Buchs, Schweiz

III.5.3 Entsorgungshinweise

III.5.3.1 Biologisches Material

Pilzkulturen und Nährlösungen wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 ºC, 20 min) sterilisiert. Das sterilisierte Nährmedium und feste Bestandteile wurden als Laborabfall entsorgt.

III.5.3.2 Lösungsmittel und Chemikalien

Der Verbrauch organischer Lösungsmittel wurde durch weitgehende Wiederverwendung destillativ gereinigter Lösungsmittel auf ein Minimum reduziert. Auf die Verwendung halogenierter Lösungsmittel wurde nach Möglichkeit verzichtet. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel,
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel,
- halogenierte wassermischbare Lösungsmittel,
- halogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel.

Ethidiumbromid- und quecksilberhaltige Abfälle wurden getrennt gesammelt. Verwendete Lösungsmittel wurden ebenso wie andere Sonderabfälle des Labors der zentralen Entsorgung der Leibniz Universität Hannover zugeführt.

IV Ergebnisse und Diskussion

Die praktischen Arbeiten wurden als aktivitätsgeleitetes Screening angelegt. Die Pilze wurden zunächst in Vorversuchen untersucht. Dazu wurden Extrakte mit Pentan-Ether und Ethanol am Soxhlet hergestellt. Diese wurden in den antioxidativen Assays, dem Cyclooxygenase-Assay und dem Xanthinoxidase-Assay eingesetzt.

Die Ergebnisse der Vorversuche in IV.1 und die bereits in der Literatur bekannten aktiven Inhaltsstoffe führten zur Auswahl von *Pleurotus eryngii* als primäres Studienobjekt.

Daraufhin wurde ein Großversuch mit etwa 10 kg frischen Fruchtkörpern von *P. eryngii* gestartet. Nach Trocknung und Extraktion mit verschiedenen Lösemitteln wurde die Aktivität der unterschiedlichen Extrakte in den Assays gemessen und bewertet (IV.2) und die weitere Bearbeitung der Hexan- und Dichlormethan-Extrakte beschlossen. Beide Extrakte wurden zunächst mit der High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC) aufgetrennt (IV.3) und die einzelnen Fraktionen wiederum in den Assays, aber auch mittels GC-MS untersucht.

Einige besonders aktive Fraktionen der HSCCC des Dichlormethan-Extraktes wurden mit anderen chromatographischen Techniken weiter aufgetrennt (IV.3.4). Die gemessenen Aktivitäten wurden in IV.4 auf Einzelsubstanzen zurückgeführt.

Zusätzlich wurde auch ein mit der HSCCC aufgetrennter Dichlormethan-Extrakt von *Agrocybe aegerita* untersucht (IV.5).

Im Hinblick auf spätere Substratoptimierungen wurde eine Kultivierung auf verschiedenen Nebenströmen der Lebensmittelindustrie durchgeführt (IV.6).

Eine Zusammenfassung der identifizierten Substanzen und der gemessenen bioaktiven Wirkungen sowie einen Ausblick liefern IV.7 bis IV.9.

IV.1 Vorversuche

Für Vorversuche wurden ethanolische und Pentan-Ether-Extrakte aus *A. aegerita*, *P. eryngii* und *P. ostreatus* eingesetzt (III.2.2). Dabei zeigte insbesondere *A. aegerita* eine hohe antioxidative Aktivität im DPPH- und im ORAC-Test (Abbildung IV.1 und Abbildung IV.2). Diese erhöhte Aktivität war vor allem in der alkoholischen Fraktion zu finden.

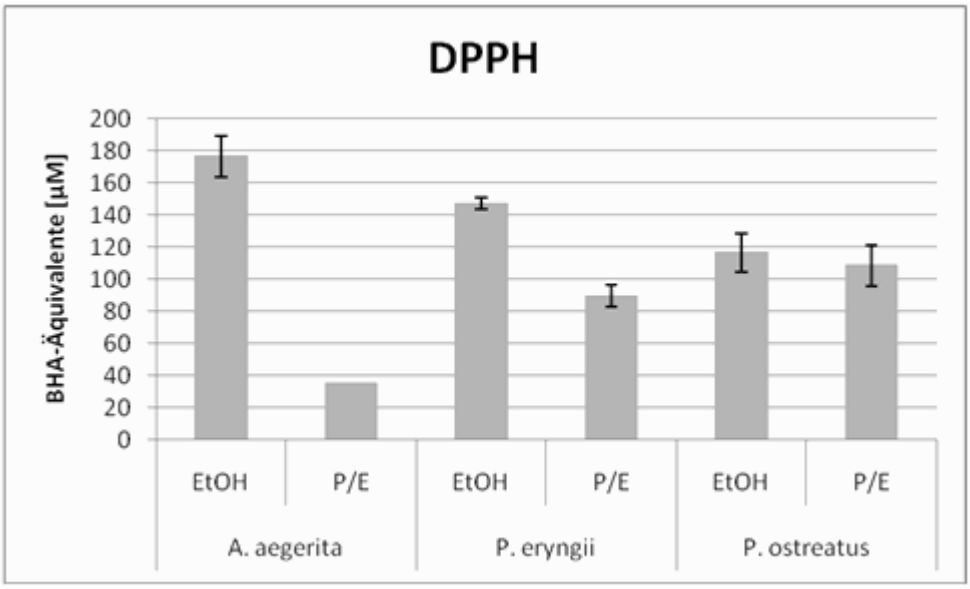

Abbildung IV.1 DPPH-Assay ethanolischer und Pentan-Ether-Extrakte der Fruchtkörper (c(Extrakte) = 0,625 mg mL^{-1} im Well).

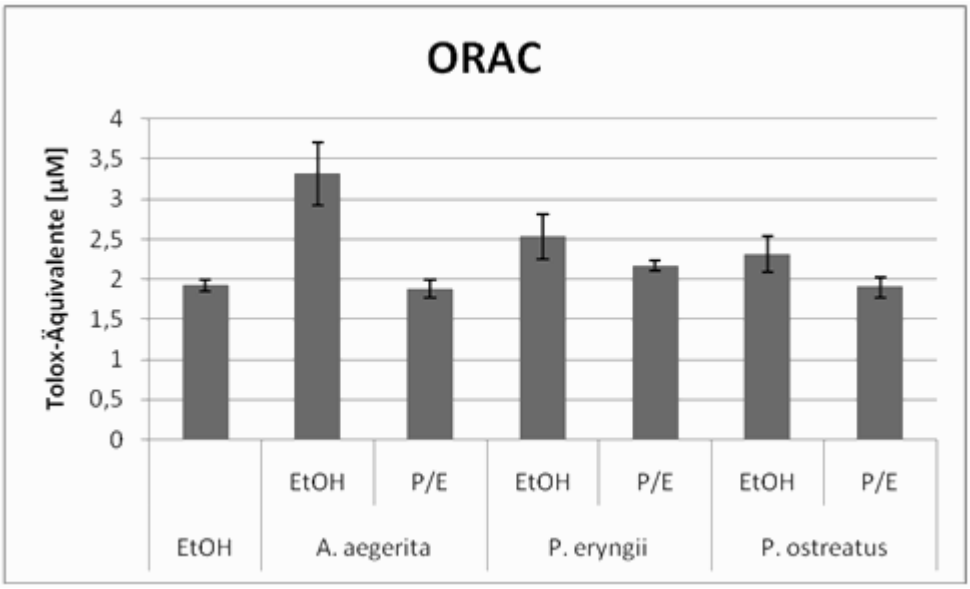

Abbildung IV.2 Hydrophiler ORAC-Assay ethanolischer und Pentan-Ether-Extrakte (c(Extrakte) = 0,1 mg mL^{-1}).

Da die Ausbeuten in den Vorversuchen bei allen drei Pilzen bei den Pentan-Ether-Extrakten etwa 1 % der Trockenmasse, bei den Ethanol-Extrakten circa 4 % der Trockenmasse ausmachte, ergab sich in der Bewertung in Bezug auf die Trockenmasse keine Änderung. *A. aegerita* zeigte im DPPH-Assay für den Ethanol-Extrakt 12,1 µmol BHA-Äquivalente (BHA-E) g^{-1}, *P. eryngii* 11,0 µmol BHA-E g^{-1} und für *P. ostreatus* 7,5 µmol BHA-E g^{-1}. Für die P/E-Extrakte lagen die Werte bei jeweils

0,6 µmol BHA-E g^{-1}, 1,1 µmol BHA-E g^{-1} und 1,7 µmol BHA-E g^{-1} und waren 20fach, 10fach bzw. 4,5fach geringer als in den polaren Extrakten.

Die Unterschiede fielen beim ORAC-Assay nicht so stark aus. Umgerechnet auf die Trockenmasse der extrahierten Fruchtkörper ergaben sich Trolox-Äquivalente (TE) von 8,22 µmol TE g^{-1}, 8,76 µmol TE g^{-1} und 8,68 µmol TE g^{-1} für *A. aegerita*, *P. eryngii* und *P. ostreatus*. Die P/E-Fraktionen waren in der hydrophilen ORAC-Variante in geringerem Maße antioxidativ wirksam und erzielten Werte von 3,75 µmol TE g^{-1}, 1,90 µmol TE g^{-1} und 2,31 µmol TE g^{-1}. Unter Zusatz eines Lösevermittlers wie methylierten β-Cyclodextrin wiesen lipophile Substanzen im ORAC-Assay höhere antioxidative Kapazitäten auf.

Tabelle IV-1 zeigt die Inhibierung der Isoenzyme der Cyclooxygenase (COX) durch die ethanolischen Extrakte von *A. aegerita*, *P. eryngii* und *P. ostreatus*. Auffällig war, dass die beiden *Pleurotus*-Arten eine bevorzugte COX II-Hemmung aufwiesen. Die Widersprüchlichkeit der Werte, nämlich die teilweise negativen Inhibierungswerte und stärkere Hemmung der COX I durch *P. eryngii* bei stärkerer Verdünnung, wurde auf Störungen durch das komplexe Substanzgemisch zurückgeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass diese Störungen bei der Aufreinigung verschwänden, weil sie bei einem Test mit Einzelsubstanzen nicht auftraten (Tabelle IV-2).

Tabelle IV-1 Inhibierung der Cyclooxygenasen durch ethanolische Extrakte verschiedener Basidiomyceten

	Konzentration [µg mL^{-1}]	COX I [%]	Standard-abweichung	COX II [%]	Standard-abweichung
A. aegerita	200	47	7	97	0,2
	20	-1	22	-17	23
P. eryngii	200	-7	14	77	5
	20	23	12	-15	12
P. ostreatus	200	10	15	96	0,2
	20	5	22	28	9

Tabelle IV-2 Inhibierung der Cyclooxygenase II durch Standardsubstanzen (c = 40 µg mL^{-1} in der Reaktionslösung)

Substanz	COX II [%]	Standardabweichung
Palmitoleinsäure	34	14,1
Stearinsäure	14	14,8
Linolsäure	100	n.b.
Ergosterol	79	2,6
Cholesterol	22	4,4
Stigmasterol	36	4,4

Tabelle IV-3 Inhibierung der Cyclooxygenase II durch Pentan-Ether-Extrakte verschiedener Basidiomyceten

	Konzentration [µg mL^{-1}]	COX II [%]
A. aegerita	50	100
P. eryngii	50	100
P. ostreatus	50	100

Alle drei Pilze zeigten in ihren lipophilen Pentan-Ether-Extrakten eine vollständige Inhibierung der Cyclooxygenase II, obwohl sie in einer geringeren Konzentration als die alkoholischen Extrakte eingesetzt worden waren (Tabelle IV-3). Daher wurden zunächst der Hexan- und der Dichlormethan-Extrakt von *P. eryngii* weiter aufgereinigt, um die aktiven Inhaltsstoffe zu isolieren. Auf Verdünnungen, um evtl. Unterschiede in den Aktivitäten zwischen den Pilze aufzeigen zu können, wurde an dieser Stelle aufgrund der hohen Kosten für den Assay verzichtet.

IV.2 Extrakte

IV.2.1 Extraktion von *Pleurotus eryngii*

Die Extraktion der Fruchtkörper von *P. eryngii* wurde wie in III.2.3 beschrieben durchgeführt. Es wurden 1,25 kg gefriergetrocknete Fruchtkörper eingesetzt, die aus 9,3 kg frischen Pilzen erhalten worden waren. Die Trockenmasse betrug demnach 13,5 % der Feuchtmasse. Bei der Extraktion wurden die folgenden Auswaagen erhalten (Tabelle IV-4):

Tabelle IV-4 Auswaage der Extrakte von *P. eryngii*

	Auswaage [g]
Hexan	0,5
Methanol, extrahiert mit Hexan	11,6
Methanol, extrahiert mit Dichlormethan (DCM)	2,6
Methanol, extrahiert mit Essigester (EE)	2,5
Methanol, extrahiert	193,8

Der Methanol-Extrakt spielte nach der Auswaage die bedeutendste Rolle. Die Ausbeute betrug 15,5% des Trockengewichts der Pilze bzw. 2,1% des Frischgewichts. Die Ausbeute an Hexan-Extrakt betrug insgesamt etwa 12 g (1% des Trockengewichts bzw. 0,1% des Frischgewichts), während vom Dichlormethan-Extrakt nur 2,6 g (0,2% des Trockengewichts bzw. 0,03% des Frischgewichts) erhalten wurden.

IV.2.2 ORAC-Assay

Die folgenden Ergebnisse des ORAC-Assays zeigen, dass in der lipophilen Variante des ORAC-Assays die unpolareren Lösungsmittelextrakte von *P. eryngii* höhere antioxidative Kapazitäten aufwiesen als in der wässrigen Variante des Tests (Abbildung IV.3). Für den polaren, in wässrigem Methanol löslichen Extrakt wurden dagegen in der hydrophilen Variante höhere Trolox-Äquivalente gemessen.

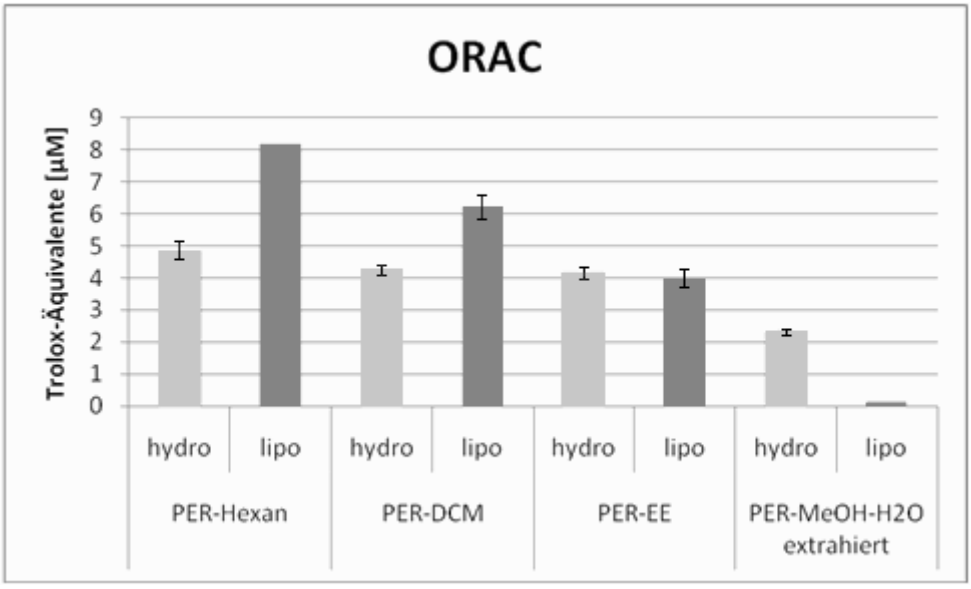

Abbildung IV.3 Hydrophiler (rot) und lipophiler (blau) ORAC-Assay von *P. eryngii* mit den Extrakten aus Tabelle IV-4 (c(Extrakte) = 0,1 mg mL^{-1}).

Die Extrakte wurden alle in einer Konzentration von 0,1 mg mL^{-1} in beiden Tests eingesetzt. Berücksichtigt man die Ausbeuten, so wurden für diese antioxidativen Kapazitäten 10 mg, 50 mg bzw. 0,6 mg getrockneter Pilz für den Hexan-, DCM- und EE- bzw. MeOH-Extrakt pro mL eingesetzt. Dies ergab im lipophilen ORAC TE-Werte von 8,1, 1,2 und 0,8 µmol TE pro g getrocknete Fruchtkörper für den Hexan-, DCM- bzw. EE-Extrakt. Im hydrophilen Assay wies der Hexan-Extrakt 4,9 µmol TE pro g getrocknete Fruchtkörper, DCM- und EE-Extrakt jeweils 0,8 und der Methanol-Extrakt sogar 38,3 µmol TE pro g getrocknete Fruchtkörper auf.

Der Methanol-Extrakt zeigte die höchste antioxidative Aktivität pro Gramm Pilztrockenmasse im ORAC-Assay. Das entscheidende Argument für die Konzentration auf den Hexan- und Dichlormethan-Extrakt bei der weiteren Aufarbeitung war jedoch die hohe Aktivität im COX-Assay. Außerdem war nach den Versuchen mit Ergosterol, Cholesterol und Stigmasterol davon auszugehen, dass andere Sterole ebenfalls aktiv sein würden (Tabelle IV-2). Die Entdeckung neuer bioaktiver Substanzen bzw. neuer Eigenschaften bekannter Substanzen schien hier gewiss zu sein.

IV.2.3 Comet-Assay

Als Testsystem wurden neben *in vitro*-Assays auch Zellen herangezogen. Für den Comet-Assay wurden ein methanolischer Extrakt von *P. eryngii* (durch Kaltextraktion gewonnen) und ein Soxhlet-Extrakt von *A. aegerita* eingesetzt [83].

Der Comet-Assay ergab, dass der methanolische Extrakt von *P. eryngii* in einer Konzentration von 0,4 mg mL^{-1} in der Petrischale eine protektive Wirkung gegenüber der Schädigung mit Wasserstoffperoxid aufwies, da das Tailmoment mit 8,88 gegenüber 15,13 deutlich geringer war (Tabelle IV-5). In der niedrigeren Konzentration (0,1 mg mL^{-1}) war keine zellprotektive Wirkung mehr zu beobachten. Dagegen wurde bei *A. aegerita* in der höheren Konzentration ein höheres Tailmoment gemessen. Der Extrakt wies damit in einer Konzentration von 0,4 mg mL^{-1} keine protektiven Eigenschaften auf. Dies könnte u.a. auch auf die Anwesenheit prooxidativer Substanzen im Extrakt hinweisen.

Tabelle IV-5 Comet-Assay mit methanolischen Extrakten

Kontrollen	H_2O_2	Zahl der ausgewerteten Zellen	Tailmoment	SEM
Medium	ohne	483	5,66	0,58
	mit	597	14,12	0,75
DMSO	ohne	658	6,94	0,55
	mit	633	15,13	0,73
Proben	**Konzentration**			
A. aegerita	0,1 mg mL^{-1}	1084	11,30	0,50
	0,4 mg mL^{-1}	1122	13,70	0,57
P. eryngii	0,1 mg mL^{-1}	1350	14,63	0,53
	0,4 mg mL^{-1}	1380	8,88	0,35

IV.2.4 Xanthinoxidase-Assay

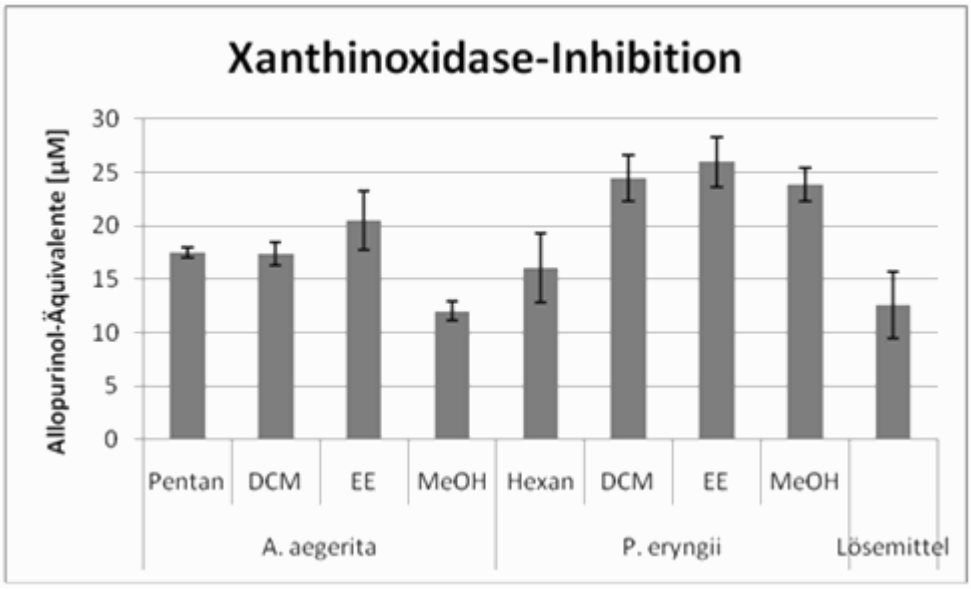

Abbildung IV.4 Xanthinoxidase-Inhibierung durch *A. aegerita* und *P. eryngii* (c(Extrakte) = 1 mg mL^{-1}).

Die Inhibierung der Xanthinoxidase wurde an den Extrakten von *A. aegerita* und *P. eryngii* durchgeführt. Eine Störung durch Substanzen aus den Extrakten, die ebenfalls bei der Bestimmungswellenlänge 293 nm absorbierten, wurde durch zwei Kontrollen überprüft und konnte nachfolgend ausgeschlossen werden (vgl. III.1.4).

Bei beiden Extrakten war eine höhere Inhibierung in den Ethylacetat-Extrakten zu erkennen. Rechnet man die Aktivitäten auf die Ausbeuten der Extraktion um, so erkennt man, dass die Aktivitäten der Dichlormethan- und Ethylacetat-Extrakte von

beiden Pilzen mit etwa 1,0 bis 1,6 µmol Allopurinol-Äquivalenten pro g Trockenmasse relativ gering war. Die Werte für den Pentan-Extrakt lagen bei *A. aegerita* bei 6,3 und bei *P. eryngii* bei 4,8 µmol Allopurinol-Äquivalenten pro Gramm. Die Methanol-Extrakte wiesen die höchste Aktivität auf: 17,3 bzw. 110,8 µmol Allopurinol-Äquivalenten pro g Trockenmasse für *A. aegerita* bzw. *P. eryngii*.

Da jedoch die Cyclooxygenase als das interessantere Zielenzym angesehen wurde und die Messung der lipophilen Fraktionen in dem wässrigen System schwierig war, wurde auf eine Bestimmung in den Unterfraktionen verzichtet.

IV.3 HSCCC-Trennung von Extrakten aus Pleurotus eryngii

IV.3.1 Hexan-Extrakt von *Pleurotus eryngii*

IV.3.1.1 Trenneigenschaften der HSCCC

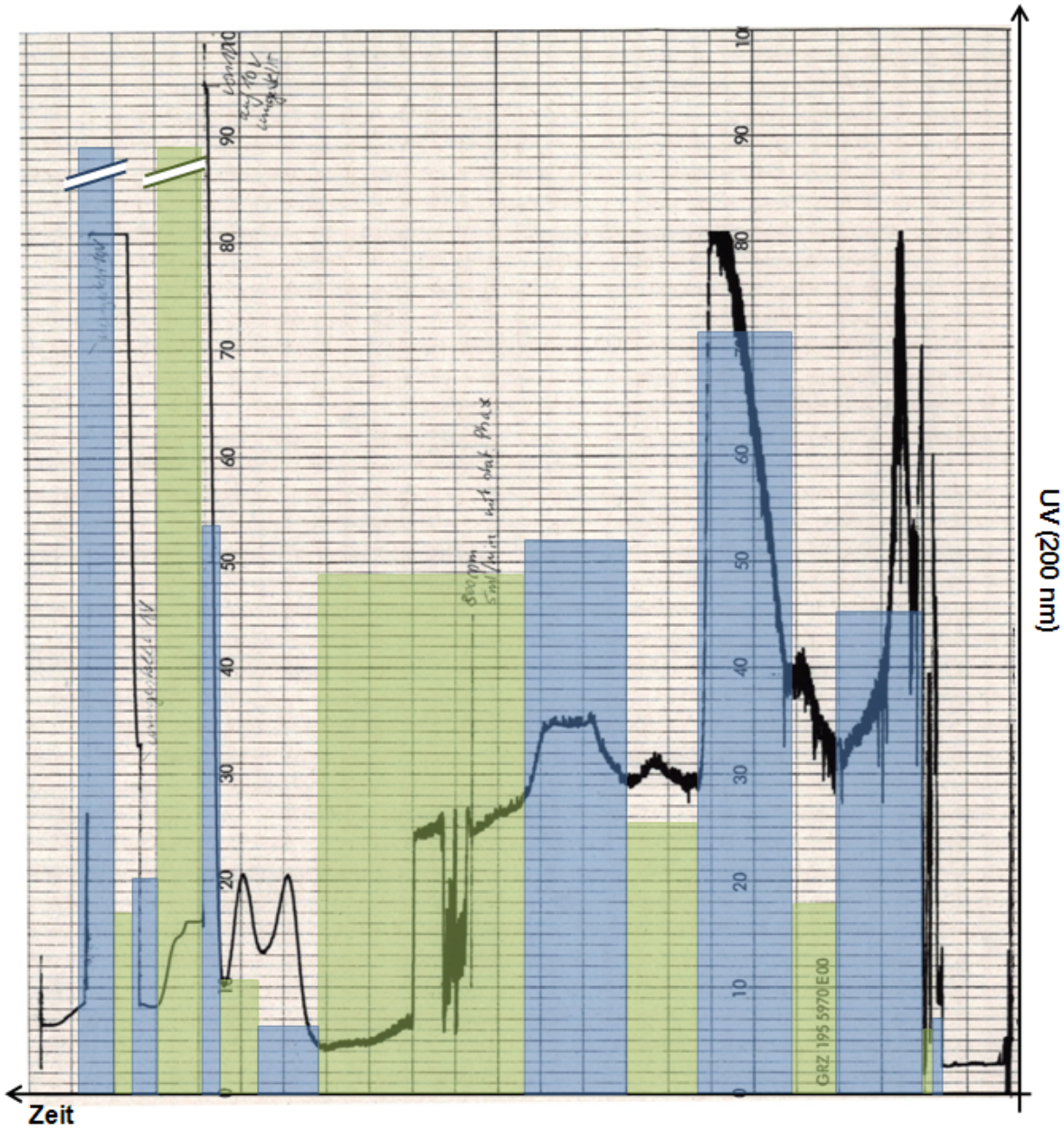

Abbildung IV.5 HSCCC-Chromatogramm des Hexan-Extraktes von *P. eryngii* bei 200 nm. Die Fraktionen sind mit blauen bzw. grünen Balken eingezeichnet, die Balkenhöhe deutet die relative Auswaage an.

Abbildung IV.5 zeigt das Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Hexan-Extraktes von *P. eryngii*. Die grünen und blauen Balken zeigen den Bereich der Fraktion, die Höhe die relative Auswaage an. Die Fraktionen 12 und 15 sind wegen

sehr hoher Ausbeuten nicht maßstabsgerecht eingetragen. Die Fraktionsbildung erfolgte vor allem mit Hilfe von DC-Analytik (vgl. Abbildung V.1 und Abbildung V.2 im Anhang).

Auf den Durchbruch nach 45 min folgten zunächst drei nicht basisliniengetrennte, scharfe Peaks mit hoher UV-Aktivität (Fraktion 1 und 2) an. In der Fraktion 5 war wiederum eine hohe UV-Aktivität zu sehen. Nach 260 min wurde die Elution auf Extrusion umgestellt. In diesem Bereich (Fraktion 8) war nur eine sehr geringe UV-Aktivität zu erkennen. Ab Fraktion 9 eluierten in einem nicht basisliniengetrennten Signal weitere Substanzen, bevor die Hauptmasse des Extrakts im letzten Peak (Fraktion 15) erschien (vgl. Tabelle IV-7).

IV.3.1.1.1 Untersuchung der underivatisierten HSCCC-Fraktionen mittels GC-MS

Die einzelnen Fraktionen wurden underivatisiert nach III.2.5.1 mittels GC-FID und nach III.2.5.2 mittels GC-MS auf einer HP-5-Kapillarsäule vermessen. Ein typisches Chromatgramm ist in Abbildung IV.6 zu sehen, dass Fraktion 13 mit einigen Fettsäuremethylestern (26-33 min) und einigen Sterolen (45-55 min) zeigt.

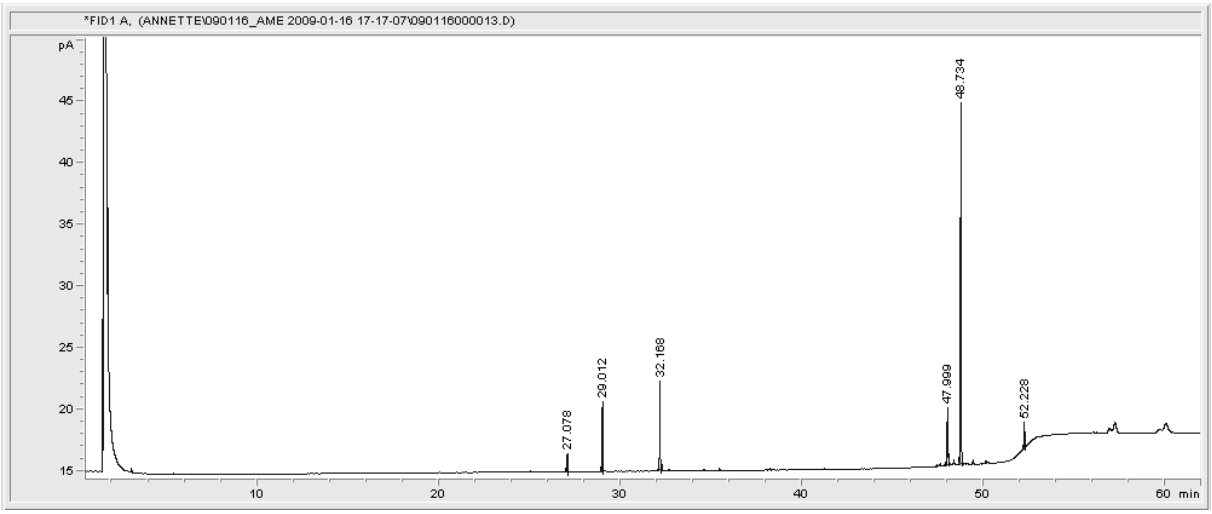

Abbildung IV.6 GC-FID-Chromatogramm der HSCCC-Fraktion 13 des Hexan-Extraktes von *P. eryngii*. Die Geräteparameter sind in III.2.5.1 aufgeführt.

Es wurden die freien Säuren und die Methylester der Pentadecan-, Palmitin- und Ölsäure gefunden sowie freie Linolsäure. Die Positionen der Doppelbindungen an C9 bei der Öl- und C9 und C12 bei der Linolsäure wurden mit DMOX-Derivaten bestätigt (vgl. Abbildung V.11 und Abbildung V.12 im Anhang). In der Fraktion 3 konnte ein

Monoacylglycerol mit Hilfe der Spektrenbibliothek detektiert werden (Abbildung V.3 im Anhang).

Unter den Sterolen konnte das Vorhandensein von Ergosterol (Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, Kovatsindex KI = 3196) und Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (KI = 3155) in den Fraktionen 11 und 12 durch den Vergleich mit Standards bewiesen werden (Abbildung IV.7 und Abbildung IV.9). Zur Nomenklatur der Sterole vergleiche Abbildung IV.8.

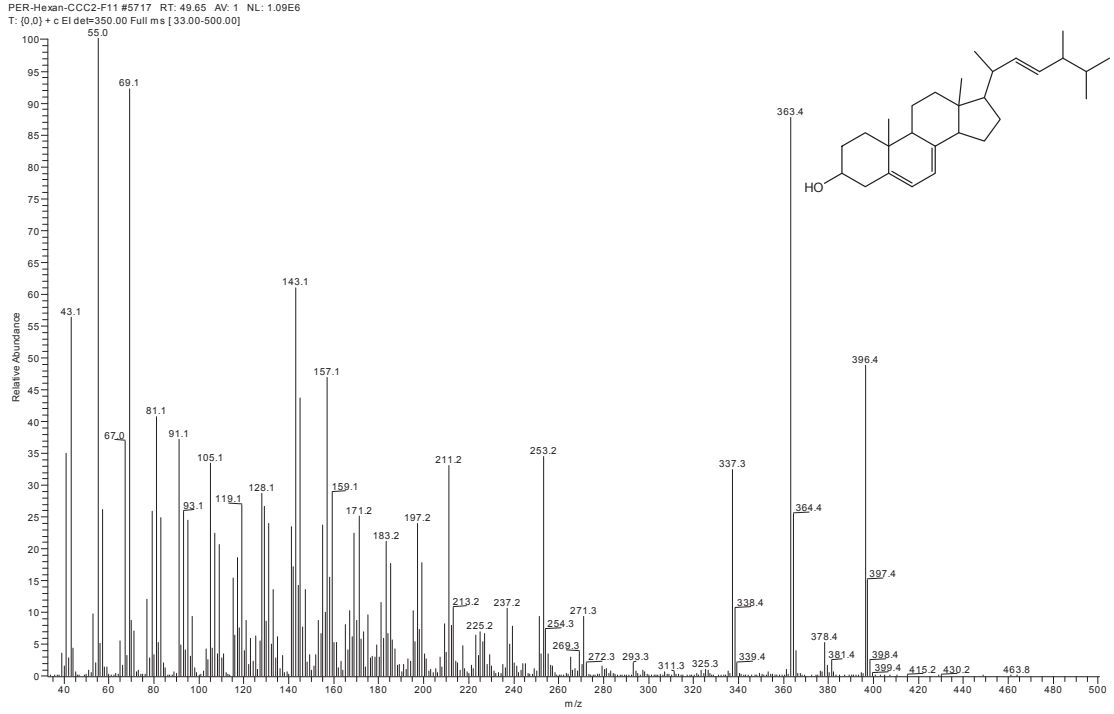

Abbildung IV.7 Massenspektrum bei KI = 3196 (Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, Ergosterol).

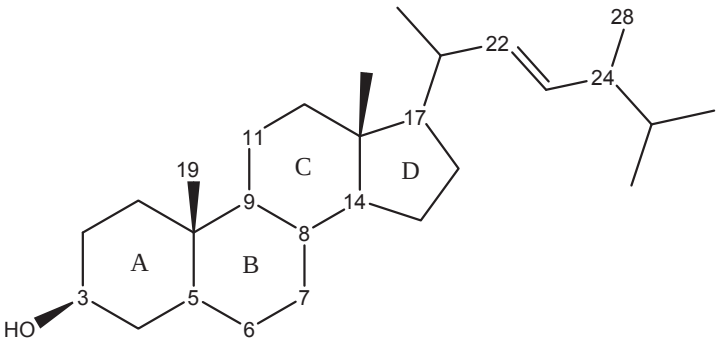

Abbildung IV.8 Nummerierung und typische Stereochemie von Mykosterolen.

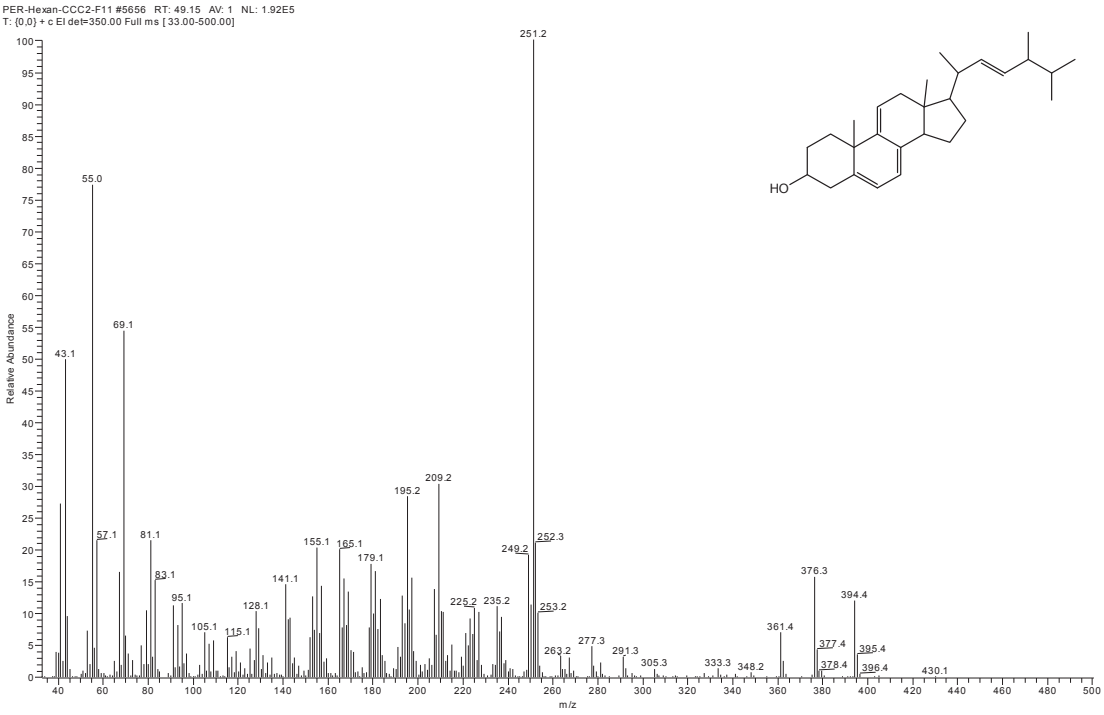

Abbildung IV.9 Massenspektrum bei KI = 3155 (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, Ergostatetraenol).

Zusätzlich wurde durch Spektrenvergleich das Vorhandensein von Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen, Ergosta-7,22-dien-3-ol (vgl. IV.3.2.1.1), Ergosta-5,7-dien-3-ol, Fungisterol und Cerevisterol belegt.

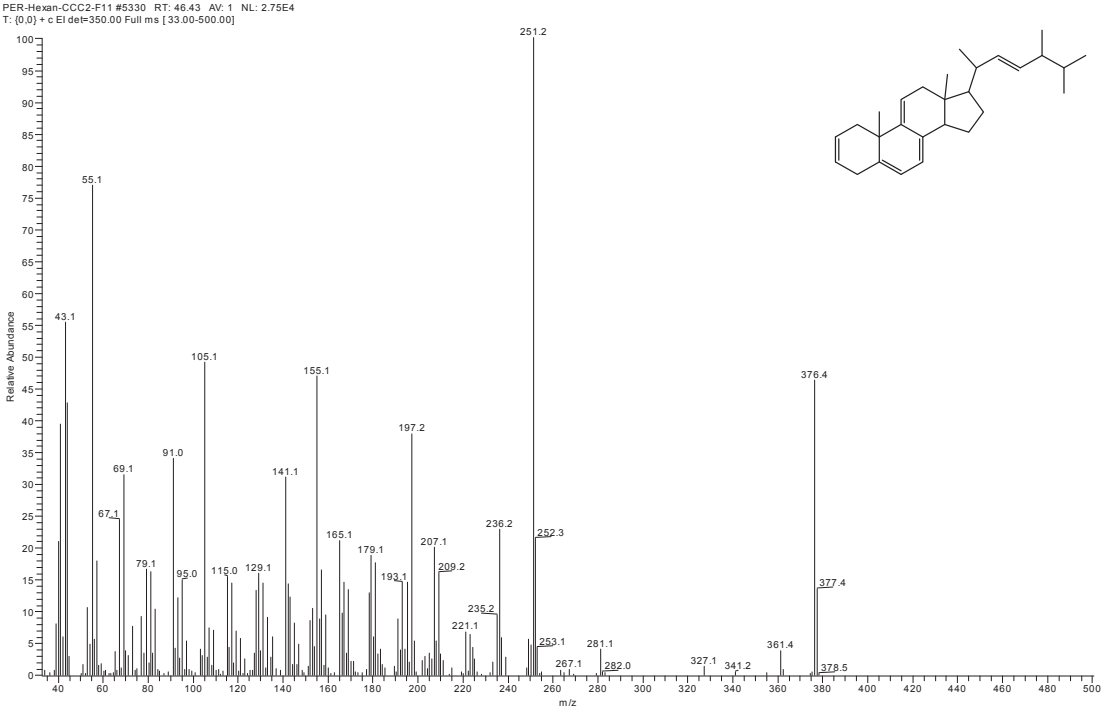

Abbildung IV.10 Massenspektrum bei KI = 2954 (Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen).

In Fraktion 10 und 11 wird bei einem Kovatsindex von KI = 2954 ein Steroid mit einem Molekülion von m/z = 376 detektiert (Abbildung IV.10). Massenfragmente bei höheren Massen sind nicht zu erkennen. Die Ionen bei m/z = 316 und 251 erscheinen durch die Abspaltung von einer Methylgruppe bzw. der C_9H_{17}-Seitenkette. Das Fragment bei m/z = 209 entsteht durch Abspaltung von Seitenkette und D-Ring. Ein Fragment bei m/z = 322, das durch eine Retro-Diels-Alder-Reaktion des A-Rings entstände [84], fehlt, so dass von einer Doppelbindung in C5 ausgegangen werden muss. Bei der Silylierung mit TMSIM veränderten sich weder Retentionszeit noch Massenspektrum, so dass das Vorhandensein einer Hydroxygruppe ausgeschlossen wurde. Das Steroid wird daher nach Vergleich mit [85] als Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen identifiziert.

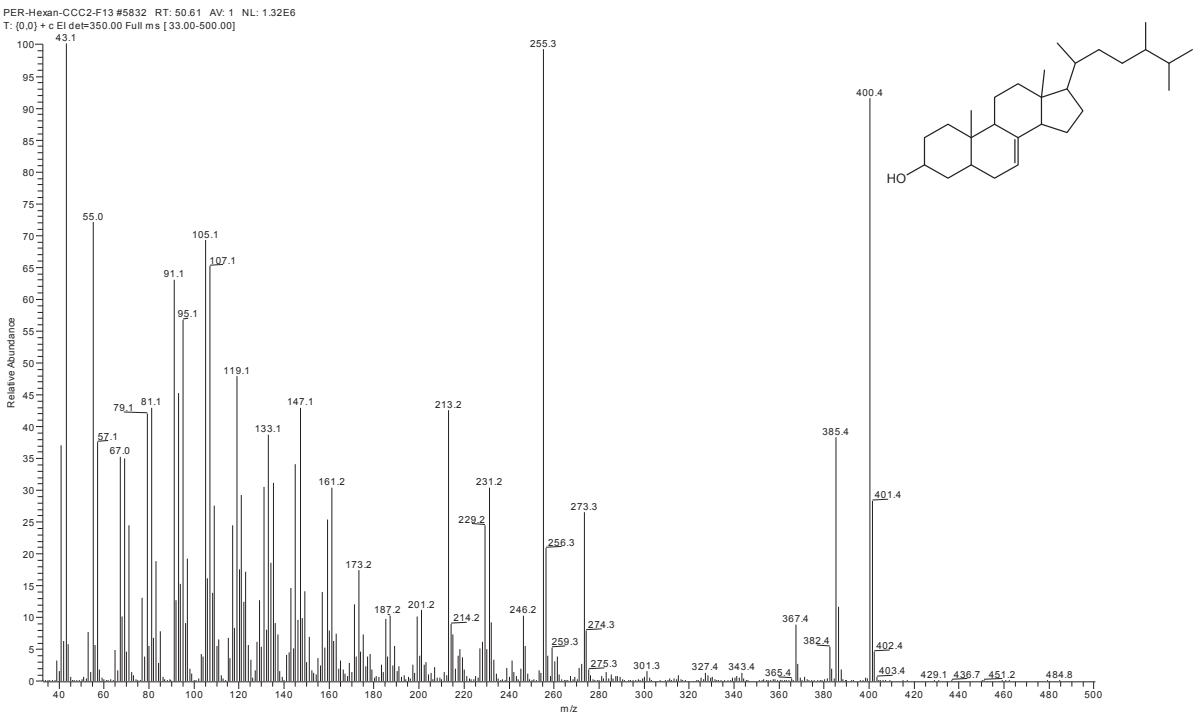

Abbildung IV.11 Massenspektrum bei KI = 3270 (Ergost-7-en-3-ol, Fungisterol).

Bei einem Kovatsindex von KI = 3270 wird in Fraktion 13 ein Molekülion von m/z = 400 detektiert (Abbildung IV.11). Das Massenfragment bei m/z = 382 weist auf eine Hydroxygruppe hin. Die Ionen bei m/z = 273 und 255 werden als Abspaltung einer C_9H_{19}-Seitenkette bzw. der Seitenkette und Wasser interpretiert. Ionen bei m/z = 231 und 213 weisen auf die zusätzliche Abspaltung des D-Ringes hin. Doppelbindungen im D-Ring, in Position 8(14) oder in der Seitenkette können

demnach ausgeschlossen werden. Der Vergleich mit Bibliotheksspektren und mit den in [85] berichteten Werten führt zur Identifizierung als Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol).

Triole wie das Cerevisterol (Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol, KI = 3634), das in Fraktion 3 von der CCC eluiert und durch den Vergleich mit einem Literaturspektrum [85] identifiziert worden ist, haben aufgrund ihrer hohen Zahl von polaren funktionellen Gruppen eine geringe Flüchtigkeit und sehr hohe Retentionszeiten. In der GC sind daher nur wenige dieser Stoffe detektierbar. Das Massenspektrum von Cerevisterol (Abbildung IV.12) weist kein Molekülion bei m/z = 430 auf.

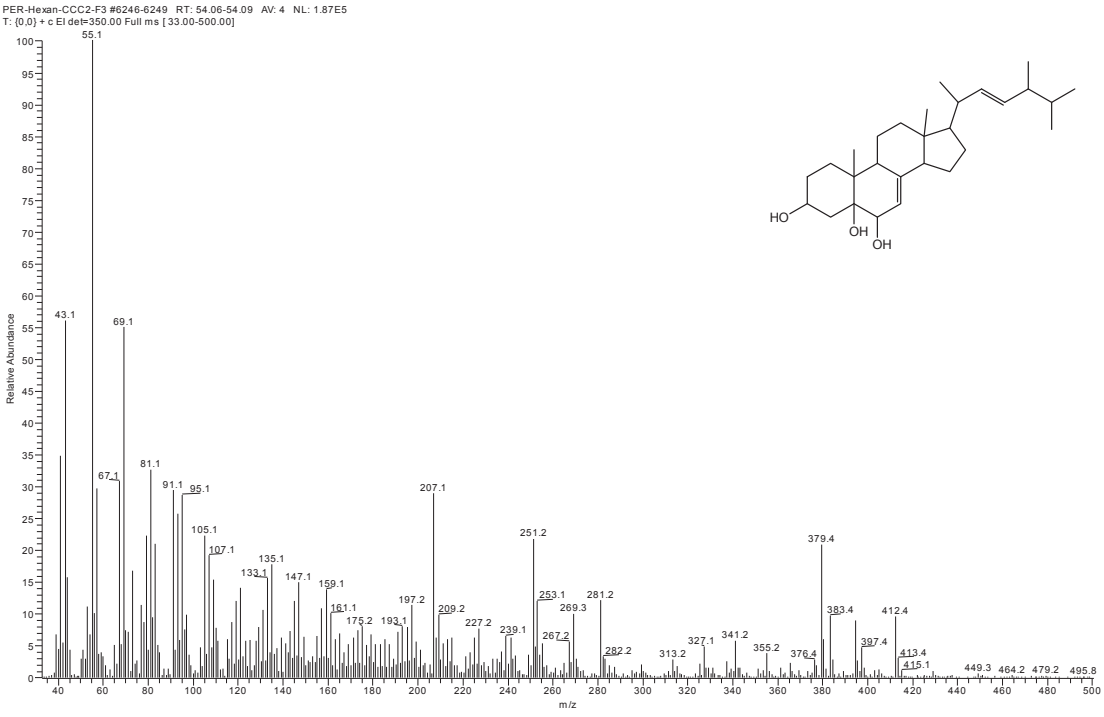

Abbildung IV.12 Massenspektrum bei KI = 3634 (Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol, Cerevisterol).

Das schwerste Massenfragment ist m/z = 412, das durch die Abspaltung von Wasser aus dem Molekülion entsteht. Dies ist typisch für tertiäre Alkohole wie es bei Cerevisterol an C5 der Fall ist. Das Ion bei m/z = 394 entspringt der zweimaligen Abspaltung von Wasser. Folgt darauf die Abspaltung einer Methylgruppe, so entsteht m/z = 379. Die Ionen bei m/z = 287, 269 und 251 sind durch die Abspaltung von ein, zwei bzw. drei Molekülen Wasser und der C_9H_{17}-Seitenkette zu erklären.

Eine tabellarische Zusammenfassung aller detektierten Signale in den gemessenen Fraktionen befindet sich im Anhang (Tabelle V-1).

IV.3.1.2 Tests auf Bioaktivität

Abbildung IV.13 und Tabelle IV-6 zeigen die Ergebnisse des hydrophilen und lipophilen ORAC-Assays bzw. der COX II-Inhibierung der CCC-Fraktionen.

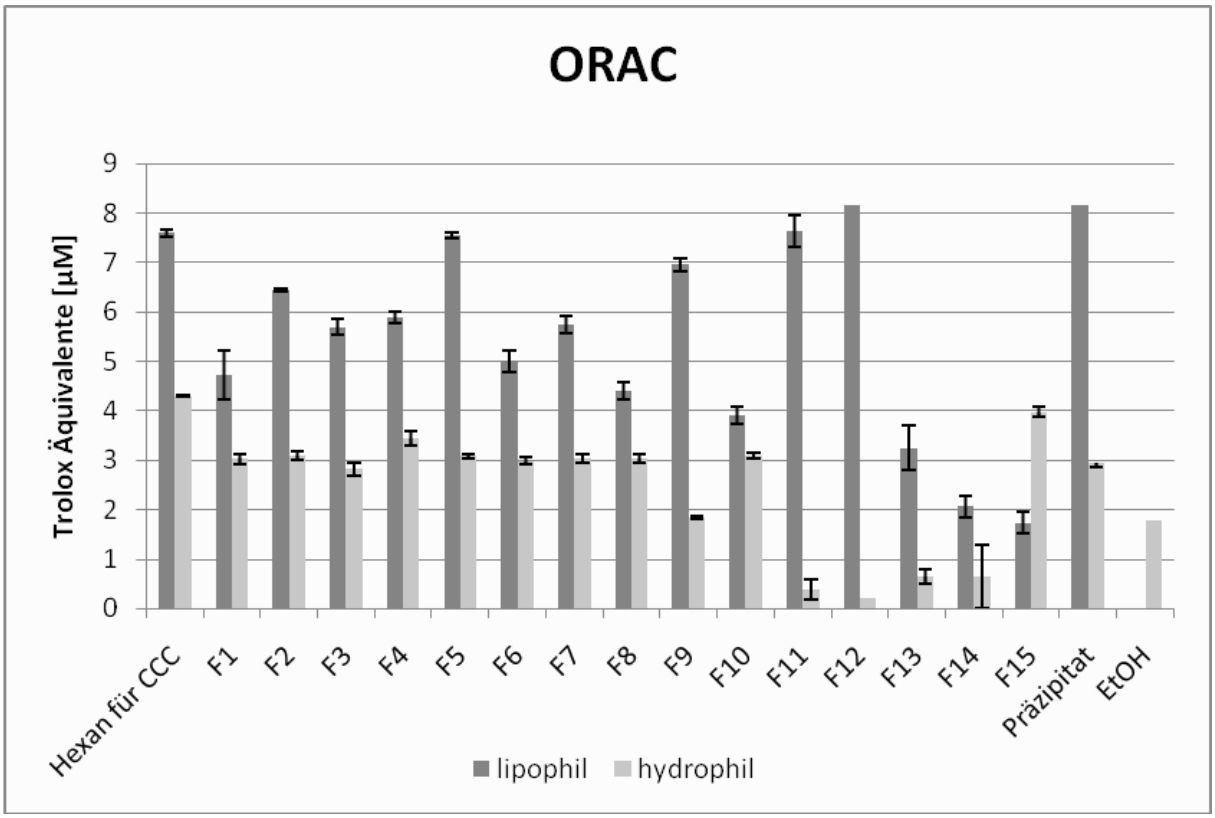

Abbildung IV.13 Ergebnisse des ORAC-Tests für die CCC-Fraktionen des Hexan-Extrakts

Tabelle IV-6 Cyclooxygenase II-Inhibierung der CCC-Fraktionen des Hexan-Extraktes aus *P. eryngii* (c = 40 µg mL^{-1} in Reaktionslösung)

Fraktion	Inhibierung [%]	Standard-abweichung	Fraktion	Inhibierung [%]	Standard-abweichung
Hexan für CCC	38,8	8,5	F9	-33,8	25,9
F1	32,9	3,8	F10	-19,7	15,9
F2	-18,2	53,8	F11	-22,0	14,5
F3	21,0	12,5	F12	-2,9	1,0
F4	22,3	9,5	F13	-32,9	9,2
F5	100,0	n.b.	F14	-51,3	18,5
F6	70,2	14,0	F15	-37,6	34,9
F7	23,7	11,2	Präzipitat	-50,6	17,3
F8	32,4	26,2			

Fasst man die Erkenntnisse schematisch zusammen, ergibt sich Tabelle IV-7. Ein Pluszeichen bei den ORAC-Werten bedeutet eine antioxidative Kapazität bis zu 2 µM TE, ++ bedeutet eine Kapazität von 2-4 µM, +++ 4-6 µM und ++++ mehr als 6 µM. Bei der COX II-Inhibierung steht ein Pluszeichen für eine jeweils 25 %ige Hemmung. Negative Inhibierungen wurden als n.b. in die Tabelle eingetragen. Aufgeführt wurden nur identifizierte Verbindungen, ein n.b. in dieser Spalte steht für unbekannte Verbindungen. Die Skala der Menge beruht auf der Fläche des FID-Signals. Ein Pluszeichen bedeutet dabei eine Fläche zwischen 2 und 20 pA*s, ++ steht für 20 bis 50 pA*s, +++ für 50 bis 100 pA*s und ++++ für mehr als 100 pA*s. Flächen kleiner als 2 pA*s werden als Spuren bezeichnet. Während in der Spalte „Menge“ also der Gehalt einer einzelnen Verbindung angegeben wird, wird in der letzten Spalte „Auswaage“ die Ausbeute der gesamten Fraktion aufgeführt. Bei der Interpretation der Daten muss jedoch beachtet werden, dass nicht alle Komponenten einer Fraktion flüchtig genug für eine gaschromatographische Analyse sind.

Die Tabelle zeigt dennoch einige Korrelationen auf. Die ORAC-Werte sind im lipophilen ORAC deutlich höher als im hydrophilen ORAC. Dieser Unterschied ist insbesondere in den sterolhaltigen Fraktionen 11 und 12 groß. Die Sterole werden offenbar durch methyliertes β-Cyclodextrin in Lösung gehalten und tragen zur antioxidativen Kapazität im lipophilen ORAC bei. Die Beiträge der Fraktionen 11 und 12 sind mutmaßlich so groß, weil dort die hoch ungesättigten Sterole Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol und Ergosterol auftreten. Das in Fraktion 13 als Hauptkomponente auftretende Fungisterol ist dagegen nur einfach ungesättigt und die antioxidative Aktivität ist in dieser Fraktion geringer als in den vorhergehenden. Versuche mit Einzelsubstanzen, die diesen Trend bestätigen, werden in Abschnitt IV.4 dargestellt.

Die freien Fettsäuren liegen bei dem pH-Wert des ORAC-Assays von 7,4 wahrscheinlich zum Teil deprotoniert vor, so dass die ungesättigten Säuren, insbesondere Linolsäure, durch Grenzflächeneffekte zur antioxidativen Kapazität auch im hydrophilen ORAC beitragen können. Unbekannt bleibt dagegen, welche Verbindungen für die antioxidativen Aktivitäten in den Fraktionen 1 bis 4 verantwortlich sind.

Tabelle IV-7 Zusammenfassung der bioaktiven Eigenschaften der HSCCC-Fraktionen des Hexan-Extraktes von *P. eryngii*

Fraktion	ORAC lipophil	ORAC hydrophil	COX II Inhibierung	Verbindung	Menge	Auswaage [mg]
1	+++	++	++	n.b.		3,5
2	++++	++	n.b.	n.b.		2,9
3	+++	++	+	Monoacylglycerol	+	21,4
				Cerevisterol	+	
4	+++	++	+	n.b.		8,5
5	++++	++	++++	Linolsäure	+++	33,9
6	+++	++	+++	Linolsäure	Spuren	11,9
7	+++	++	+	Palmitinsäure	+	24,6
				Linolsäure	++	
8	+++	++	++	Palmitinsäure	++	23,0
				Linolsäure	Spuren	
9	++++	+	n.b.	Phthalat	+	3,0
10	++	++	n.b.	Pentadecansäure	Spuren	5,1
				Ölsäure	Spuren	
				Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen	Spuren	
11	++++	+	n.b.	Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen	Spuren	25,2
				Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	+	
				Ergosterol	+++	
12	++++	+	n.b.	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	Spuren	63,6
				Ergosterol	++	
13	++	+	n.b.	Pentadecansäuremethylester	+	9,7
				Palmitinsäuremethylester	+	
				Ölsäuremethylester	+	
				Ergosta-7,22-dien-3-ol	+	
				Fungisterol	+++	
14	++	+	n.b.	n.b.		7,9
15	+	++	n.b.	n.b.		646,5

Die Inhibierung der Cyclooxygenase II wird in den Fraktionen 5 bis 8 auf die Anwesenheit von Linolsäure zurückgeführt. Dass Linolsäure COX II inhibiert, ist bereits Tabelle IV-2 zu entnehmen. Das Auftreten negativer Hemmungswerte wird in Abschnitt IV.8.2 ausführlich diskutiert. Unbekannt bleibt, welche Stoffe in den Fraktionen 1, 3 und 4 inhibierend wirken und ob Cerevisterol dazugehört.

IV.3.2 Dichlormethan-Extrakt von *Pleurotus eryngii*

IV.3.2.1 Trenneigenschaften der HSCCC

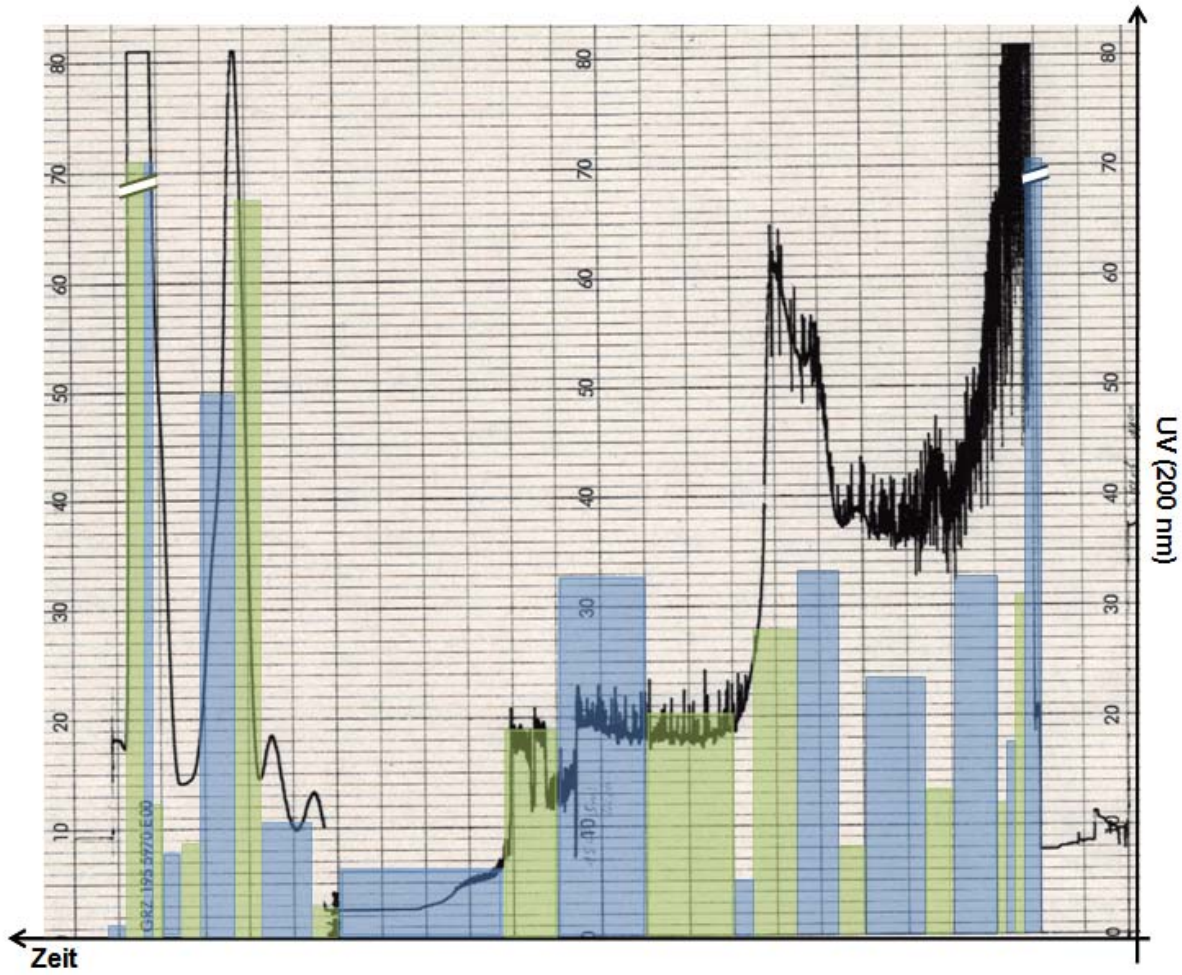

Abbildung IV.14 HSCCC-Chromatogramm des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii* bei 200 nm. Die Fraktionen sind mit blauen bzw. grünen Balken eingezeichnet, die Balkenhöhe deutet die relative Auswaage an.

Das Chromatogramm der HSCCC-Trennung des Dichlormethan-Extraktes (Abbildung IV.14) ähnelt dem des Hexan-Extraktes. Die der Fraktionseinteilung zugrunde liegende DC-Analytik ist im Anhang einzusehen (Abbildung V.4 und Abbildung V.5). Auch hier erfolgte nach etwa 45 min der Durchbruch mit einer hohen UV-Aktivität. Unterschiedlich war vor allem der Bereich vor der Umstellung auf Extrusion, wo im DCM-Extrakt keine Peaks zu erkennen waren. Die DC-Profile dieses Bereiches führten aber dennoch zur Bildung von drei Fraktionen (Fraktionen 10 bis 12). Nach Umstellung auf Extrusion eluierten zunächst zwei Peaks, die in den Fraktionen 13 und 14 aufgefangen wurden. Fraktion 15 war nahezu leer, was mit der fehlenden UV-Aktivität des Chromatogramms

korrespondierte. Der letzte Teil des Chromatogramms war mit dem des Hexan-Extraktes praktisch identisch: zwei kleine vor einem großen Peak mit Schulter und einem letzten hohen Signal, in dem ebenfalls wie beim Hexan-Extrakt die Hauptmasse des eingesetzten Materials eluierte (Fraktion 24). Die Balken für die Fraktionen 23 und 24 sowie 1 sind daher auch nicht maßstabsgerecht. Tabelle IV-8 zeigt die Ausbeuten dieser Trennung für die einzelnen Fraktionen, Abbildung IV.25 typische Chromatogramme.

Tabelle IV-8 Auswaage der HSCCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extrakts von *P. eryngii*

Fraktion	Masse [mg]	Fraktion	Masse [mg]	Fraktion	Masse [mg]
1	53,4	10	8,3	19	14,7
2	9,2	11	1,5	20	2,5
3	5,2	12	6,0	21	2,2
4	3,5	13	9,7	22	3,6
5	9,7	14	5,6	23	37,4
6	3,9	15	1,8	24	227,3
7	7,0	16	0,8	25	0,3
8	2,4	17	3,1	Präzipitat	243,0
9	9,9	18	20,0	Summe	692,0

Das Präzipitat bestand zum überwiegenden Teil aus Ergosterol. Die NMR-Daten sind im Anhang (Abbildung V.16 und Abbildung V.21) zu finden. Die folgende Abbildung zeigt das MS-Spektrum der silylierten Probe (Abbildung IV.15).

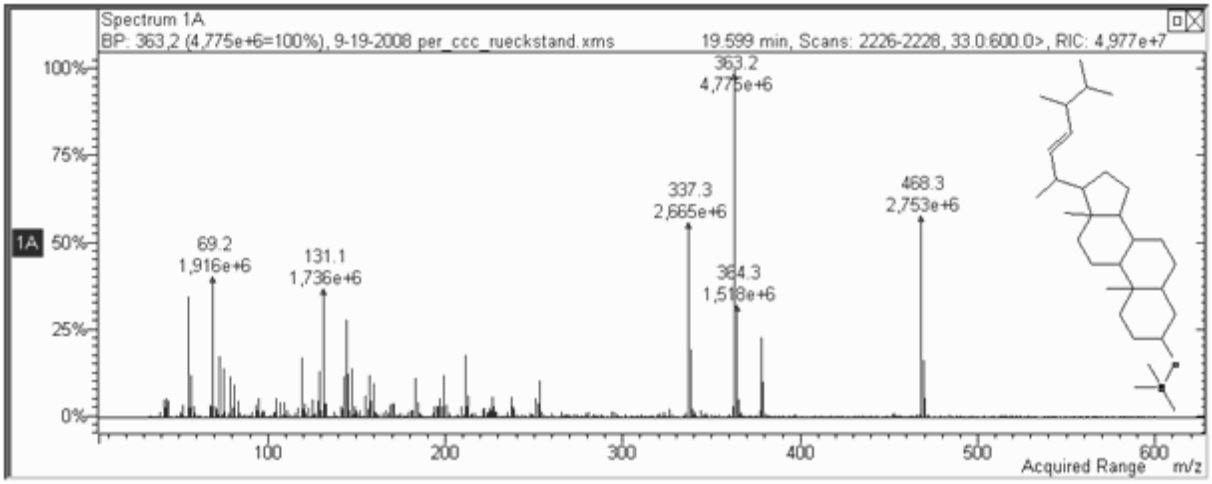

Abbildung IV.15 Massenspektrum des Ergosteroltrimethylsilylethers aus dem Präzipitat.

IV.3.2.1.1 Untersuchung der underivatisierten HSCCC-Fraktionen mittels GC-MS

Die Fraktionen des DCM-Extraktes wurden wie die Fraktionen des Hexan-Extraktes zunächst per GC-FID und GC-MS untersucht. Dabei wurden zusätzlich zu den bereits im Hexan-Extrakt identifizierten Fettsäuren auch Margarin- und Stearinsäure sowie ein Isomer der Ölsäure gefunden. Eine Übersicht findet sich im Anhang in Tabelle V-2.

Neben den bereits im Hexan-Extrakt gefundenen Sterolen Ergosterol, Ergost-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, Fungisterol und Cerevisterol sowie dem Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen konnten hier weitere Sterole mit einem Molekülion bei m/z = 398 bzw. m/z = 394 detektiert werden (Abbildung IV.16 bis Abbildung IV.18).

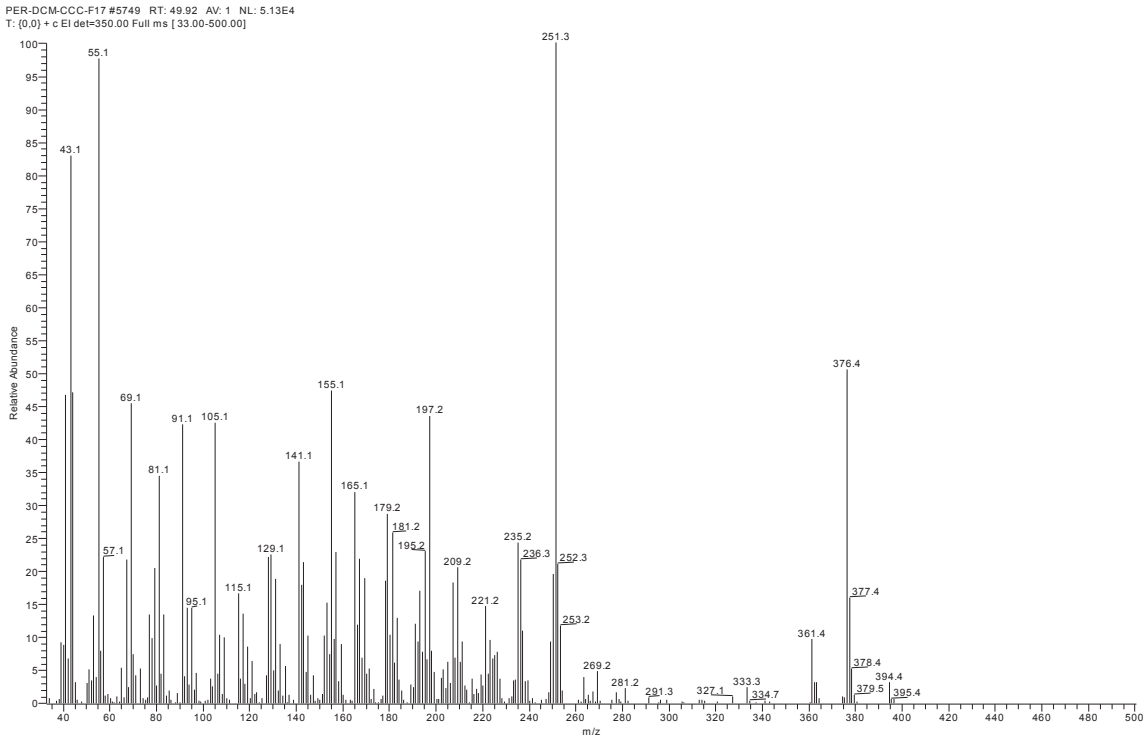

Abbildung IV.16 Massenspektrum bei KI = 3214.

Für das zweite Sterol mit m/z = 394 (Abbildung IV.16) kommen prinzipiell ein Isomer des Tetraenols, ein Ketosterol mit drei Doppelbindungen oder ein Diol, dessen Molekülion nicht sichtbar ist, in Frage. Ein Ketosterol scheint unwahrscheinlich, weil die typischen Fragmentionen (z.B. M-CH_2CO bei α,β-ungesättigten Sterolen [84], ein starkes Ion bei m/z = 269 [86]) nicht zu finden sind. Ein Diol erscheint wenig wahrscheinlich, weil es zu einem früheren Zeitpunkt als Fraktion 17 bei der HSCCC

eluieren sollte. Das mutmaßliche Tetraenol eluiert nach Ergost-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol und Ergosterol. Debieu [87] untersuchte die Zwischenprodukte der Ergosterolbiosynthese in *Fusarium spp*. und veröffentlichte eine Elutionsreihenfolge der acetylierten Sterole auf einer OV-1 Säule. Neben Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol tritt Ergosta-5,8,14,22-tetraen-3-ol auf, welches allerdings zwischen dem $\Delta^{5,7,9(11),22}$-Sterol und Ergosterol eluiert. Da sich $\Delta^{14,22}$-Strukturen durch die Abspaltung der Seitenkette als Neutralmolekül auszeichnen [88] und ein Fragment bei m/z = 268 $(M-126)^+$ nicht vorhanden ist, werden die Strukturen $\Delta^{5,8,14,22}$ und $\Delta^{5,7,14,22}$ ausgeschlossen. Im Biosyntheseweg des Ergosterols tritt außerdem Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol auf [89], das jedoch durch Spektrenvergleich ausgeschlossen werden kann.
Das mutmaßliche Ergostatetraenol besitzt aufgrund des Basispeaks bei m/z = 251, der sich auf die Abspaltung einer C_9H_{17}-Seitenkette aus dem Ion m/z = 376 zurückführen lässt, und aufgrund eines Fragmentes bei m/z = M-61 = 333 (Abspaltung von C25 bis C27 [89]) wahrscheinlich eine Doppelbindung an C22. Eine $\Delta^{14,22}$–Struktur kann wegen des Fehlens von $(M-126)^+$ sicher, eine $\Delta^{5,7}$-Struktur wegen des Fehlens von $(M-59)^+$ wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Die genaue Struktur dieser Verbindung bleibt jedoch unbekannt.

Das Ergostadienol mit KI = 3206 weist ein deutliches Molekülion bei m/z = 398 auf (Abbildung IV.17). Die Fragmentionen bei m/z = 383, 380 und 365 werden auf die Abspaltung einer Methylgruppe, eines Wassermoleküls bzw. von beidem zurückgeführt. Durch die Abspaltung von Wasser und die allylische Abspaltung der Isopropylgruppe aus der Seitenkette entsteht m/z = 337. Das Fragment m/z = 255 weist auf die Abspaltung einer C_9H_{17}-Seitenkette aus m/z = 380 hin. Das Ion bei m/z = 271 scheint einer ungesättigten Seitenkette zu widersprechen. Doppelpeaks bei m/z = 271 und 273 bzw. m/z = 255 und 253 sind jedoch typisch für Seitenketten, die in C22 ungesättigt vorliegen [90]. Das dabei das leichtere Ion überwiegt, ist charakteristisch für nicht konjugierte Δ^7-Steroide, die keine weiteren Substituenten in den Ringen B, C und D aufweisen [91]. Das Ion m/z = 271 ist also kennzeichnend für die Verbindung und entsteht durch die Abspaltung der ungesättigten Seitenkette mit zusätzlichem Wasserstofftransfer.

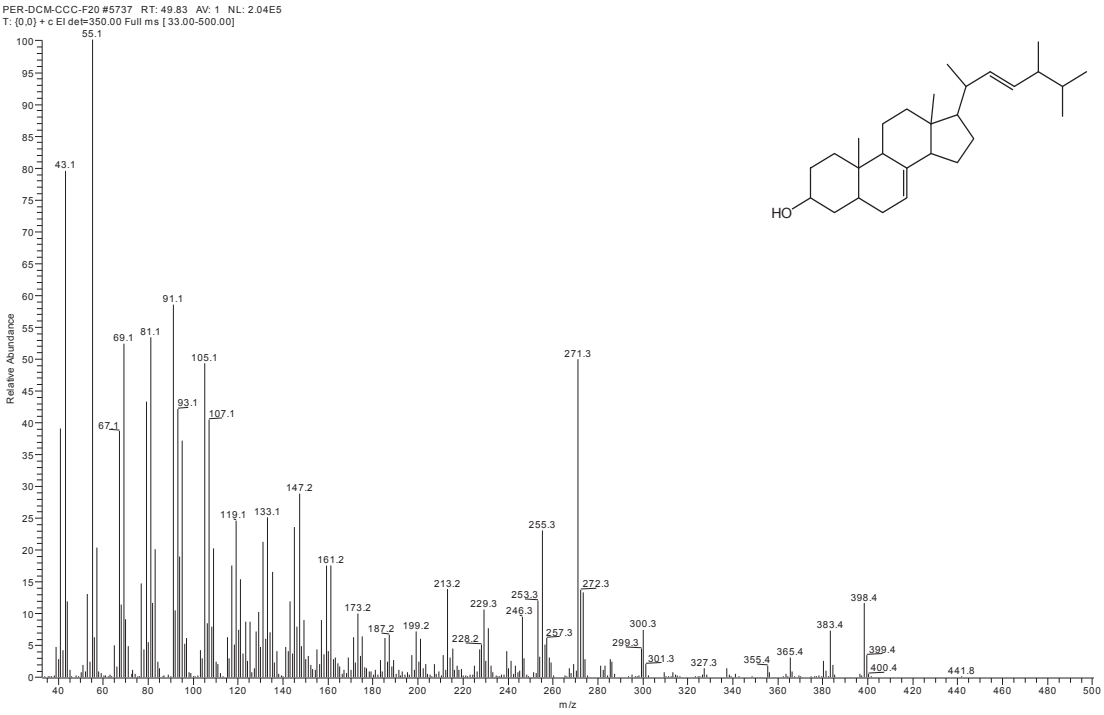

Abbildung IV.17 Massenspektrum bei KI = 3206 (Ergosta-7,22-dien-3-ol).

Der Vergleich mit [85, 86] bestätigt, dass es sich um Ergosta-7,22-dien-3-ol handelt. Nach Acetylierung konnte dieses Sterol bei KI = 3364 detektiert werden (Abbildung V.6 im Anhang). Das Massenspektrum des acetylierten Sterols stimmt mit dem Literaturspektrum überein [87] und unterscheidet sich deutlich von den dort ebenfalls publizierten Werten für die $\Delta^{8,22}$, $\Delta^{8,14}$, $\Delta^{8,24(28)}$, $\Delta^{5,7}$ und $\Delta^{7,24(28)}$ Sterole. Ergosta-5,8-dien-3-olacetat konnte durch den Vergleich mit einem Standard ausgeschlossen werden.

Das zweite Ergostadienol eluiert bei KI = 3260 (Abbildung IV.18). Das Molekülion ist stärker ausgeprägt (m/z = 398) und auch das Ion bei m/z = 365 nach Wasser- und Methylgruppenabspaltung ist deutlich größer als bei Ergosta-7,22-dien-3-ol. Die Ionen bei m/z = 271 und m/z = 253 werden praktisch nicht von m/z = 273 und m/z = 255 begleitet, so dass hier von einer gesättigte Seitenkette auszugehen ist. Damit kommen $\Delta^{5,7}$, $\Delta^{5,8}$ und $\Delta^{8,14}$ in Frage. Ergosta-5,8-dien-3-ol konnte durch den Vergleich mit einem Standard ausgeschlossen werden. Das Auftreten eines Fragmentions bei m/z = 339, das durch die partielle Abspaltung des A-Rings (M-$C_3H_7O)^+$ entsteht, ist charakteristisch für $\Delta^{5,7}$ Sterole [92]. Daher wird die Verbindung als Ergosta-5,7-dien-3-ol identifiziert.

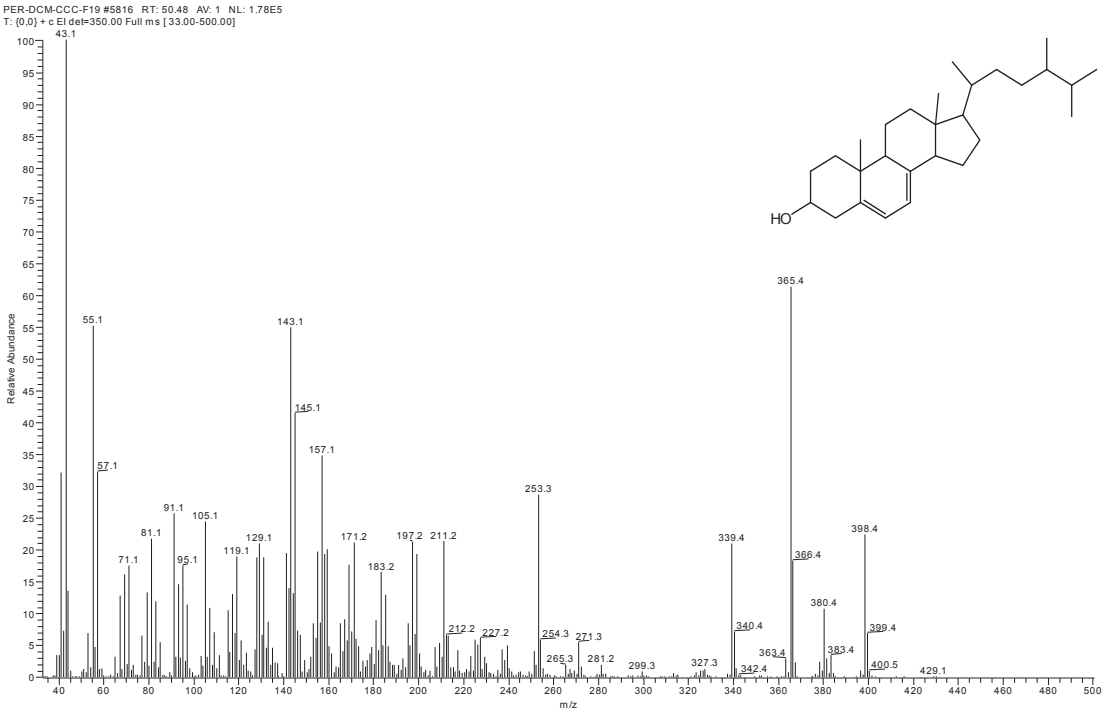

Abbildung IV.18 Massenspektrum bei KI = 3260 (Ergosta-5,7-dien-3-ol).

IV.3.2.1.2 Untersuchung der acetylierten HSCCC-Fraktionen mittels GC-MS

Die bereits identifizierten Sterole Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, das Ergosta-7,22-dien-3-ol, das Fungi- sowie das Cerevisterol konnten auch in den acetylierten Proben von *P. eryngii* nachgewiesen werden. Die Massenspektren der acetylierten Verbindungen sind im Anhang einsehbar (Abbildung V.6 bis Abbildung V.8).

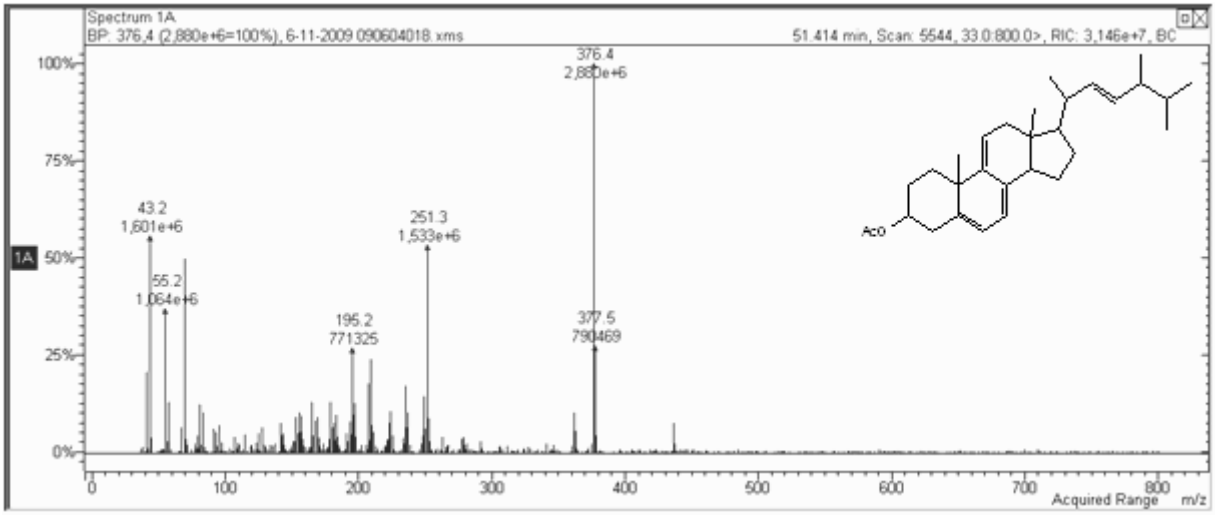

Abbildung IV.19 Massenspektrum bei KI = 3302 (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetat).

Zusätzlich traten einige weitere Peaks auf, für die Strukturvorschläge gemacht werden konnten (vgl. Tabelle V-3 im Anhang).

Die Verbindung bei KI = 3520 (Abbildung IV.20) weist ein Molekülion bei m/z = 454 auf, gefolgt von einem Ion bei m/z = 436, das aus ersterem durch Wasserabspaltung hervorgeht. Aus diesem Fragment erfolgt die Abspaltung von Essigsäure (m/z = 376). Dieses Molekül enthält also zwei Hydroxygruppen, von denen nur eine acetyliert worden ist. Die Übergänge von m/z = 436 auf 311 bzw. von m/z = 376 auf 251 weisen auf eine ungesättigte C_9H_{17}-Seitenkette hin. Dass praktisch keine Doppelpeaks auftreten (m/z = 251 und 249), deutet auf eine Doppelbindung zwischen C8 und C9 hin [90]. Die Molmasse der underivatisierten Verbindung wird daher 412 g mol^{-1} betragen. Im Dictionary of Steroids [93] werden als Diole mit Ergostan-Grundgerüst Ergosta-5,7,24(28)-trien-3,20-diol, Ergosta-5,22,24-trien-3,7-diol und Ergosta-5,8,22-trien-3,11-diol (Portensterol) aufgeführt. Nur letzteres besitzt eine C_9H_{17}-Seitenkette und eine Doppelbindung zwischen C8 und C9 und ist bereits in Basidiomyceten (*Tricholoma portentosum* und *Clitocybe nebularis)* nachgewiesen, so dass für dieses Spektrum die Struktur Portensterol vorgeschlagen wird.

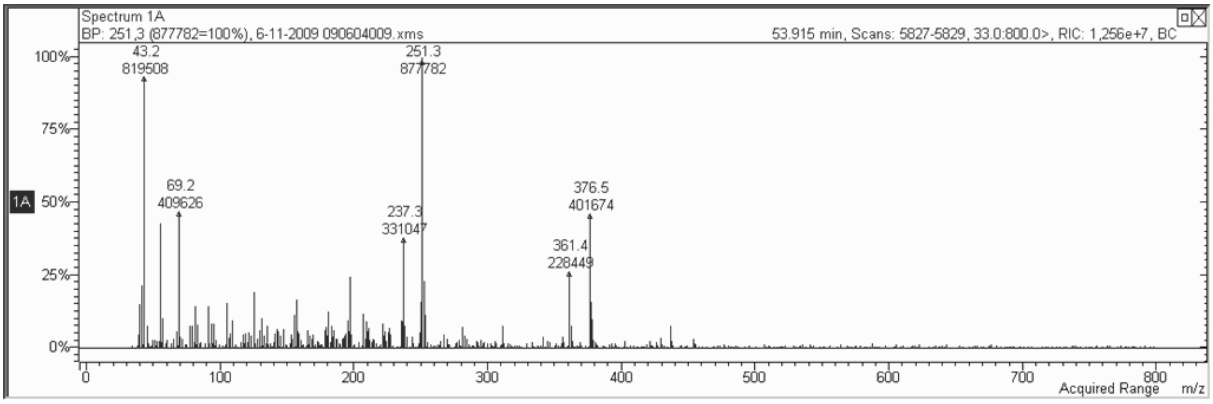

Abbildung IV.20 Massenspektrum bei KI = 3520 (Strukturvorschlag Ergosta-5,8,22-trien-3,11-diolacetat, Portensterolacetat).

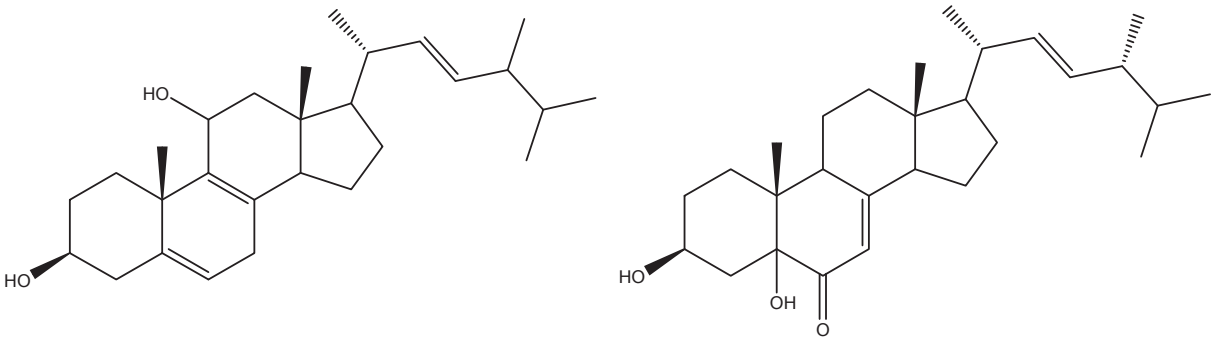

Abbildung IV.21 Portensterol (links) und 3,5-Dihydroxyergosta-7,22-dien-6-on (rechts).

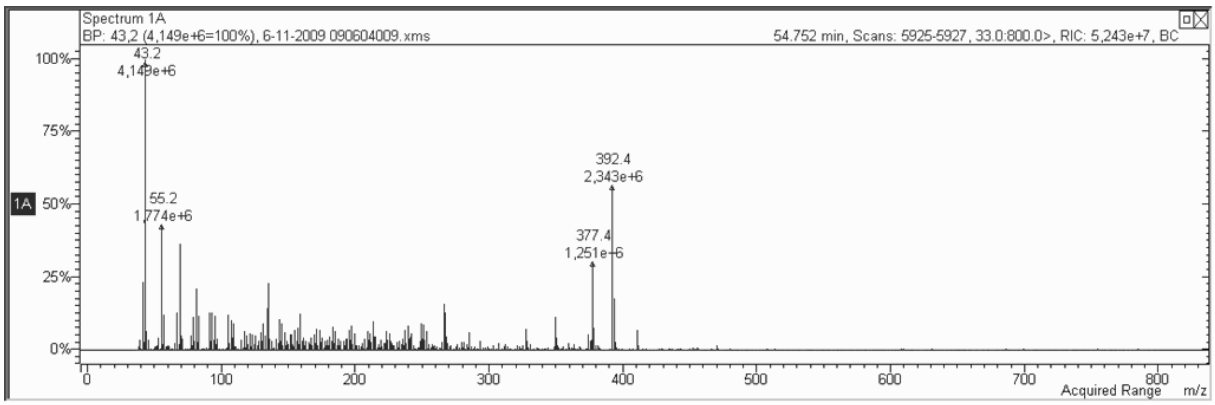

Abbildung IV.22 Massenspektrum bei KI = 3592 (Strukturvorschlag 3,5-Dihydroxyergosta-7,22-dien-6-on-acetat).

Bei KI = 3592 eluiert eine Verbindung mit einem Molekülion bei m/z = 470 (Abbildung IV.22). Die Abspaltung von Essigsäure liefert m/z = 410 und damit eine Molmasse von 428 g mol^{-1}. Eine Wasserabspaltung liefert als weiteres Fragment m/z = 392. Es handelt sich offensichtlich um ein einfach acetyliertes Sterol mit zwei Hydroxygruppen. Ionen bei m/z = 285 und 287 weisen auf die Abspaltung einer C_9H_{17}-Seitenkette aus m/z = 410 und 392 hin. Mit einem Molekulargewicht von 428 g mol^{-1} und zwei Hydroxygruppen ist bereits 3β,5α-Dihydroxyergosta-7,22-dien-6-on von Yaoita aus *Pleurotus eryngii* [94] isoliert worden, so dass diese Verbindung hier als mögliche Struktur vorgeschlagen wird.

IV.3.2.1.3 Untersuchung der HSCCC-Fraktionen mittels LC-MS

Die HPLC-MS^2 wurde wie in III.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Als Ionisierungsart wurde die Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI) angewandt. Neben dem Bereich der Sterole (ca. 10-22 min) gab es eine auffällige Peakgruppe bei 25 bis 26 min (Ausschnitt in Abbildung IV.23, vollständiges Chromatogramm in Abbildung V.13 im Anhang).

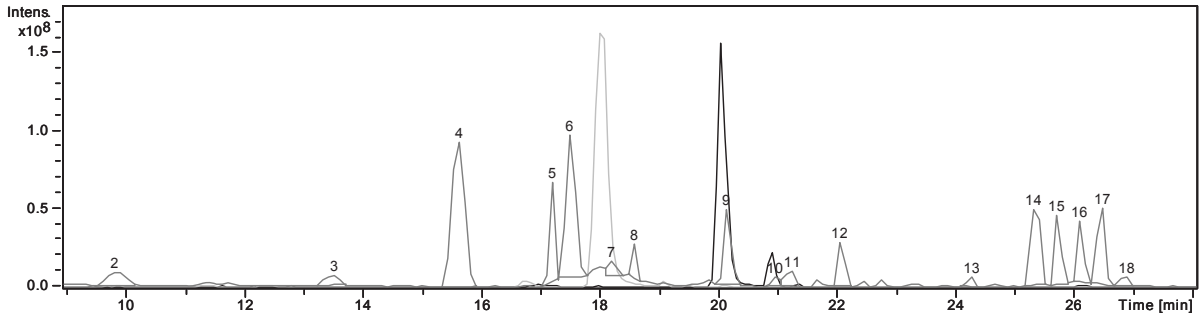

Abbildung IV.23 Ausschnitt aus dem HPLC-APCI-MS-Chromatogramm (TIC) des Dichlormethan-Extraktes (dunkelgrau), von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (hellgrau) und Ergosterol (schwarz). Die Ionisierungsbedingungen finden sich in III.2.6.1.

Tabelle IV-9 zeigt einen Auszug aus den in den verschiedenen CCC-Fraktionen erhaltenen Peaks mit ihren Fragmentionen. Die intensivsten Ionen sind unterstrichen. Im MS^2-Ionenstrom wurden keine auswertbaren Signale erhalten, da die Verbindungen sehr stabil waren und nicht weiter fragmentierten.

Es war auffällig, dass in den ersten Fraktionen und auch in den Fraktionen 4 und 5 in den ersten Minuten viele Massenfragmente, die offensichtlich durch Wasserabspaltung entstanden, zu erkennen sind [95]. So gab es in Fraktion 4 bei 4,5 min die Peakreihenfolge 445 – 427 – 409 – 391, die eine dreimalige Wasserabspaltung andeutete, und bei 6,2 min die Fragmente 445 – 427 – 409 – 285, die auf eine zweimalige Wasserabspaltung sowie die Abspaltung einer C_9H_{15}-Seitenkette (m/z = 124 = C_9H_{15} + H^+) hindeutete.

Bei den Fraktionen 8 bis 10 waren Peaks vor allem im Bereich zwischen 7 und 15 min zu erkennen. So eluierte bei 9,0 min ein Sterol, das sein $[M+H]^+$ bei m/z = 413 besaß und zweimal Wasser verlor (m/z = 395 und 377). Bei 11,6 min eluierte ein Sterol mit $[M+H]^+$ bei m/z = 429 mit Fragmentionen bei m/z = 411, 393 und 379 sowie 253. Dies wies auf einen Stoff mit 428 g mol^{-1}, zwei Hydroxygruppen und einer C_9H_{17}-Seitenkette (m/z = 126 = C_9H_{17} + H^+) hin. Bei noch späteren Retentionszeiten (z.B. 13,6 min) waren Abspaltungen von 162 Masseneinheiten erkennbar (692 – 534), die auf Verknüpfungen mit Zuckern hinwiesen. Solche Verbindungen wurden z.B. von Zhan für *P. ostreatus* beschrieben [96].

In Fraktion 18 tauchten bei 21,3 min Hinweise auf die Verknüpfung eines Sterols mit einer Fettsäure auf. Die Übergänge von 243 Masseneinheiten von m/z = 638 auf 395 und von 620 auf 377 deuteten auf eine Pentadecansäure hin. Ansonsten wurden in Fraktionen 17 und 18 vor allem zwischen 18 und 20 min Massenfragmente von

Sterolen entdeckt, die nun weniger Wasserabspaltungen aufwiesen (z.B. bei 18,3 min, m/z = 395 auf 377).

Die Fraktion 23 enthielt vor allem die Peakgruppe um 25 min, die im Zweierabstand Massen zwischen 880 und 886 enthielt. Diese stammen vermutlich von Triglyceriden, da die Abspaltung von 281 Massenheiten auf die Abspaltung einer Linolsäure hinweist und Triglyceride mit C18-Säuren eine Molmasse im Bereich von 880 g mol^{-1} besitzen.

Tabelle IV-9 Auszug aus der HPLC-MS-Messung

	Fraktionen									
	4	5	8	9	10	15	17	18	20	23
t_R	4,5	4,5	4,5	4,5	4,4		4,5			4,5
m/z	445, 427, 409, 391	443, 427, 409, 391, 381, 377	687, 670, 617, 599, 425, 407, 377, 337	617, 600, 377	617, 600, 377		646, 629, 613, 441, 423, 409, 391, 373			617, 599, 377, 337
t_R	4,7	4,7						4,7		
m/z	443, 427, 409, 391, 373	427, 409, 391, 375						473, 443, 425, 409, 391, 381		
t_R	6,2	6,2	6,2				6,2	6,4		
m/z	445, 427, 409, 285	443, 427, 409, 393, 377	377				631, 613, 425, 407, 393, 375	461, 443, 427, 409, 391		
t_R	7,2	7,3	7,3	7,3				7,5		
m/z	585, 429, 411, 393, 377	585, 443, 429, 411, 395, 377	445, 427, 409, 391, 377	445, 427, 411				427, 409, 395, 377		
t_R			9,0					9,2		
m/z			413, 395, 377					445, 425, 411, 393, 377		
t_R			10,0	10,0	9,9	10,1	10,1	9,9		
m/z			429, 411, 395, 377	429, 411, 395, 377	429, 411, 395, 377	429, 411, 395, 377	429, 411, 393, 377	411, 393, 377		
t_R			11,5	11,6	11,9	11,8				
m/z			682, 520, 379	429, 411, 393, 379, 253	431, 413, 397, 379	429, 411, 379				
t_R			13,6	13,6	13,6	13,8			13,6	
m/z			696, 534, 516	696, 534, 516	696, 534, 516	959, 696, 678, 534, 516			607, 586, 530	

Fortsetzung Tabelle IV-9 Auszug aus der HPLC-MS-Messung

	Fraktionen									
	4	5	8	9	10	15	17	18	20	23
t_R			18,0	18,2	18,1	18,2		18,3		18,2
m/z			782, 617, 599	782, 617, 599	782, 617, 599	617, 599, 558, 540, 532		425, 395, 377, 251		839, 782, 617, 599, 576
t_R					18,7	18,5	18,6	18,5		18,6
m/z					1109, 864, 845, 617, 600, 582	619, 617, 599, 570, 520, 502, 393, 264	393	457, 443, 425, 411, 393, 377, 269		742, 716, 601, 575
t_R						19,3	19,3	19,4		
m/z						599, 584, 566, 548	613, 584, 566, 540, 522, 393	459, 441, 425, 411, 395, 377		
t_R						20,2		20,3		
m/z						894, 878, 852, 793, 628, 615, 413		393, 379, 309, 295, 253		
t_R						21,2	21,2	21,3	21,2	21,3
m/z						919, 897, 810, 793, 682, 664, 656, 638	896, 656, 638, 395, 377	656, 638, 620, 427, 411, 395, 377	656, 638, 563	919, 793, 656, 638
t_R										25,3
m/z										880, 599
t_R										25,7
m/z										882, 856, 601, 575
t_R										26,1
m/z										884, 858, 601, 575
t_R										26,5
m/z										886, 603, 577

IV.3.2.2 Tests auf Bioaktivität und Mengenabschätzung

Antioxidative Kapazitäten für die aus dem DCM-Extrakt erhaltenen CCC-Fraktionen konnten nur im lipophilen ORAC festgestellt werden (Abbildung IV.24). Höhere Aktivitäten wurden insbesondere in den Fraktionen 1, 12 und 17 gemessen.

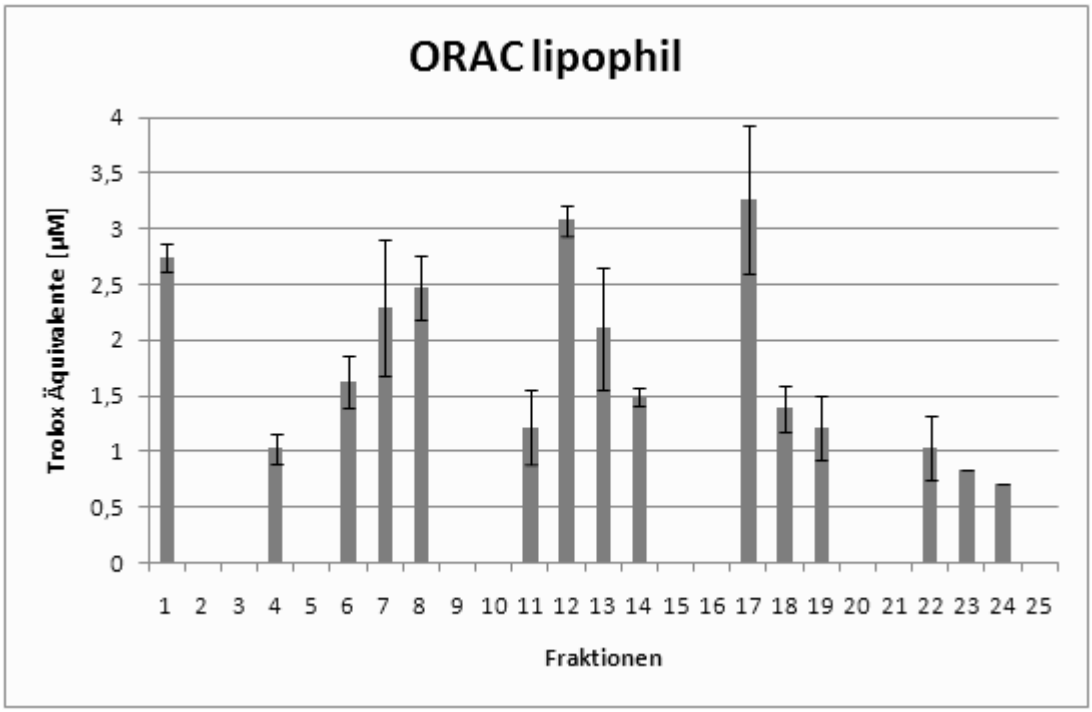

Abbildung IV.24 Ergebnisse des ORAC-Tests für die CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extrakts von *P. eryngii* (c = 0,1 mg mL^{-1}).

Tabelle IV-10 zeigte eine schematische Zusammenfassung der bioaktiven Wirkungen und der identifizierten und eindeutig identifizierten Substanzen in den einzelnen Fraktionen. Für die Symbole gilt das gleiche wie bei Tabelle IV-7 (Abschnitt IV.3.1.2), nur dass hier n.b. für antioxidative Kapazitäten unterhalb der Bestimmungsgrenze 0,636 µM TE beim hydrophilen und 0,733 µM TE beim lipophilen ORAC steht.

Tabelle IV-10 Zusammenfassung der bioaktiven Eigenschaften der HSCCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii*

Fraktion	ORAC lipophil	ORAC hydrophil	Verbindung	Menge	Auswaage [mg]
1	++	n.b.	n.b.		53,4
2	n.b.	n.b.	n.b.		9,2
3	n.b.	n.b.	n.b.		5,2
4	+	n.b.	Cerevisterol	+	3,5
5	n.b.	n.b.	Cerevisterol	+	9,7
6	+	n.b.	n.b.		3,9
7	++	n.b.	n.b.		7,0
8	++	n.b.	n.b.		2,4
9	n.b.	n.b.	Linolsäure	+	9,9
10	n.b.	n.b.	Linolsäure	+	8,3
11	+	n.b.	Linolsäure	+	1,5

Fortsetzung Tabelle IV-10 Zusammenfassung der bioaktiven Eigenschaften der HSCCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii*

Fraktion	ORAC lipophil	ORAC hydrophil	Verbindung	Menge	Auswaage [mg]
12	++	n.b.	Linolsäure	+	6,0
13	++	n.b.	Palmitinsäure	+	9,7
			Linolsäure	++	
14	+	n.b.	Palmitinsäure	++	5,6
			Linolsäure	+	
15	n.b.	n.b.	Stearinsäure	+	1,8
16	n.b.	n.b.	Phthalat	++++	0,8
17	++	n.b.	Phthalat	+	3,1
			Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen	+	
			Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	+++	
			Ergosterol	+	
18	+	n.b.	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	+	20,0
			Ergosterol	++++	
19	+	n.b.	Linolsäuremethylester	++	14,7
			Ergosterol	++++	
			Ergosta-7,22-dien-3-ol	+	
			Ergosta-5,7-dien-3-ol	++	
			Fungisterol	+	
20	n.b.	n.b.	Pentadecansäuremethylester	+	2,5
			Palmitinsäuremethylester	+	
			Linolsäuremethylester	+	
			Ölsäuremethylester	+	
			Ergosta-7,22-dien-3-ol	++	
			Fungisterol	+++	
21	n.b.	n.b.	Pentadecansäuremethylester	Spuren	2,2
			Palmitinsäuremethylester	++	
			Margarinsäuremethylester	Spuren	
			Ölsäuremethylester	+	
			Stearinsäuremethylester	Spuren	
			Fungisterol	+	
22	+	n.b.	n.b.		3,6
23	+	n.b.	n.b.		37,4
24	+	n.b.	Triglyceride (LC-MS)		227,3
25	n.b.	n.b.	n.b.		0,3

Höhere antioxidative Kapazitäten sind in den Fraktionen 1, 7 und 8, 12 und 13 sowie 17 zu finden. Die Aktivitäten in den Fraktionen 11 bis 14 werden u.a. durch

Linolsäure ausgelöst. Die antioxidative Kapazität in den Fraktionen 17, 18 und 19 ist auf die Anwesenheit der hoch ungesättigten Sterole Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol und Ergosterol zurückzuführen.

Wie bereits in IV.3.1.2 angerissen worden ist, beruhen die Mengenangaben auf den Messergebnissen eines GC-FID. Bei der Interpretation der Daten ist zu beachten, dass nicht alle in einem lipophilen Extrakt zu erwartenden Stoffe flüchtig genug sind, um einen GC zu passieren. Triglyceride zum Beispiel passieren den GC nicht und werden mit der HPLC detektiert. Auch wenn der Stoff im FID detektiert werden kann, kann die Verbindung im Injektor diskriminiert werden, so dass eine zu geringe Menge gemessen wird. Die GC-FID-Daten geben also nicht notwendigerweise die exakte Zusammensetzung der Fraktionen wieder.

Lässt man diese Faktoren jedoch außer Acht, kann man die Menge einiger Sterole mit dem prozentualen Flächenanteil im Chromatogramm abschätzen. Die Werte in der folgenden Tabelle wurden also mit den GC-FID-Chromatogrammen der underivatisierten Fraktionen unter der Annahme, dass alle Komponenten flüchtig sind und nicht diskriminiert werden und auch nur in den Hexan- und Dichlormethan-Extrakten auftreten, extrapoliert (Tabelle IV-11).

Tabelle IV-11 Extrapolierte Gehalte einiger Sterole in *P. eryngii*.

	Menge in extrahierten Pilzen [mg]	Menge pro 100 g Trockengewicht [mg]	Menge pro 100 g Frischgewicht [mg]
Cerevisterol	22	2	0,2
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	50	4	0,5
Ergosterol	1846	148	20,0
Ergosta-7,22-dien-3-ol	33	3	0,4
Fungisterol	191	15	2,1

In der extrahierten Menge Pilze (Trockengewicht 1,25 kg) sind also etwa 20 mg Cerevisterol, 30 mg Ergosta-7,22-dien-3-ol, 50 mg Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, 190 mg Fungisterol und 1850 mg Ergosterol enthalten. Da die Trockenmasse 13,5 % der Feuchtmasse beträgt, liegen die Gehalte in frischen Pilzen wesentlich niedriger. Der Gehalt an Cerevisterol kann jedoch immer noch überschätzt sein, da in dieser CCC-Fraktion mit weiteren sehr polaren Sterolen zu rechnen ist, die nicht flüchtig genug für eine gaschromatographische Analyse sind. Dass Ergosterol außerhalb der

Größenordnung der anderen Sterole vorkommt, liegt daran, dass Ergosterol ein Bestandteil der Zellmembranen ist und in wesentlich größeren Mengen vom Organismus benötigt wird.

IV.3.3 Trenneigenschaften der HSCCC

Die Gegenstromverteilungschromatographie wird immer häufiger zur Auftrennung komplexer Naturstoffgemische eingesetzt, denn die Gefahr irreversibler Adsorptionen ist wesentlich geringer als bei festen stationären Phasen. Außerdem wird weniger Lösungsmittel benötigt und die Übertragung in einen größeren Maßstab ist leichter möglich. Substanzen, die stark in der stationären Phase zurückgehalten werden, können mit der HSCCC getrennt und nach Umstellung auf Extrusion mit der stationären Phase schnell eluiert werden, was zusätzlich Zeit und Kosten spart [97]. Einen Überblick über die unterschiedlichsten Naturstoffe, die mittels CCC aufgetrennt werden können, liefern unter anderem [98-101].

Die Auftrennung der Extrakte aus *P. eryngii* mit der HSCCC ist reproduzierbar und unterscheidet sich zwischen Hexan- und Dichlormethan-Extrakt qualitativ nicht (vgl. IV.3.1 und IV.3.2). Die chromatographische Trennung erfolgt zunächst nach Polarität: Zuerst werden die Monoacylgycerole und polaren Sterole wie Cerevisterol eluiert (Hexan-Extrakt, Fraktion 1 bis 5). Danach tauchen die freien Fettsäuren auf (Fraktion 5 bis 10), von denen wiederum die etwas polarere Linolsäure die Apparatur vor den weniger polaren einfach ungesättigten und gesättigten Säuren verlässt. Erst danach werden die Monohydroxysterole wie Ergosta-5,7,9(11),22-tetraenol, Ergosterol und Fungisterol nachgewiesen. Auch hier eluieren Sterole mit mehreren Doppelbindungen vor denen mit nur einer (Fraktion 11 bis 13). In den letzten Fraktionen (13 bis 15) des Hexan-Extraktes treten Fettsäuremethylester auf und – wie anhand der LC-MS-Messungen des Dichlormethan-Extraktes gezeigt worden ist – Triacylglycerole.

Dies lässt sich mit den GC-FID-Chromatogrammen der Fraktionen 17 bis 20 des Dichlormethan-Extraktes besonders gut illustrieren (Abbildung IV.25). In Fraktion 17 eluiert bei 47,4 min Ergosta-5,7,9(11),22-tetraenol. In Fraktion 18 besteht der Hauptpeak bei 47,9 min aus Ergosterol. Ergosterol wird von verschiedenen anderen Sterole wie Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergosta-5,7-dien-3-ol und Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol) in Fraktion 19 begleitet. Zudem tritt bei 32,1 min Linolsäuremethylester

auf. In Fraktion 20 kommen schließlich Pentadecan- und Palmitinsäuremethylester hinzu und das Hauptsterol ist nicht mehr Ergosterol sondern Fungisterol.

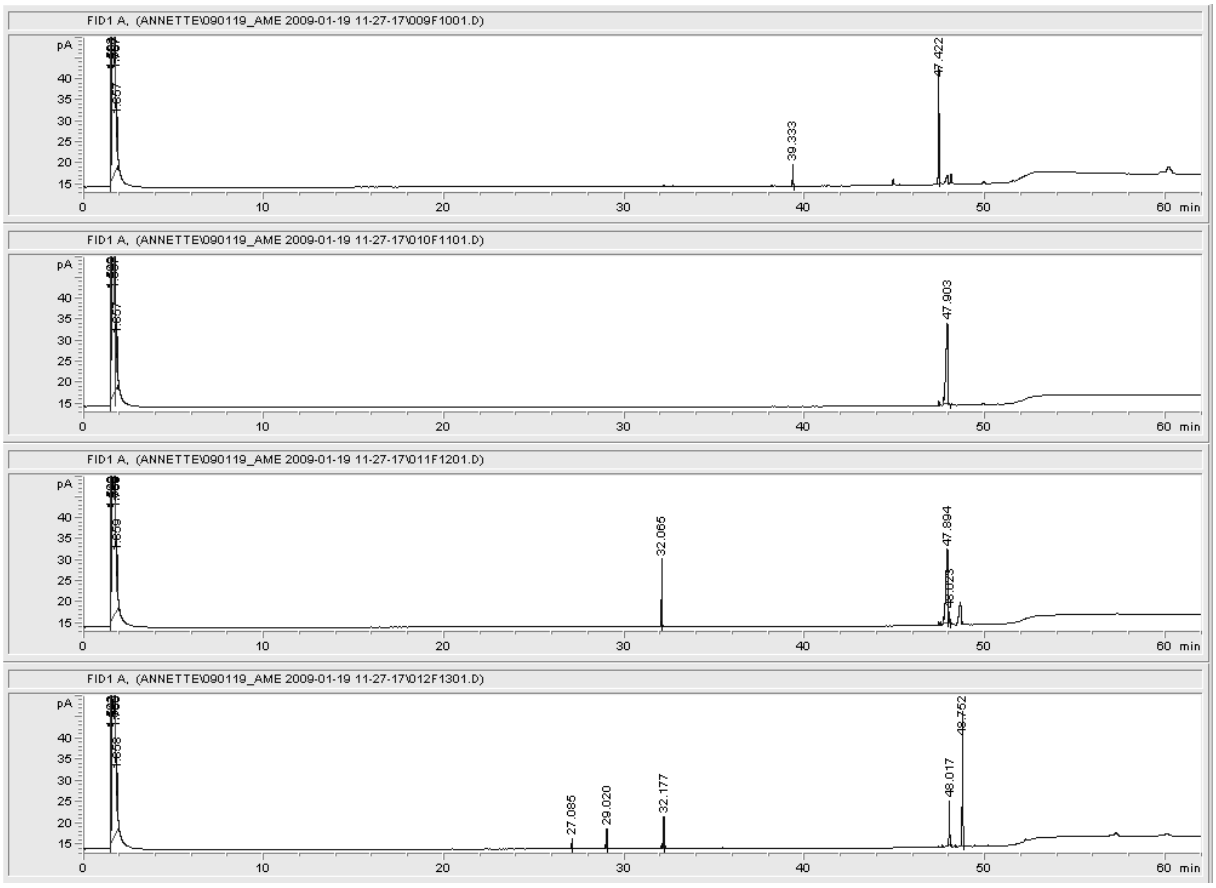

Abbildung IV.25 GC-FID-Chromatogramme der HSCCC-Fraktionen 17, 18, 19 und 20 (von oben nach unten) des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii*. Die Geräteparameter sind in III.2.5.1 aufgeführt.

Berthod untersuchte das Elution-Extrusionsverhalten eine Mischung kommerziell erhältlicher Sterole [97]. Er verwendete dazu eine Mischung aus Wasser, Methanol, Ethylacetat und Heptan (6:5:6:5) und setzte die organische Phase als stationäre Phase ein. Es wurde ähnlich wie in dieser Arbeit beobachtet, dass im Allgemeinen Substanzen mit geringeren n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, also höherer Polarität, zuerst eluieren: Prednison eluiert vor Testosteron und Cholesterol. De Paiva [102] nutzte ebenfalls ein Solvenssystem aus Wasser, Methanol, Ethylacetat und Hexan (2:10:10:40), um Naphthochinone, Sitosterol und Palmitinsäure zu trennen. Da in jener Arbeit die organische, unpolare Phase als mobile Phase genutzt wurde, beobachtet die Arbeitsgruppe die umgekehrte Elutionsreihenfolge: Zuerst eluieren Sitosterol und Palmitinsäure, bevor die polareren Naphthochinone auftreten.

Ein System aus Hexan und Acetonitril wurde zur Auftrennung von Ethylestern ungesättigter Fettsäuren aus Pflanzen- und Fischöl verwendet [103]. Dabei wurde ebenfalls ein Retentionsverhalten wie in dieser Arbeit festgestellt.
Es bleibt festzuhalten, dass die Gegenstromverteilungschromatographie zur Auftrennung von lipophilen Extrakten genutzt wird. Häufig werden jedoch vorgereinigte Gemische oder Mischungen aus wenigen Standardsubstanzen getrennt, für die die Trennung leicht zu optimieren ist. Die hier eingesetzten, nach Polarität vorfraktionierten Extrakte besaßen demgegenüber eine wesentlich komplexere Zusammensetzung. Das Retentionsverhalten passt zu den Erkenntnissen, die bisher von lipophilen CCC-Trennungen bekannt sind.

IV.3.4 Unterfraktionen der HSCCC-Trennung des Dichlormethan-Extrakts von *Pleurotus eryngii*

IV.3.4.1 MPLC-Trennung

Die Fraktionen 12 bis 14 des Dichlormethan-Extrakts wurden per MPLC (vgl. III.2.7) aufgetrennt. Die antioxidative Aktivität konnte danach hauptsächlich in den Fraktionen 2, 6 bis 9 und 11 wieder gefunden werden (Abbildung IV.26). Von der Fraktion 2 wurde keine messbare Ausbeute erhalten (vgl. Tabelle V-4 im Anhang), während die Fraktionen 6 und 9 zwar messbare Ausbeuten enthielten, aber dafür keine Reinsubstanzen waren (Abbildung V.9 im Anhang).
Eine GC-FID-Untersuchung der acetylierten MPLC-Fraktionen zeigte keine Peaks im Retentionszeitbereich der Sterole. Eine GC-MS-Messung konnte Pentadecansäuremethylester in Fraktion 8 sowie Palmitinsäuremethylester, Ölsäuremethylester und Palmitinsäure in Fraktion 10 nachweisen. Dies war nach den Erkenntnissen über die Inhaltsstoffe dieser HSCCC-Fraktionen auch zu erwarten.
Da die in diesen Fraktionen vermuteten, polaren Sterole auch nach Acetylierung möglicherweise nicht flüchtig genug waren, wurden einige Fraktionen underivatisiert einer Direkteinlass-EI-MS (III.2.11) unterzogen. Damit konnten in den Fraktionen 1 und 12 charakteristische Massenfragmente von Sterolen detektiert werden (vgl. Tabelle V-5 im Anhang), eine Identifizierung war jedoch nicht möglich. Damit bleibt unbekannt, welche Verbindungen hier antioxidative Aktivitäten zeigen, da nach den

Erkenntnissen aus Tabelle IV-7 und Tabelle IV-10 Fettsäuremethylester und gesättigte Fettsäuren praktisch keine antioxidativen Eigenschaften zeigen.

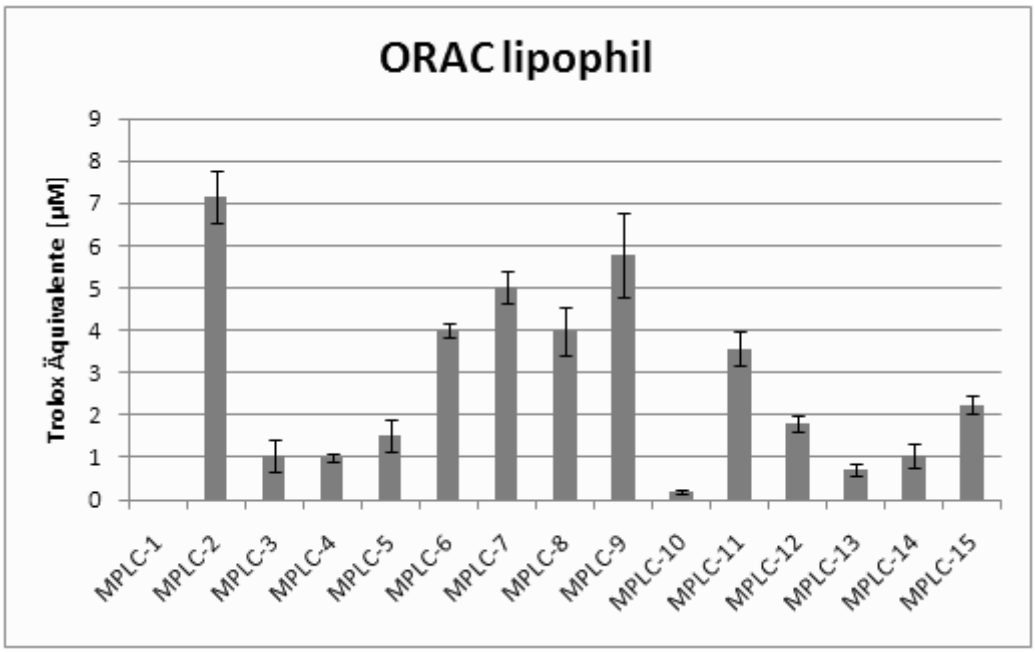

Abbildung IV.26 Ergebnisse des lipophilen ORAC-Assays für die MPLC-Fraktionen von *P. eryngii* (c = 0,1 mg mL^{-1}).

IV.3.4.2 Präparative HPLC

Mit der präparativen HPLC (III.2.6.2) wurden die Fraktionen 18 und 19 der HSCCC aufgetrennt. Das Chromatogramm mit den Integrationslinien ist in Abbildung IV.27 zu sehen. Hervorstechendstes Merkmal ist der Doppelpeak in der Mitte des Chromatogramms.

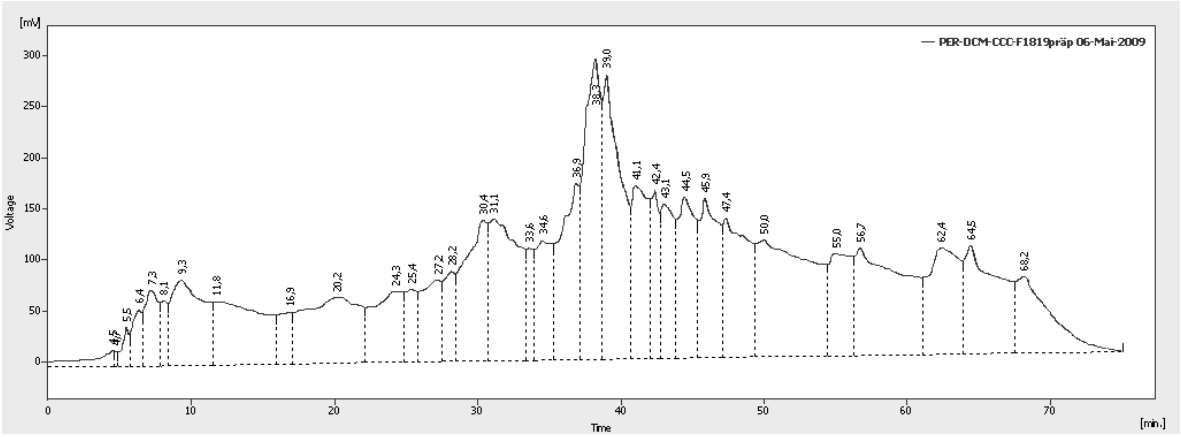

Abbildung IV.27 Chromatogramm der RP18-Trennung bei 205 nm (vgl. III.2.6.2).

In den Fraktionen, die nach 20 min eluierten, konnten in den acetylierten Proben Peaks im Retentionszeitbereich der Sterole festgestellt werden. Mehrere Signale waren in den FID-Chromatogrammen klar zu erkennen. Da die GC-MS-Untersuchung aufgrund technischer Probleme erst mehrere Wochen nach der FID-Messung erfolgen konnte, wurden lediglich in Fraktion 25 Hinweise auf Ergosterol und Ergosta-7,22-dien-3-ol gefunden (vgl. Tabelle V-7 im Anhang).
Die Intensität der Sterole-Signale in den FID-Chromatogrammen korrelierte mit den erhöhten ORAC-Werten (Abbildung IV.28) in den Fraktionen 13 und 23 bis 25. Wie in Abschnitt IV.4.1 gezeigt wird, besitzen Sterole wie Ergosterol antioxidative Aktivitäten im lipophilen ORAC-Assay. Die antioxidative Kapazität der Fraktionen 23 bis 25 ist damit u.a. auf die Anwesenheit von Ergosterol zurückzuführen.

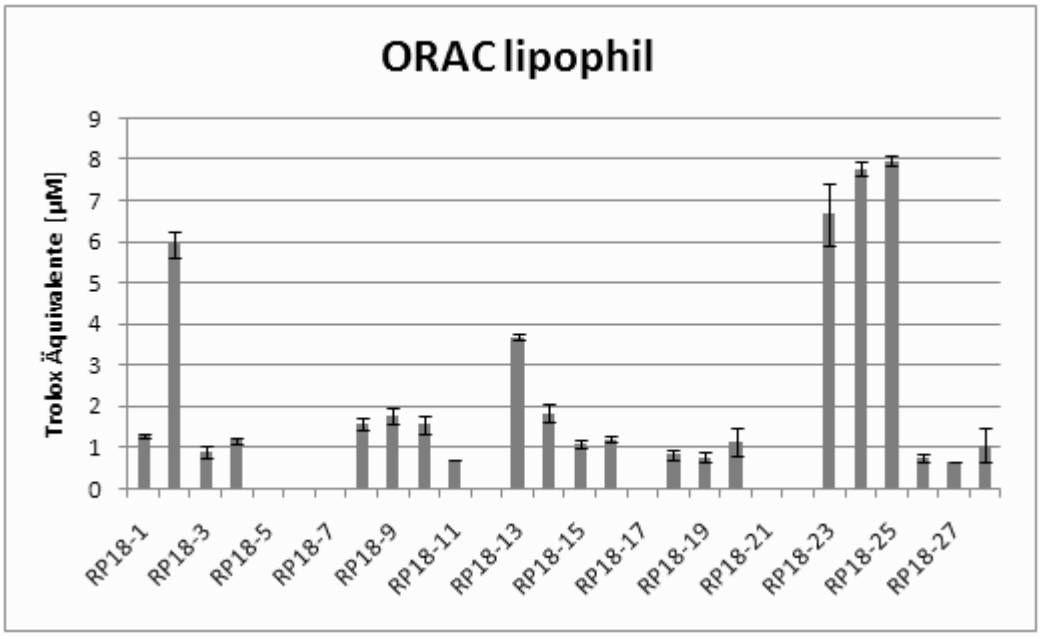

Abbildung IV.28 Ergebnisse des lipophilen ORAC-Assays für die Fraktionen der präparativen HPLC von *P. eryngii* (c = 0,1 mg mL^{-1}).

IV.3.4.3 Säulenchromatographie

Die Fraktion 24 der HSCCC wurde durch Säulenchromatographie wie in III.2.8 beschrieben weiter aufgetrennt. Die Fraktionen wurden acetyliert und per GC-FID und GC-MS vermessen.
In den ersten Fraktionen wurden bei der GC-MS Alkane detektiert (vgl. Tabelle V-9 im Anhang). In einigen Fraktionen gab es Signale im Elutionsbereich der Sterole, doch waren diese nur schwach ausgeprägt. Eindeutig nachgewiesen werden

konnten dagegen Linol- und Ölsäuremethylester in Fraktion 33. Diese trugen damit zu den erhöhten ORAC-Aktivitäten in den Fraktionen 33 und 34 bei (Abbildung IV.29).

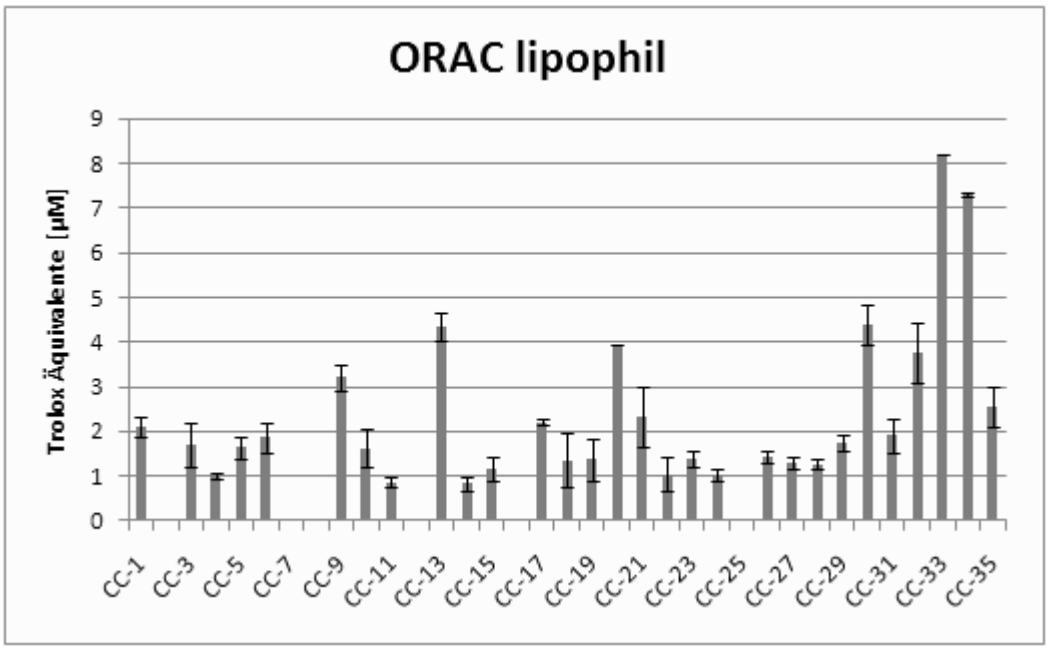

Abbildung IV.29 Ergebnisse des lipophilen ORAC-Assays für die Fraktionen der Säulenchromatographie von *P. eryngii* (c = 0,1 mg mL^{-1}).

In der Fraktion 8 wurde eine homologe Reihe von Triacylglycerolen (MW = 880, 882, 884, 886 und 888) per LC-MS nachgewiesen (Abbildung IV.30), die aber keine antioxidativen Eigenschaften aufwiesen. Da mit steigender Zahl von Kohlenstoffatomen die Bedeutung des Isotopenpeaks zunimmt, liegt bei m/z = 880 möglicherweise der protonierte Isotopenpeak des Trilinolylglycerols mit drei Linolsäureresten vor. Dafür spricht auch die Abspaltung von 281 Masseneinheiten ($C_{18}H_{32}O_2$ + H) aus m/z = 880. Diese Masse verliert auch das zweite Triacylglycerol aus m/z = 882, so dass wahrscheinlich Linolsäure Bestandteil beider Moleküle ist. Die nächsten drei Moleküle zeigen alle ein Abtrennung von 283 Masseneinheiten ($C_{18}H_{30}O_2$ + H), so dass an diesen Triacylglycerolen vermutlich Ölsäure beteiligt ist. Für das Vorhandensein ungesättigter Fettsäuren spricht ebenfalls das ^{1}H-NMR dieses Gemisches, das große Ähnlichkeit mit dem Spektrum des Trilinolylglycerols aufweist (vgl. Abbildung V.19 und Abbildung V.20 im Anhang).

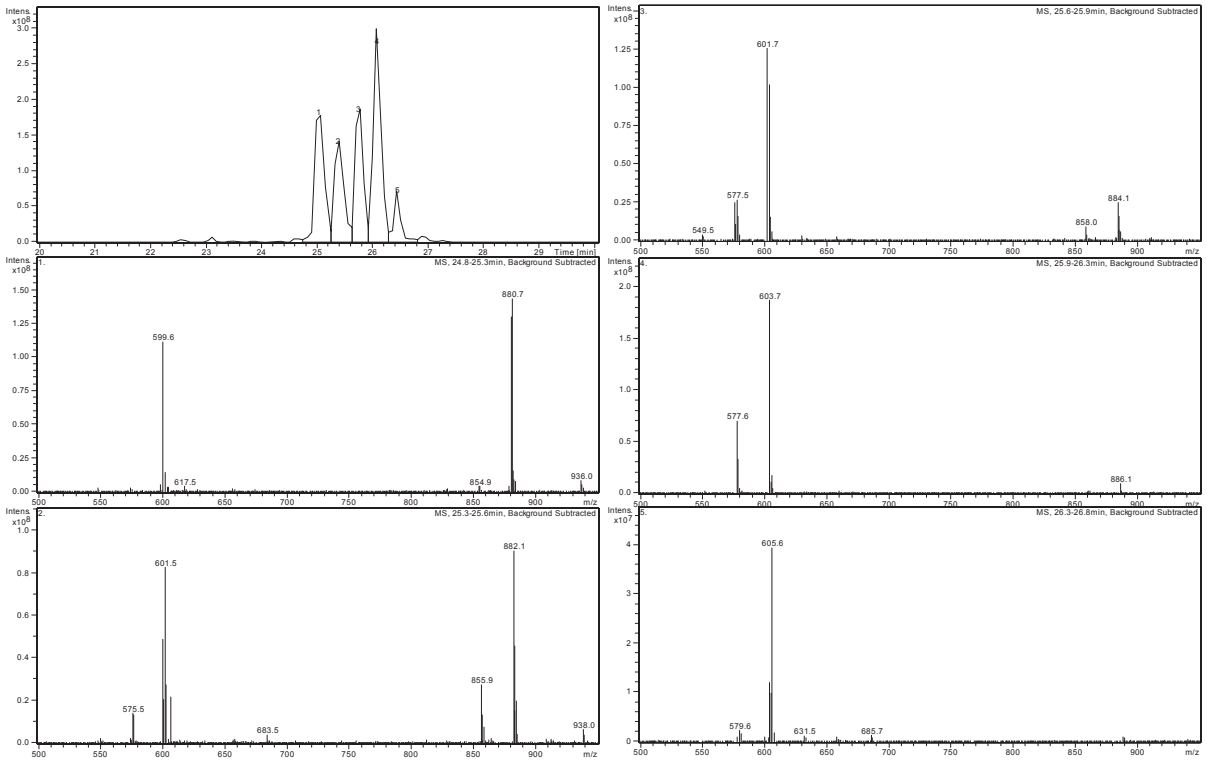

Abbildung IV.30 HPLC-APCI-MS-Chromatogramm (TIC, Ausschnitt) von Fraktion 8 der Säulenchromatographie von *P. eryngii* (oben links), mit den Spektren der einzelnen Peaks. Die Ionisierungsbedingungen finden sich in III.2.6.1.

IV.4 Aktivitäten der Einzelsubstanzen

IV.4.1 ORAC-Assay

Der ORAC-Assay wurde in der lipophilen Version für verschiedene Einzelsubstanzen, die in den Extrakten und den daraus erhaltenen Fraktionen bereits identifiziert wurden, durchgeführt. Neben einigen gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie drei Ergostanderivaten mit 2, 3 und 4 Doppelbindungen wurde auch ein typischer Weichmacher getestet, der regelmäßig in den Gaschromatogrammen auftauchte (Tabelle IV-12).

Tabelle IV-12 Trolox-Äquivalente der Einzelsubstanzen im lipophilen ORAC.

Substanz	Konzentration im Well [µg mL^{-1}]	Trolox-Äquivalente [µM]	Varianz [%]
Bis(ethylhexyl)phthalat	10	0,226	23,7
Palmitinsäure	10	<0,125	n.b.
Palmitoleinsäure	10	4,599	7,3
Ölsäure	10	4,506	17,0
Linolsäure	10	6,024	13,7
Elaidinsäure	5	5,584	13,3
Ergosta-5,8-dien-3-ol	5	0,364	23,3
Ergosterol	5	7,466	7,4
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	5	6,746	0,5

Palmitinsäure besaß keine antioxidative Kapazität im Messbereich. Palmitolein- und Ölsäure wiesen vergleichbare Troloxäquivalente auf, während der Wert für Linolsäure mit zwei Doppelbindungen wesentlich höher war.

Ergosta-5,8-dien-3-ol besaß im Gegensatz zu Ergosterol und Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol eine deutlich geringere antioxidative Kapazität. Diese Messwerte zeigen, dass Monohydroxysterole antioxidativ im lipophilen ORAC-System wirken und dass Sterole mit drei und vier Doppelbindungen höhere ORAC-Werte als solche mit nur einer oder zwei Doppelbindung aufweisen.

Bis(ethylhexyl)phthalat zeigte ebenfalls eine geringe antioxidative Kapazität in diesem Testsystem. Diese antioxidative Aktivität führte aber nicht zu falsch-positiven Ergebnissen, weil der absolute Wert für Bis(ethylhexyl)phthalat im Bereich der Standardabweichungen für die anderen untersuchten Substanzen lag.

In dem verwendeten Testsystem „lipophiler ORAC“ zeigten also auch ungesättigte Fettsäuren und Sterole antioxidative Eigenschaften.

IV.4.2 COX-Assay

Der Cyclooxygenase-Assay wurde für die Extrakte von *P. eryngii* und einige Einzelsubstanzen für beide Isoenzyme nach einem „Cold Spike Protocol“ von Cayman Chemical Company durchgeführt (Tabelle IV-13). Die Proben wurden aliquotiert und zu einem Aliquot wurde eine bekannte Menge Prostaglandinstandard hinzugefügt (vgl. III.1.5).

Tabelle IV-13 Inhibierung der Cyclooxygenasen durch Einzelsubstanzen (c = 5 µg mL^{-1} in der Reaktionslösung)

Probe	COX I Inhibierung [%]	COX II Inhibierung [%]
P. eryngii, Hexan-Extrakt	57	47
P. eryngii, DCM-Extrakt	49	-2
P. eryngii, Ethylacetat-Extrakt	-15	-518
P. eryngii, MeOH-Extrakt	37	-58
Ergosta-5,8-dien-3-ol	378	241
Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	62	58
Linolsäure	433	94
Palmitoleinsäure	56	38

Dabei wurden auch bei Einzelsubstanzen die aufgestockten Mengen teilweise nur zu einem Fünftel wiedergefunden, während bei den Extrakten sogar teilweise in den aufgestockten Proben weniger Prostaglandine als in den nicht aufgestockten gemessen wurden. Auch in dieser modifizierten Ausführung wurden nur schwer zu interpretierende Daten erhalten (siehe auch IV.8.2).

IV.5 Dichlormethan-Extrakt von Agrocybe aegerita

Die Extraktion, die Trennung mit der High Speed Countercurrent Chromatography und die Ergebnisse des ORAC- sowie des COX-Assays wurden ausführlich in [83] beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die HSCCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes acetyliert und auf weitere Sterole untersucht. Es wurden Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol und Ergosterol gefunden und deren Identität wie die der Fettsäuremethylester mit einem Standard bestätigt. Ergosta-7,22-dien-3-ol, Fungisterol, Ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Lichesterol), 19-Norergosta-5,7,9,22-tetraen-3-ol (Neoergosterol), Ergost-8-en-3-ol, Ergosta-7,24(28)-dien-3-ol (Episterol) und Ergosta-5,7-dien-3-ol sowie Lanosterol, 4-Methyl-, 4,4-Dimethylfecosterol und 24-Methylen-24,25-dihydrolanosterol (Eburicol) wurden mit Vergleichsspektren aus der Literatur identifiziert. Eine Übersicht liefert Tabelle V-10 im Anhang.

Da die Spektren von Cerevisterolacetat, Ergosta-7,22-dien-3-olacetat und Fungisterolacetat schon in Abschnitt IV.3.2.1 aufgeführt worden sind, wird auf eine nochmalige Interpretation der MS-Spektren an dieser Stelle verzichtet.

Das Signal bei KI = 3315 (Abbildung IV.31) weist einen Molekülpeak bei m/z = 438 auf und besitzt damit auf ein Molekulargewicht wie Ergosterol. Die Abspaltung eines Fragmentes von 60 Masseneinheiten (m/z = 438 auf 378) zeigt eine acetylierbare Hydroxygruppe an. Das Massenfragment bei m/z = 363 entsteht durch die zusätzliche Abspaltung einer Methylgruppe. Der Doppelpeak bei m/z = 253 und 251 lässt sich auf die Abtrennung der Seitenkette aus m/z = 378 ohne und mit Übertragung von zwei Wasserstoffatomen zurückführen und spricht damit für eine C_9H_{17}-Seitenkette mit einer Doppelbindung an C22. Das Ion bei m/z = 211 entsteht durch die Abspaltung des D-Ringes zusammen mit der Seitenkette. m/z = 157 und 143 sind Fragmente des A- bzw. B-Ringes. Nach einem Vergleich der Intensitäten und Fragmente mit den in [87] beschriebenen und vorbehaltlich einer identischen Elutionsreihenfolge auf OV1- und HP5-Säulen wird diese Substanz als Ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Lichesterol) identifiziert.

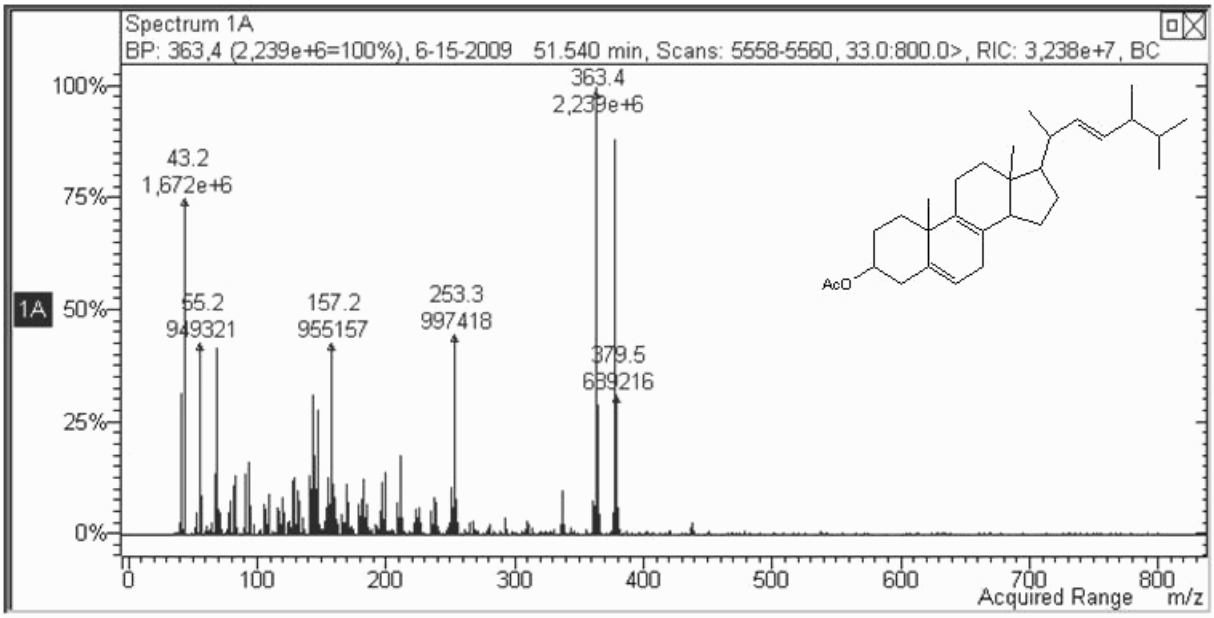

Abbildung IV.31 Massenspektrum bei KI = 3315 (Ergosta-5,8,22-trien-3-olacetat, Lichesterolacetat).

Der Basispeak des Signals bei KI = 3344 liegt bei m/z = 362 (Abbildung IV.32). Ein Molekülpeak ist nicht zu erkennen, wird aber bei m/z = 422 vermutet. Ein sehr schwaches Signal bei m/z = 347 lässt sich auf die Abspaltung einer Methylgruppe zurückführen. Die niedrige Intensität führt zusammen mit der sehr hohen Intensität bei m/z = 362 zu der Vermutung, dass es sich um eine Verbindung ohne C19-Methylgruppe und einem aromatischen B-Ring handelt. Die Fragmente bei m/z = 235

und 237 werden der Abspaltung der Seitenkette mit und ohne Wasserstoffübertragung zugeordnet, das Ion bei m/z = 195 entsteht durch die zusätzliche Abspaltung des D-Rings. Durch den Vergleich mit [85] wird die Verbindung als Acetat des 19-Norergosta-5,7,9,22-tetraenols (Neoergosterol) identifiziert.

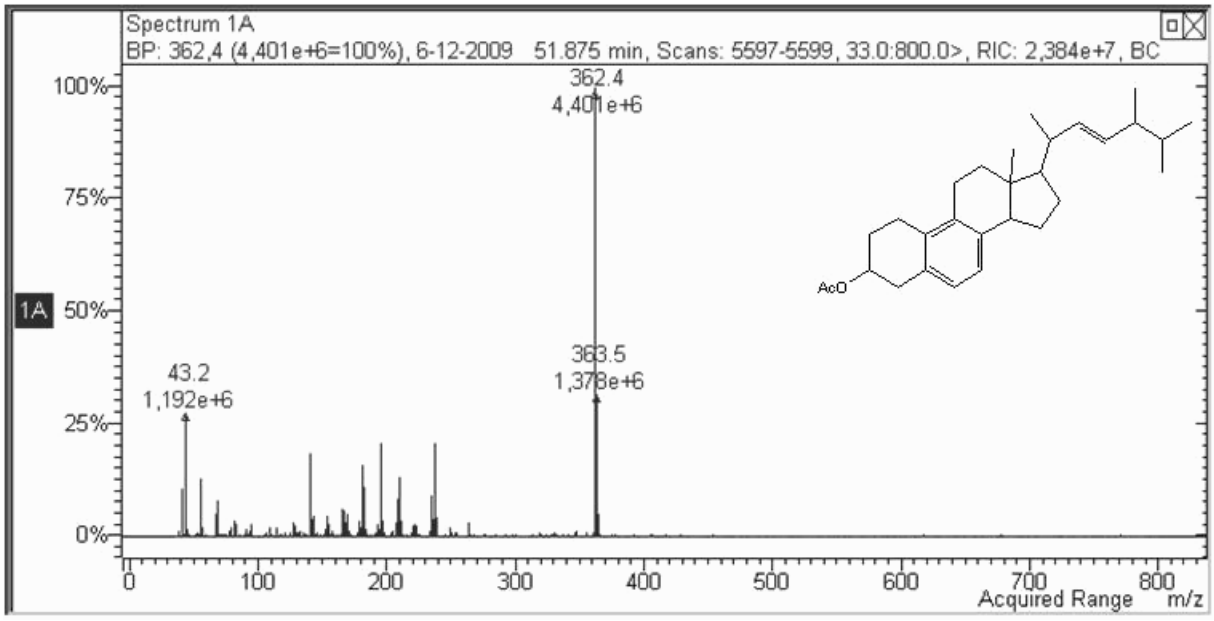

Abbildung IV.32 Massenspektrum bei KI = 3344 (19-Norergosta-5,7,9,22-tetraen-3-olacetat, Neoergosterolacetat).

Das Spektrum bei KI = 3362 (Abbildung IV.33) ist durch die Koelution mit Ergosta-7,22-dien-3-olacetat schwieriger zuzuordnen. Es weist ein Molekülion bei m/z = 438 und besitzt damit dieselbe Masse wie Ergosterol. Die Doppelpeaks bei m/z = 253 und 251 sowie 211 und 209 werden auf die Abspaltung einer C_9H_{17}-Seitenkette mit und ohne D-Ring bzw. zusätzliche Wasserstoffatome aus dem Basispeak bei m/z = 378 zurückgeführt. Eine der Doppelbindungen muss also in der Seitenkette, die beiden anderen im Steroidgerüst vorhanden sein. Da die Seitenkette nicht als Neutralmolekül abgespalten wird, kommt eine $\Delta^{14,22}$-Struktur nicht in Frage. Ergosta-5,8,22-trien-3-ol und Ergosterol können vorher eluierenden Peaks zugeordnet werden. Das Spektrum von Ergosta-8,14,24(28)-trien-3-ol stimmt nicht mit dem beobachteten überein, so dass nach dem Ausschlussprinzip und durch Vergleich mit [87] für die Verbindung Ergosta-5,7,24(28)-trien-3-ol vorgeschlagen wird.

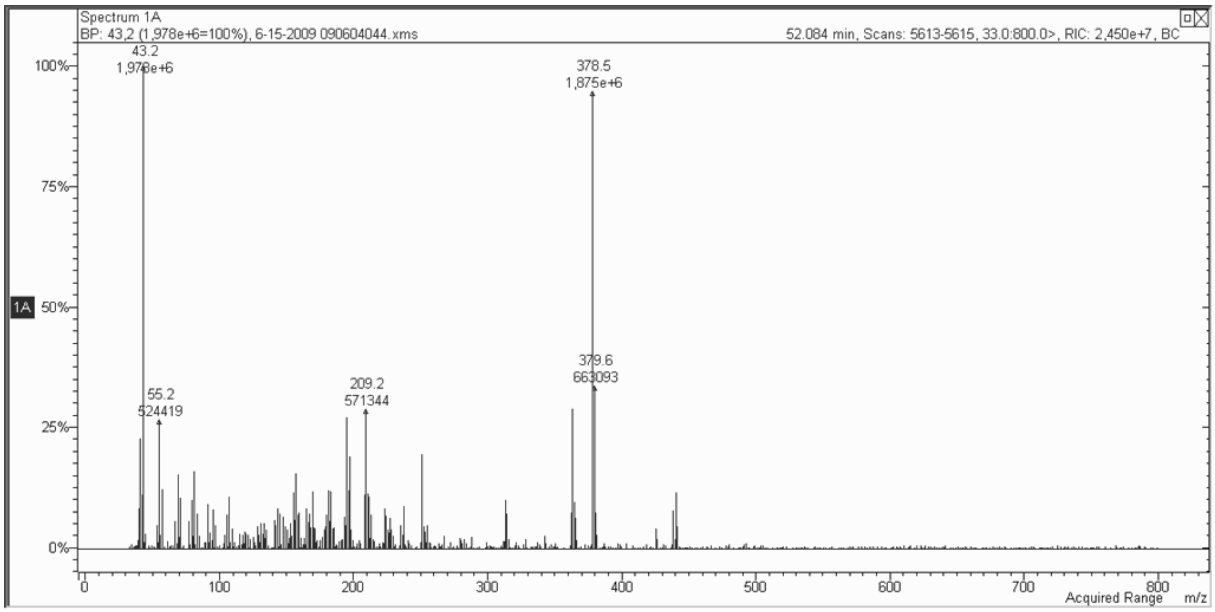

Abbildung IV.33 Massenspektrum bei KI = 3362 (Strukturvorschlag Ergost-5,7,24(28)-trien-3-olacetat).

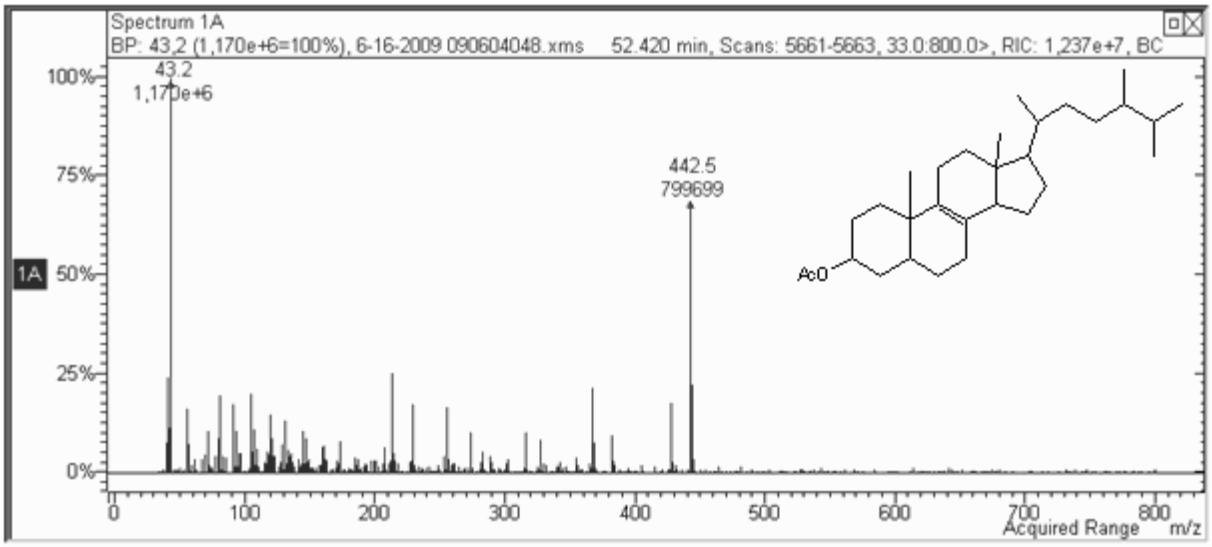

Abbildung IV.34 Massenspektrum bei KI = 3390 (Ergost-8-en-3-olacetat).

Das Spektrum bei KI = 3390 (Abbildung IV.34) zeichnet sich durch ein deutliches Molekülion bei m/z = 442 aus, welches das Spektrum zusammen mit dem Basispeak dominiert. Die Abspaltung von Essigsäure zu m/z = 382 bestätigt das Vorhandensein einer Hydroxygruppe. Die Ionen bei m/z = 315, 273 und 255 ergeben sich durch die Abtrennung der Seitenkette, der Seitenkette mit D-Ring bzw. der Seitenkette mit Essigsäure. Doppelpeaks sind nicht vorhanden, so dass von einer gesättigten C_9H_{19}-Seitenkette ausgegangen werden kann. Das Spektrum wurde Ergost-8-en-3-ol zugeordnet [87].

Bei einem KI = 3406 wird Ergosta-5,7-dien-3-ol identifiziert [87]. Entscheidend hierfür ist, dass zwischen dem Molekülion bei m/z = 440 und dem Basispeak bei m/z = 380 keine signifikanten Signale auftreten (Abbildung V.14 im Anhang).

Ein weiteres Sterol mit einem Molekülion bei m/z = 440 eluiert bei KI = 3419 (Abbildung IV.35). Es zeigt keine dominierende Essigsäureabspaltung, sondern hat einen Basispeak bei m/z = 313, der durch die Abspaltung der Seitenkette entsteht. Das Ion bei m/z = 356 weist auf den Verlust eines C_6H_{12}-Bruchstückes hin. Hierfür kommt nur eine allylische Spaltung der Seitenkette in Frage, bei der die Doppelbindung zwischen C24 und C28 liegen muss. Das Sterol wird nach Vergleich mit [87] und unter der Annahme unveränderter Retentionsreihenfolgen auf OV-1 und HP-5 als Ergosta-7,24(28)-dien-3-ol (Episterol) identifiziert.

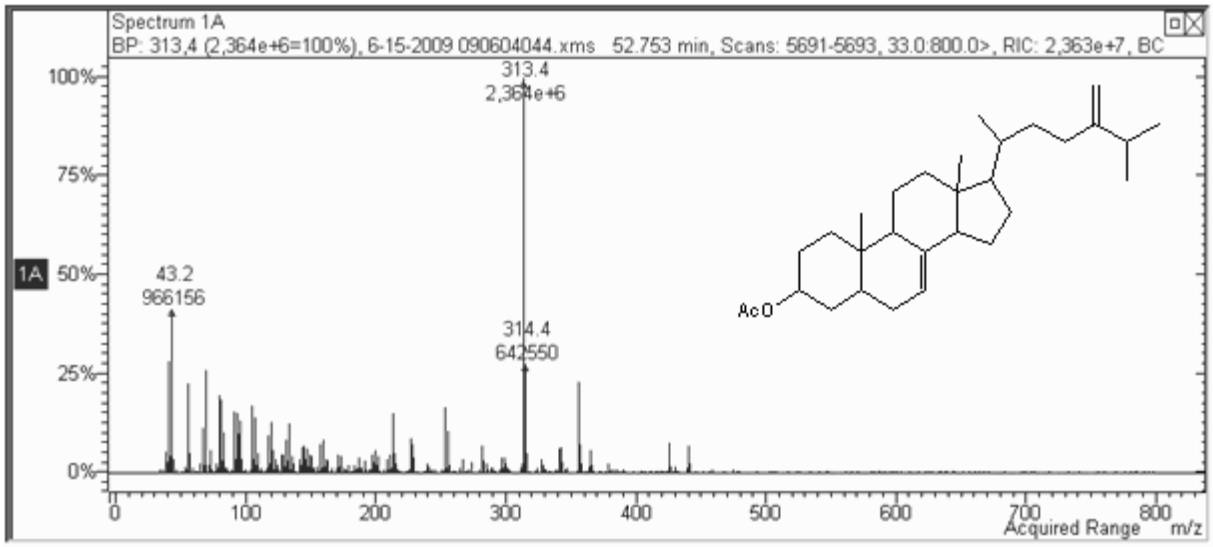

Abbildung IV.35 Massenspektrum bei KI = 3419 (Ergosta-7,24(28)-dien-3-olacetat, Episterolacetat).

Ein Signal mit einem sehr starken Molekülion bei m/z = 454 tritt bei einem KI = 3440 auf (Abbildung IV.36). Charakteristisch sind die Abspaltung eines Moleküls Essigsäure (m/z = 394) sowie die allylische Abspaltung eines C_6H_{12}-Fragmentes (m/z = 370) aus dem Molekülion. Es handelt sich also um eine Verbindung mit einem Molekulargewicht von 412 g mol^{-1}, einer Alkoholfunktion und einer C_9H_{17}-Seitenkette mit Doppelbindung zwischen C24 und C28. Nach Vergleich mit [87] wird dieses Spektrum 4-Methylfecosterol zugeordnet.

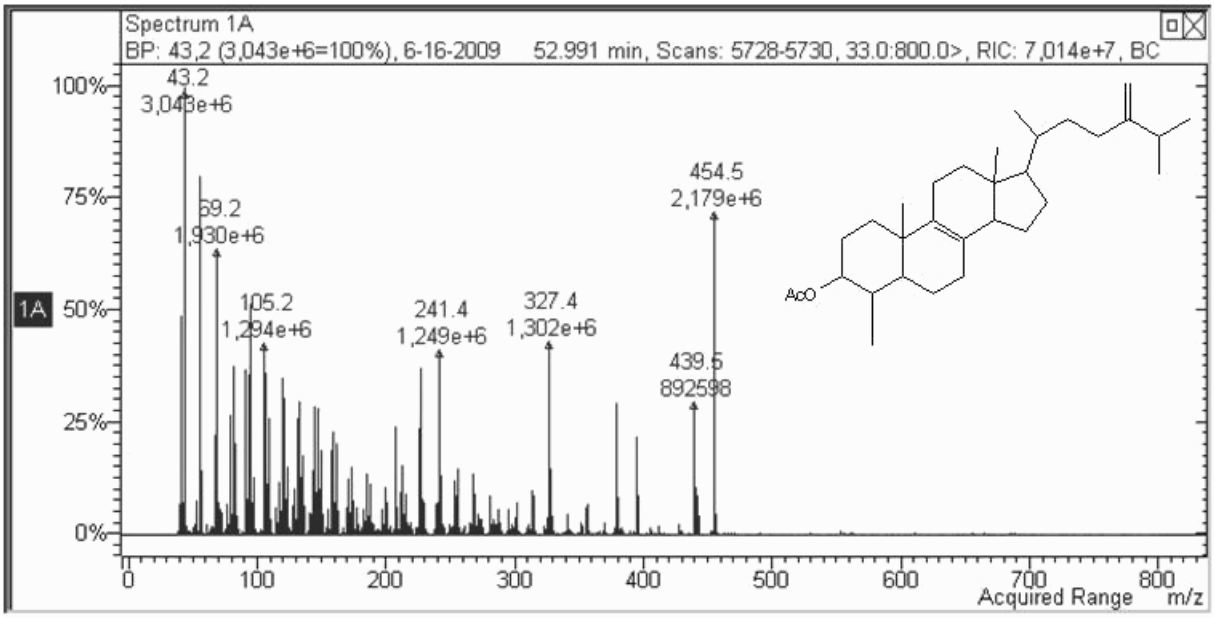

Abbildung IV.36 Massenspektrum bei KI = 3440 (4-Methylergosta-8,24(28)dien-3-olacetat, 4-Methylfecosterolacetat).

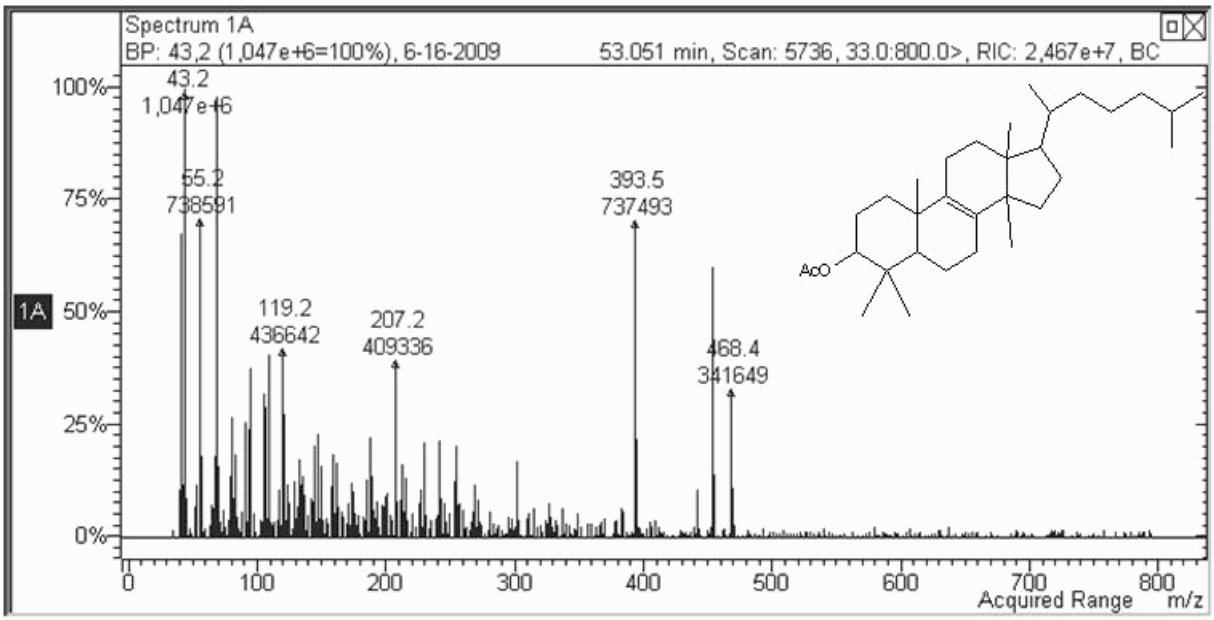

Abbildung IV.37 Massenspektrum bei KI = 3445 (Lanosterolacetat).

Bei KI = 3445 tritt Lanosterol auf (Abbildung IV.37). Dies wird durch die starke Tendenz zur Abspaltung von Methylgruppen (m/z = 468 auf 453, m/z = 408 auf 393), das Auftreten einer acetylierten Hydroxygruppe und das Muster der D-Ring-Spaltung bestätigt. Bei letzterem spaltet sich nicht nur die C_8H_{15}-Seitenkette, das Acetat und C15 bis C17 aus dem Molekülion ab, so dass ein Fragment von m/z = 255 übrig bleibt, sondern es ist zusätzlich ein Fragment bei m/z = 241 zu beobachten, das durch die zusätzliche Abspaltung einer Methygruppe an C14 zu erklären ist [87].

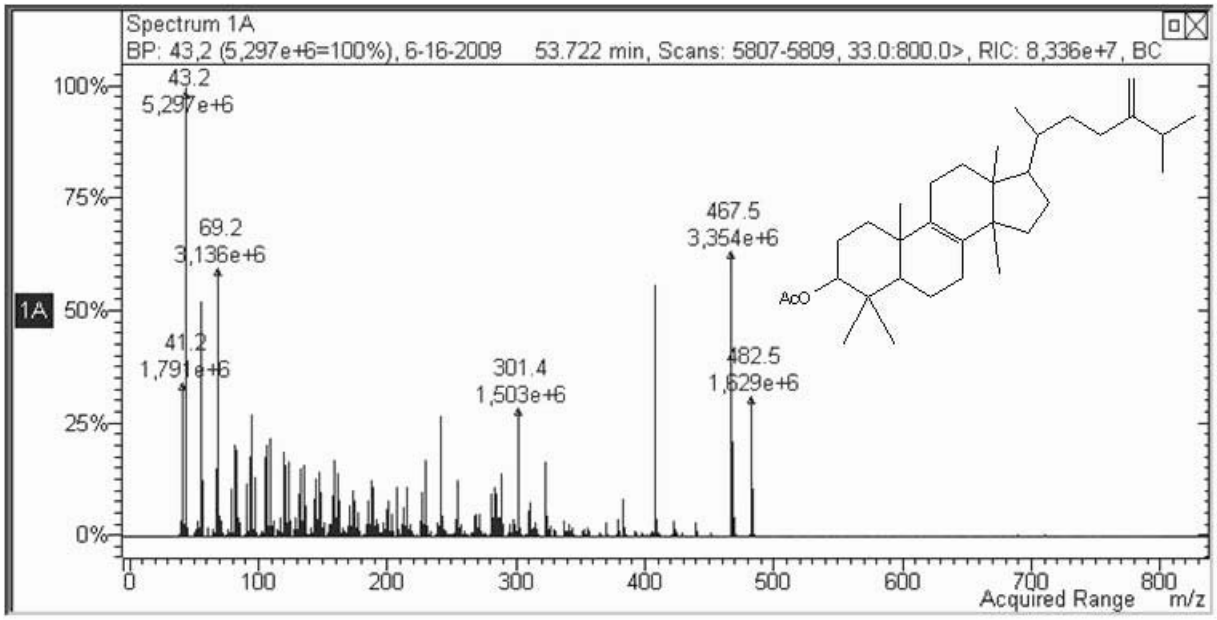

Abbildung IV.38 Massenspektrum bei KI = 3504 (24-Methylen-24,25-dihydrolanosterolacetat, Eburicolacetat).

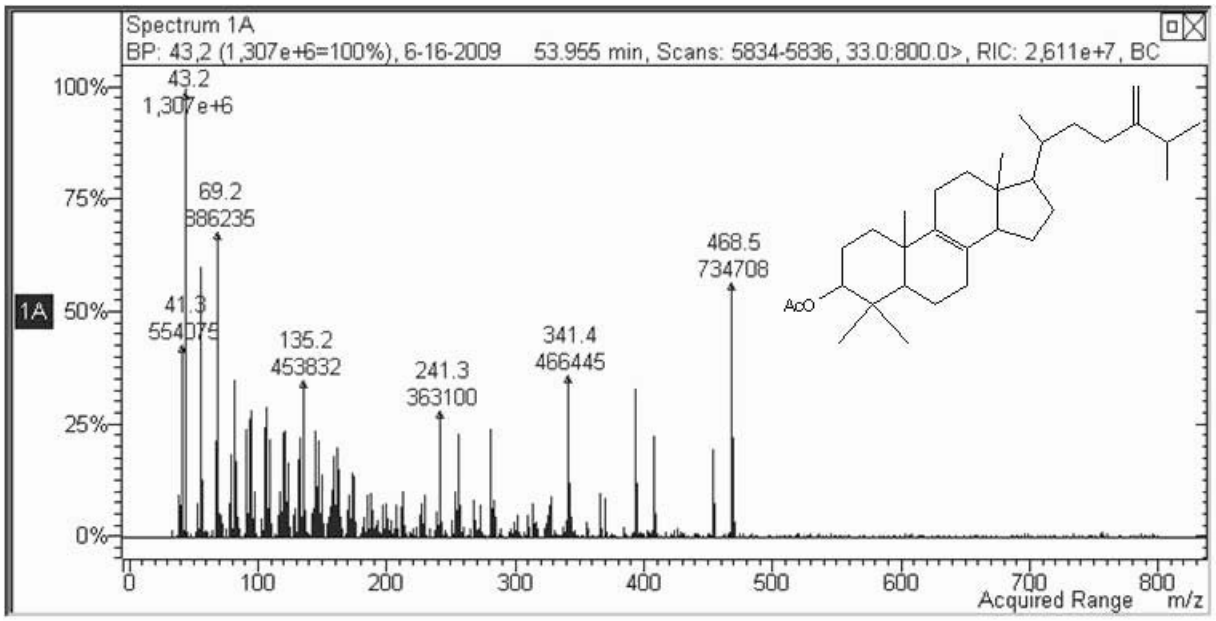

Abbildung IV.39 Massenspektrum bei KI = 3525 (4,4-Dimethylergosta-8,24(28)dien-3-olacetat, 4,4-Dimethylfecosterolacetat).

Abschließend werden bei KI = 3504 Eburicol (24-Methylen-24,25-dihydrolanosterol) und bei KI = 3525 4,4-Dimethylfecosterol, zwei weitere Zwischenstufen der Ergosterolbiosynthese, entdeckt. Die Identifizierung erfolgt bei Eburicol (Abbildung IV.38) über den Vergleich mit [87] und [104], bei 4,4-Dimethylfecosterol (Abbildung IV.39) über [87]. Auch die dort angegeben Elutionsreihenfolge für eine OV-1 Säule würde auf der HP-5 Säule eingehalten.

Nach Debieu [87] eluiert zwischen Lichesterol und Ergosterol Ergosta-8,22-dien-3-ol. Dies ist die Hypothese für den Peak bei KI = 3328 (Abbildung IV.40) mit einem Molekülion bei m/z = 440 (MW = 398 g mol^{-1}). Weil m/z = 229 nicht der Basispeak des Spektrums ist und weil zwar alle angegebenen Signale im gemessenen Spektrum enthalten sind, aber die Intensitäten weniger gut als bei den anderen Zuordnungen übereinstimmen, ist diese Identifizierung weniger gesichert als die anderen mit dieser Quelle.

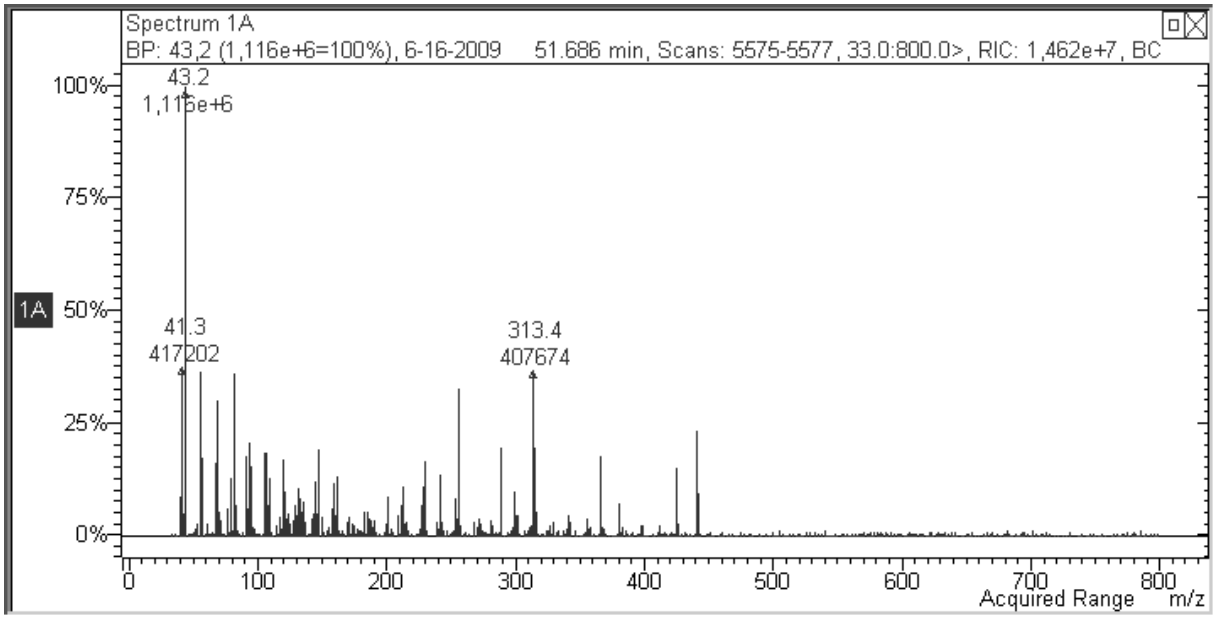

Abbildung IV.40 Massenspektrum bei KI = 3328 (Strukturvorschlag Ergosta-8,22-dien-3-olacetat).

IV.6 Kultivierung

IV.6.1 Biomasse

Pleurotus eryngii, *Pleurotus ostreatus* und *Agrocybe aegerita* wurden in Minimalmedium mit verschiedenen Abfallströmen der Lebensmittelindustrie (Biertreber, Rapspresskuchen, Möhrentrester und Weißkohlabschnitte) in Oberflächenkulturen kultiviert (vgl. III.4).

Beim Vergleich der Biomasse nach neunzehntätiger Kultivierung fällt sofort das starke Wachstum von *P. ostreatus* im Standardnährmedium (SNL) auf. *P. eryngii* und *A. aegerita* erzielten deutlich geringere Trockenmassen, die nur etwa 50% der

P. ostreatus-Ausbeute betrugen. Das Wachstum auf den verschiedenen Nebenströmen lag bei allen drei Pilzen auf einem vergleichbaren Niveau (Abbildung IV.41).

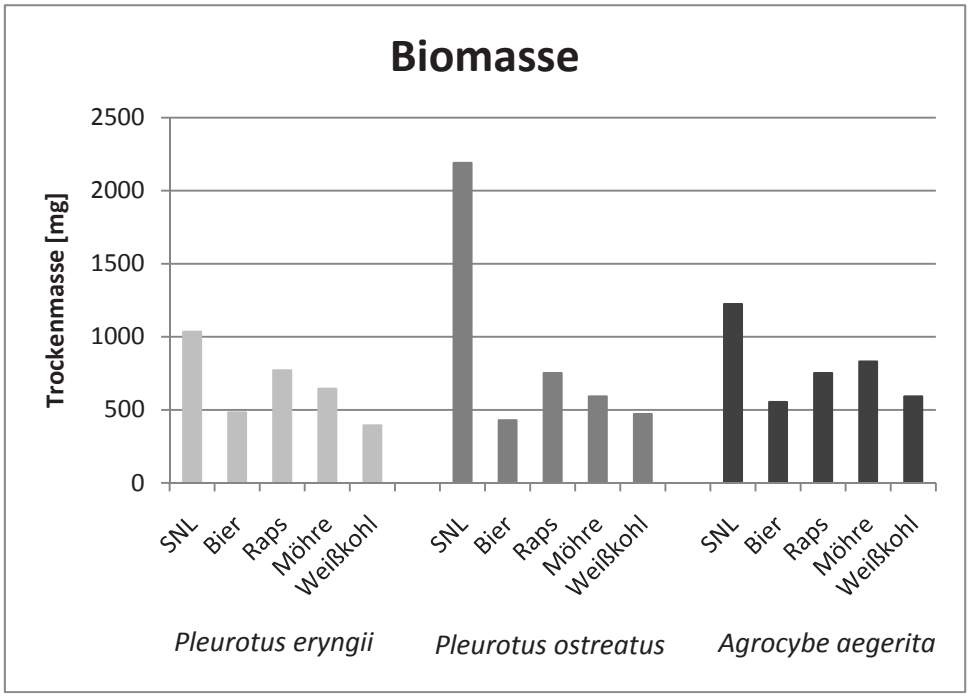

Abbildung IV.41 Trockenmasse nach Gefriertrocknung des Myzels.

Beide *Pleurotus*-Arten zeigten eine höhere Trockenmasse bei der Kultivierung mit Rapspresskuchen und Möhre als bei der Verwendung von Biertreber und Weißkohlabschnitten. *A. aegerita* wuchs mit Raps- und Möhrentrester ebenfalls besser als mit Biertreber und Weißkohlabschnitten, hier erzielte der Möhrentrester jedoch höhere Ausbeuten als der Rapspresskuchen. Interessant war außerdem die Beobachtung, dass *A. aegerita* auf Biertreber und Weißkohlabschnitten Fruchtkörper ausbildete, während beim SNL-Medium Sporenbildung auftrat (Abbildung IV.42).

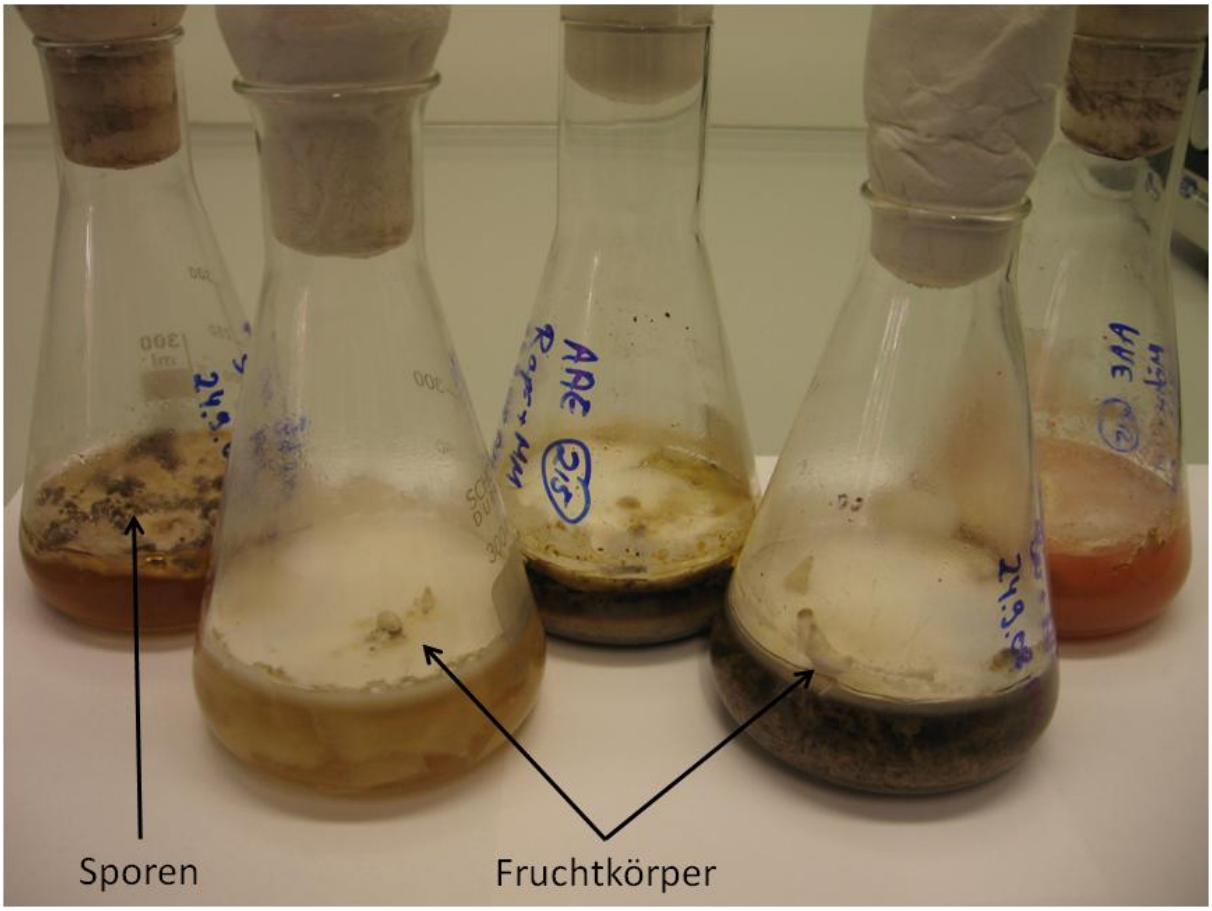

Abbildung IV.42 Fruchtkörper-und Sporenbildung von *A. aegerita* (von links nach rechts: SNL, Weißkohlabschnitte, Rapspresskuchen, Biertreber, Möhrentrester).

Das SNL-Medium bietet vielen verschiedenen Pilzen Wachstumsmöglichkeiten. Neben Glucose und Asparagin als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquelle-Quelle bietet der Hefeextrakt eine Menge an unterschiedlichen Aminosäuren und Vitaminen, die auch speziellere Bedürfnisse der Pilze bedient. Der hohe Gehalt an Glucose als Kohlenstoffquelle (30 g L^{-1}) sorgt für ein schnelles Wachstum, was sich an den hohen Biomasse-Ausbeuten zeigt.

Demgegenüber zeigen die Nebenstromkulturen ein deutlich geringeres Wachstum. Auch wenn durch die Hitzebehandlung beim Autoklavieren ein Teil der Nährstoffe in die flüssige Phase übertritt, so muss der Pilz das wesentlich komplexere Substrat aufschließen und seine enzymatische Aktivität anpassen. Außerdem kann die ausschließliche Ernährung mit diesen Nebenströmen zu einer Unterversorgung mit wichtigen Nährstoffen führen – Veränderungen in der Biomasseproduktion sind daher zu erwarten.

Weißkohlabschnitte und Biertreber sorgen bei *A. aegerita* für ein Einsetzen der Fruchtkörperbildung innerhalb der neunzehntätigen Hauptkulturphase. Auf festen

Medien mit Tee- bzw. Hanf erfolgt eine Fruktifikation erst nach viereinhalb Wochen [50]. Möglicherweise kann eine Zumischung dieser Nebenströme zu dem üblichen Strohsubstrat zu einer schnelleren Fruktifikation und einer besseren Ausbeute des Substrates führen.

IV.6.2 Bioaktivität

Mit den Kulturüberständen und mit dem gefriergetrockneten, extrahierten Myzel wurden Messungen im DPPH- und ORAC-Assay durchgeführt. Zur Messung der antioxidativen Aktivitäten wurden jeweils 100 mg Myzel mit 4 mL Ethanol extrahiert und verdünnt (III.4.3.4). Im DPPH-Assay konnte nur für den Überstand von *A. aegerita* aus der Kultivierung mit Rapspresskuchen eine Aktivität in Höhe von 212,5 ± 1,5 µM BHA-Äquivalenten festgestellt werden. Für das extrahierte Myzel konnte im Rahmen der Messzeit keine Aktivität gegenüber dem DPPH-Radikal festgestellt werden.

Vergleicht man die Trolox-Äquivalente des extrahierten Myzels, so stellte man fest, dass insbesondere die auf Rapspresskuchen gewachsenen Kulturen sehr hohe antioxidative Kapazitäten aufweisen (Abbildung IV.43 bis Abbildung IV.45).

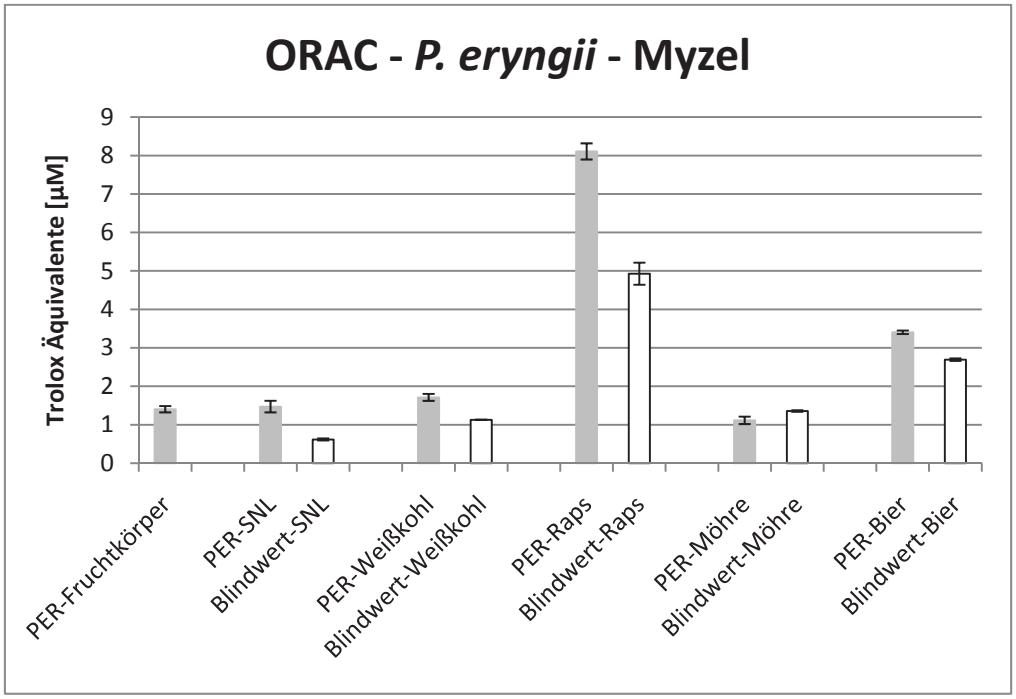

Abbildung IV.43 Trolox-Äquivalente des extrahierten Myzels (hellgrau) von *P. eryngii* mit Blindwerten (weiß) (c = 0,5 mg mL^{-1}).

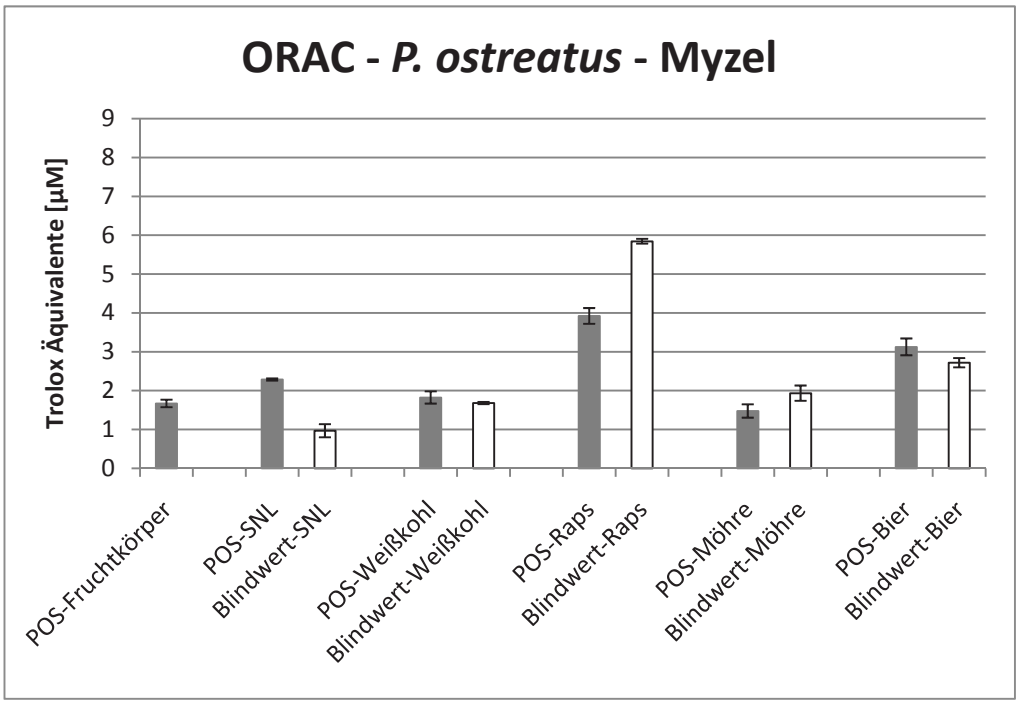

Abbildung IV.44 Trolox-Äquivalente des extrahierten Myzels (grau) von *P. ostreatus* mit Blindwerten (weiß) (c = 0,5 mg mL^{-1})).

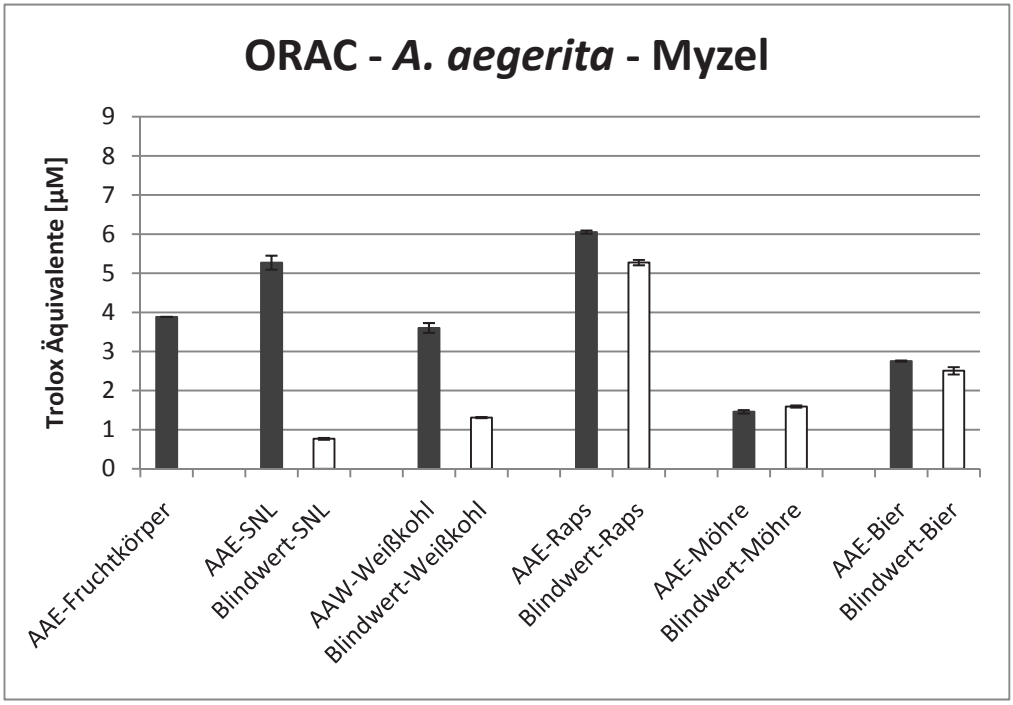

Abbildung IV.45 Trolox-Äquivalente des extrahierten Myzels von *A. aegerita* (dunkelgrau) mit Blindwerten (weiß) (c = 0,5 mg mL^{-1})).

Eine starke Erhöhung der antioxidativen Kapazität gegenüber dem Blindwert zeigte *P. eryngii* auf Rapspresskuchen sowie *A. aegerita* auf Weißkohlabschnitten und

SNL, wobei die Fruchtkörper von *A. aegerita* an sich bereits eine sehr hohe antioxidative Aktivität aufwiesen.

Interessant ist die erhöhte antioxidative Kapazität beim auf Rapspresskuchen gewachsenen *P. eryngii*. Dieser wird zwar von einem hohen Blindwert begleitet, dennoch ist eine deutliche Zunahme auch gegenüber den Fruchtkörpern zu erkennen. *A. aegerita* zeigt dagegen auf Weißkohl und in SNL hohes antioxidatives Potential, dass sich jedoch nicht so stark gegenüber den Fruchtkörpern steigert.

IV.6.3 Sterole

Dass die drei Pilze unterschiedlich Sterole produzieren zeigt beispielhaft der Vergleich der GC-FID-Chromatogramme der Kultivierung auf Rapspresskuchen (Abbildung IV.46).

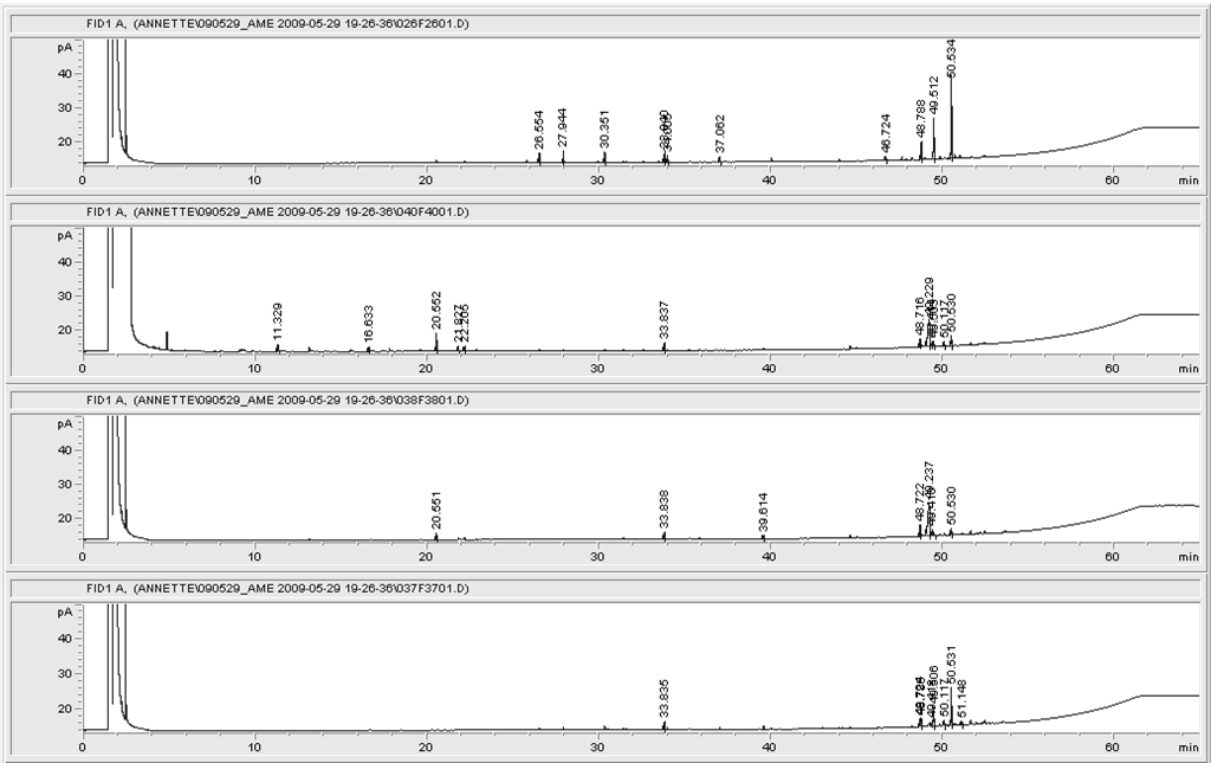

Abbildung IV.46 GC-FID-Chromatogramm der Kultivierung auf Rapspresskuchen: Blindwert, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *A. aegerita* (von oben nach unten). Die Geräteparameter sind in III.2.5.1 aufgeführt.

Nur die Fraktionen mit höheren antioxidativen Kapazitäten wurden per GC-MS in acetylierter Form untersucht (vgl. III.4.3.5). Dies betraf das auf Rapspresskuchen

gewachsene Myzel von *A. aegerita* und *P. eryngii*, die Kultur von *A. aegerita* auf Weißkohlabschnitten und die dazugehörenden Blindwerte (Tabelle IV-14).

Tabelle IV-14 Verbindungen aus der GC-MS-Untersuchung des auf Nebenströmen kultivierten Myzels

KI	Massenfragmente (%)	Strukturvorschlag	Kultur
3298	380 (100), 331 (16), 209 (16), 191 (15)		Blindwert, Raps
3359	382 (100), 367 (22), 281 (9), 274 (11)		Blindwert, Raps
3450	396 (100), 381 (20), 288 (9), 147 (18)	β-Sitosterolacetat	Blindwert, Raps
3288	436 (11), 376 (100), 362 (7), 361 (6), 251 (34), 207 (18)		*A. aegerita*, Raps
3358	382 (100), 367 (15), 281 (53), 265 (13), 207 (27)		*A. aegerita*, Raps
3450	396 (100), 381 (20), 288 (9), 147 (18)	β-Sitosterolacetat	*A. aegerita*, Raps
3335	438 (20), 378 (100), 363 (52), 331 (20), 281 (17), 253 (26)		*P. eryngii*, Raps
3450	396 (100), 381 (17), 288 (7), 281 (10), 275 (8), 255 (8), 207 (11)	β-Sitosterolacetat	Blindwert, Weißkohl
3289	436 (10), 376 (100), 361 (13), 251 (19), 197 (13)		*A. aegerita*, Weißkohl

Hierdurch konnte in den Blindwerten β-Sitosterol, ein weit verbreitetes pflanzliches Sterol, als Hauptsterol gefunden werden. Es tauchte ebenfalls in der Raps-Kultur von *A. aegerita* auf; in der Raps-Kultur von *P. eryngii* sowie der Weißkohl-Kultur von *A. aegerita* war es dagegen nicht zu finden. Möglicherweise wurde es vom Pilz verstoffwechselt.

Durch den späten Zeitpunkt der Messung aufgrund technischer Probleme konnten erheblich weniger Sterole detektiert werden, als in den GC-FID-Chromatogrammen erkennbar waren.

IV.7 Isolierte und identifizierte Substanzen

In dieser Arbeit wird zwischen eindeutig identifizierten und identifizierten Substanzen sowie zwischen Strukturvorschlägen unterschieden. Die eindeutig identifizierten Substanzen sind Ergosterol und Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol sowie die Fettsäuremethylester, die alle durch den Vergleich mit Standardsubstanzen identifiziert worden sind.

Substanzen werden als identifiziert betrachtet, wenn

- ein Literaturspektrum für die betreffende Verbindung zum Vergleich herangezogen werden kann,
- eine logische Elutionsreihenfolge auf CCC und GC eingehalten wird und
- die Substanz bereits in Pilzen identifiziert worden ist,
- aber der endgültige Beweis mittels NMR oder Vergleichssubstanz noch aussteht.

In diese Gruppe gehören Ergosta-2,5,7,9(11)22-pentaen, Neoergosterol, Fungisterol, Lichesterol, Cerevisterol und Episterol sowie Ergosta-5,7-dien-3-ol, Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergost-8-en-3-ol, Lanosterol, Eburicol, 4-Methyl- und 4,4-Dimethylfecosterol.

Strukturvorschläge ergeben sich durch die Interpretation der jeweiligen Massenspektren der Substanz vor und/oder nach Derivatisierung und durch den Vergleich mit bereits in Pilzen identifizierten Sterolen. Literaturspektren sowie authentische Standards haben nicht vorgelegen und somit konnten die Strukturen nicht weiter abgesichert werden. Die Strukturvorschläge sind Ergosta-8,22-dien-3-ol, Ergosta-5,7,24(28)-trien-3-ol, Portensterol und 3,5-Dihydroxyergosta-7,22-dien-6-on.

Aus *Pleurotus eryngii* wurden bisher die Sterole 5α,9α-Epidioxy-8α,14α-epoxy-(22*E*)-ergosta-6,22-dien-3β-ol, 3β,5α-Dihydroxyergost-7-en-6-on, 6β-Acetoxy-(22*E*)-ergosta-7,22-dien-3β,5α-diol, 3β,5α-Dihydroxy(22*E*)-ergosta-7,22-dien-6-on, 5,8-Epidioxyergosta-6,22-dien-3β-ol (Ergosterolperoxid), 5α,9α-Epidioxy-(22*E*)-ergosta-7,22-dien-3β,6β-diol und 5α,9α-Epidioxy-3β-hydroxy-(22*E*)-ergosta-7,22-dien-6-on sowie 3β,5α,9α-Trihydroxy-(22*E*)-ergosta-7,22-dien-6-on von Yaoita et al. isoliert [94]. Neu ist der eindeutige Nachweis von Ergosterol und Ergosta-5,7,9(11),22-dien-3-ol sowie die Identifizierung von Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen, Ergosta-7,22-dien-3-ol, Fungisterol, Ergosta-5,7-dien-3-ol und Cerevisterol in dieser Arbeit.

In *Agrocybe aegerita* wurden bereits Ergosterol, Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergosta-5,7-dien-3-ol und Fungisterol sowie Ergosterolperoxid nachgewiesen [23, 104]. Von Cosceeva wurden Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol, Anthraergostatetraenol, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-methylether, Ergosterol, Ergosta-5,8-dien-3β-ol, Ergosta-7,22-dien-3β-ol, Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol), Lanosterol, Ergost-5-en-3β-olacetat und Linolsäure als Inhaltsstoffe von *A. aegerita* durch Spektrenvergleich identifiziert [83].
Hinweise auf Ergosta-5,8-dien-3-ol, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-methylether und Ergost-5-en-3β-olacetat gab es in den acetylierten Proben nicht.
Ein Vergleich des Spektrums für Ergosta-5,8-dien-3-ol aus [83], welches wahrscheinlich nur mit einem Bibliotheksspektrum verglichen worden ist, mit dem Spektrum für Ergosta-5,7-dien-3-ol aus dieser Arbeit (Abbildung IV.18) zeigt sehr große Ähnlichkeit. Wahrscheinlich handelt es nicht um Ergosta-5,8-dien-3-ol, das bisher fast ausschließlich bei Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus spp*. nachgewiesen wurde [105], sondern um Ergosta-5,7-dien-3-ol, einem normalen Zwischenprodukt der Ergosterolbiosynthese.
Eine Suche nach Anthraergostatetraenol lieferte sowohl bei Google als bei Science Direct (Stand: 04.09.2009) keine Treffer auf natürlich vorkommende Steroide. Es ist wahrscheinlicher, dass es sich um ein unbekanntes Isomer des Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ols handelt.
Neu ist also der eindeutige Nachweis von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol sowie die Identifizierung von Lichesterol, Neoergosterol, Episterol, 4-Methylfecosterol, Eburicol, 4,4-Dimethylfecosterol und Cerevisterol in dieser Arbeit.

Die Biosynthese des Ergosterols aus Lanosterol wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, in dem Schimmelpilz *Fusarium spp*. sowie in dem Basidiomycet *Ustilago maydis* untersucht [87, 89]. In *U. maydis*, wie in den meisten filamentösen Pilzen, wird in Lanosterol (a) zunächst eine Methylengruppe an C24 eingeführt, wobei 24-Methylen-24,25-dihydrolanosterol (Eburicol, (b)) resultiert (Abbildung IV.47). Danach folgt eine Demethylierung an C14 und die Reduktion der entstehenden C14-C15-Doppelbindung zum 4,4-Dimethylfecosterol (d), bevor nacheinander die beiden Methylgruppen an C4 zum Fecosterol (e) abgespalten werden. Erst jetzt findet die Isomerisierung der Δ^8-Doppelbindung zur Δ^7-Doppelbindung statt. In das so entstan-

dene Episterol (f) werden nacheinander die Doppelbindungen an C5 sowie an C22 eingeführt, bevor abschließend die Doppelbindung an C24 reduziert wird und somit Ergosterol (i) entsteht.

Lanosterol, Eburicol, 4,4-Dimethylfecosterol, 4-Methylfecosterol und Episterol sind demnach als Stoffwechselprodukte in der Biosynthese von Ergosterol anzusehen und ihr Auftreten in *A. aegerita* daher zu erwarten.

Weete [106] legte allerdings dar, dass unterschiedliche Synthesewege auch in einem einzelnen Organismus auftreten können. Bei *Candida spp*. und vermutlich auch in einigen Basidiomyceten verläuft die Biosynthese von Fecosterol über Epi- zum Fungisterol (Ergost-7-en-3-ol). Aus diesem wird dann Ergosta-5,7-dien-3-ol und schließlich Ergosterol gebildet. Unter diesem Aspekt kann das Auftreten dieser Sterole ein Hinweis auf einen alternativen (*A. aegerita*) bzw. bevorzugten Syntheseweg (*P. eryngii*) sein.

Als Sterole außerhalb dieser Biosynthesewege sind Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, Cerevisterol sowie Neoergosterol und Lichesterol anzusehen. Sie könnten besondere Funktionen im Pilz übernehmen. Zumindest von Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol und Cerevisterol sind einige bioaktive Wirkungen bekannt, während von den anderen Sterolen keine Daten vorhanden sind.

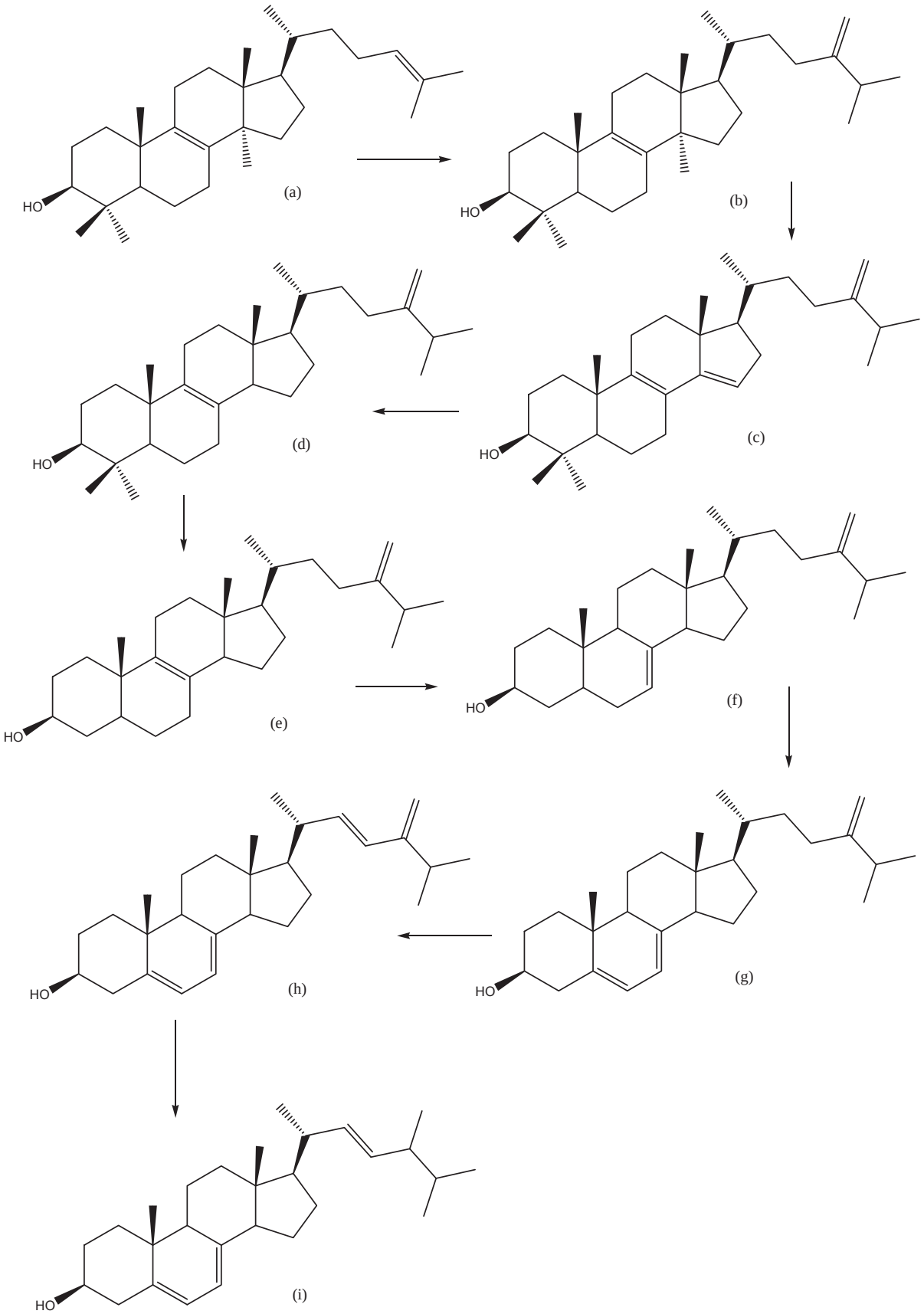

Abbildung IV.47 Biosyntheseweg des Ergosterols im Basidiomyceten *Ustilago maydis* [89] (Lanosterol (a), Eburicol (b), 4,4-Dimethylergosta-8,14,24(28)-trien-3-ol (c), 4,4-Dimethylfecosterol (d), Fecosterol (e), Episterol (f), Ergosta-5,7,24(28)-trien-3-ol (g), Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol (h), Ergosterol (i)).

Der folgende Abschnitt fasst die Einzelstoffdaten der identifizierten Sterole zusammen.

IV.7.1.1 Ergosterol

Ergosterol ist das Hauptsterol in vielen Asco- und Basidiomyceten. Es kommt ebenso auch in Hefen und in geringen Mengen höheren Pflanzen wie z.B. Palmöl vor [93, 104]. Ergosterol ist ein Vorläufer von Vitamin D_2 und setzt sich unter UV-Bestrahlung in aktives Vitamin um.

Außerdem wirkt Ergosterol selektiv auf humane Acyl-CoA : Cholesterol Acyltransferasen (ACAT). Die ACAT katalysieren die Veresterung von Cholesterol mit Fettsäuren und sind daher ein attraktives Ziel zur Vorbeugung und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. Ergosterol inhibierte in einer Konzentration von 25 µM selektiv die ACAT I zu 23% [107].

Ergosterol wurde nicht nur in dieser Arbeit (vgl. Tabelle IV-2), sondern auch von Zhang et al. auf Cyclooxygenase inhibierende Eigenschaften getestet. Zhang nutzte dafür eine Mikrosauerstoffkammer und maß die Aufnahme von Sauerstoff mit einer Elektrode. In einer Konzentration von 100 µg mL^{-1} wurde die COX I zu 19%, die COX II zu 28% gehemmt, während bei 250 µg mL^{-1} praktisch vollständige Inhibierung auftrat [22, 23]. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Kit konnte eine Inhibierung der COX II von 79 % bei einer Konzentration von 40 µg mL^{-1} in der Reaktionsmischung gemessen werden (Tabelle IV-2). Auch wenn dieser Wert aus den in IV.8.2 genannten Gründen nicht belastbar ist, so liegt er doch in derselben Größenordnung wie die von Zhang ermittelten Werte.

Ergosterol wies im lipophilen ORAC-Assay in einer Konzentration von 5 µg mL^{-1} eine antioxidative Kapazität von 7,5 µM Trolox-Äquivalenten (TE) auf (vgl. Tabelle IV-12). *P. eryngii* enthält etwa 150 mg Ergosterol pro 100 g Trockenmasse (vgl. Tabelle IV-11).

IV.7.1.2 Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol

Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol wurde bisher in dem Zygomycet *Mucor rouxii*, in dem Ascomycet *Gibberella fujikuroi*, in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und im Basidiomyceten *Pleurotus sajor-caju* sowie in dem Schwamm *Biemna fortis* nachgewiesen [85, 108-111].

Es wurde auch aus der Pflanze *Ajuga remota* isoliert. Im Zuge dieser Isolierung wurde festgestellt, dass die minimale Hemmkonzentration (MIC) von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* bei einer Konzentration von 128 µM lag [112].

In einer Konzentration von 5 µg mL^{-1} wies diese Verbindung eine COX-Hemmung von etwa 60 % für beide Isoenzyme auf (Tabelle IV-13). Dieser Wert sollte aus den in IV.8.2 genannten Gründen nicht absolut gesehen werden, gibt aber einen Hinweis, dass Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, welches Ergosterol strukturell sehr ähnlich ist, ebenfalls Cyclooxygenase inhibierende Eigenschaften besitzt.

Im lipophilen ORAC-Assay wies Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (c = 5 µg mL^{-1}) eine antioxidative Kapazität von 6,8 µM TE auf. Der Gehalt an dieser Verbindung beträgt etwa 4 mg pro 100 g Trockenmasse in *P. eryngii* (vgl. Tabelle IV-11).

IV.7.1.3 Ergosta-2,5,7,9(11)22-pentaen

Diese Verbindung wurde von Nieto et al. als natürlich vorkommendes Steroid in *Pleurotus sajor-caju*, *Laccaria laccata* und *Ganoderma australe* vorgestellt [85, 113, 114]. Nieto et al. sind sich bewusst, dass bei Aufarbeitungsprozessen Artefakte entstehen können. So publizierten sie 2005, dass Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol ein Artefakt sei, das durch die Extraktion von *P. sajor-caju* mit Chloroform entstünde [115]. Dieser Vorbehalt ist allerdings der Veröffentlichung von 2008 über Sterole in *P. sajor-caju* [85] nicht mehr zu entnehmen.

Ergosta-2,5,7,9(11)22-pentaen wird weder im Dictionary of Steroids [93] als natürlich vorkommendes Steroid noch im Handbook of Secondary Fungal Metabolites [104] als Sekundärmetabolit eines Pilzes aufgeführt und erscheint auch nicht bei den Biogenese-Studien in *Fusarium spp.* oder *Saccharomyces cerevisiae* [87, 89]. Auch eine Suche bei SciFinder und Beilstein Crossfire (Stand: 07.8.2009) ergab keine weiteren Anhaltspunkte dafür, dass diese Verbindung bereits isoliert oder synthetisiert worden ist. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich bei der in dieser Arbeit identifizierten Verbindung um einen Artefakt, vielleicht aus Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, handelt.

IV.7.1.4 19-Norergosta-5,7,9,22-tetraen-3-ol

19-Norergosta-5,7,9,22-tetraen-3-ol (Neoergosterol) wurde bereits im Basidiomycet *Pleurotus sajor-caju* und im Zygomycet *Phycomyces blakesleeanus* nachgewiesen [85, 116]. Bisher ist nur eine östrogene Wirkung des Neoergosterols bekannt [117].
Eine verwandte Substanz, das 19-Norergosta-5,7,9,24(28)-tetraen-3-ol (Phycomysterol A), wurde auf anti-HIV- und antitumorale Wirkung untersucht und zeigte antivirale Aktivitäten sowie antitumorale Aktivitäten gegen humane Krebszelllinien aus Lunge, Haut und Darm [116]. Es kann spekuliert werden, dass das strukturell ähnliche Neoergosterol in gleicher Weise wirken könnte.

IV.7.1.5 Fungisterol

Ergost-7-en-3β-ol (Fungisterol) wurde nicht nur in vielen höheren Pilzen wie *Agaricus bisporus*, *Armillaria mellea*, *Coriolus versicolor*, *Grifola frondosa* und *Pholiota aegerita* sondern auch in der Alge *Chlorella ellipsoidea*, in der Flechte *Parmelia fufuracea* und in *Penicillium chrysogenum* nachgewiesen [93, 104, 118]. *P. eryngii* enthält etwa 15 mg Fungisterol pro 100 g Trockenmasse (vgl. Tabelle IV-11).
Es sind keine Daten zur Bioaktivität verfügbar.

IV.7.1.6 Cerevisterol

Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (Cerevisterol) wurde bislang in *Amanita phalloides*, *Fusarium moniliforme* und *Myriapora truncata* und einigen anderen Pilzen nachgewiesen [93]. Auch aus *Grifola gargar* wurde ein Extrakt gewonnen, der Cerevisterol enthielt, und als Behandlungsmittel bei Osteoporose patentiert wurde [119].
In Tests mit verschiedenen Zelllinien zeigte Cerevisterol zum Teil moderate zytotoxische Wirksamkeit [120]. Beim Test auf fungizide Wirkung an *Candida albicans*, *Tricophyton rubrum* und *Aspergillus niger* wies Cerevisterol minimale Hemmkonzentration von 250 µg mL^{-1} für *C. albicans* auf, war aber auch in einer Konzentration von 500 µg mL^{-1} nicht gegen die beiden anderen Organismen aktiv [121]. Etwa 2 mg Cerevisterol pro 100 g Trockenmasse sind in *P. eryngii* enthalten (vgl. Tabelle IV-11).

IV.7.1.7 Ergosta-7,22-dien-3-ol

Ergosta-7,22-dien-3β-ol wurde sowohl in der 24*R*- als auch in der 24*S*-Form bisher aus vielen Hefen und holzzersetzenden Pilzen wie *Armillaria mellea*, *Coriolus versicolor*, *Pholiota aegerita* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie in *Ganoderma pfeifferi* isoliert [86, 93, 122].

Die Verbindung besitzt antibakterielle Wirksamkeit gegen *Bacillus cereus* und *Staphylococcus aureus* [123], aber nicht gegen *B. subtilis* [124] oder gegen die Pilze *Microsporum cannis* und *Trichophyton mentagrophytes* [125]. In jüngerer Zeit wurde eine antivirale Aktivität der 24*S*-Form gegen *Herpes simplex* mit einem IC_{50}-Wert von 0,03 µg mL^{-1} festgestellt [86]. Ergosta-7,22-dien-3-ol könnte daher aufgrund antibakterieller und antiviraler Eigenschaften unterstützend auf das Immunsystem wirken. Der Gehalt an dieser Verbindung beträgt etwa 3 mg pro 100 g Trockenmasse in *P. eryngii*.

IV.7.1.8 Ergosta-5,7-dien-3-ol

Ergosta-5,7-dien-3β-ol wurde in verschiedenen Basidio- und Ascomyceten nachgewiesen, u.a. *Agaricus bisporus*, *Armillaria mellea*, *Aspergillus parasiticus*, *Pholiota aegerita* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie im Mutterkorn (*Claviceps purpurea*) und in der Weinrebe (*Vitis vinifera*) [93, 104]. Es sind keine Daten zur Bioaktivität verfügbar.

IV.7.1.9 Ergosta-7,24(28)-dien-3-ol (Episterol)

Ergosta-7,24(28)-dien-3β-ol (Episterol) wurde u.a. aus *Flammulina velutipes*, *Lentinus edodes*, *Agaricus campestris*, *Phycomyces blakesleeanus* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie aus dem Seestern *Asterias amurensis* isoliert [93, 104]. Es sind keine Daten zur Bioaktivität verfügbar.

IV.7.1.10 Lichesterol

Abgesehen von der gewöhnlichen Gelbflechte *Xanthoria parientina* wurde Ergosta-5,8,22-trien-3β-ol (Lichesterol) u.a. auch in *Flammulina velutipes*, *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen [93, 104]. Es sind keine Daten zur Bioaktivität verfügbar.

IV.7.1.11 Lanosterol

Lanosta-8,24-dien-3β-ol (Lanosterol) wurde in vielen Pilzen, u.a. in *Agaricus campestris*, *Phycomyces blakesleeanus* und *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen [104]. Es sind keine Daten zur Bioaktivität verfügbar.

IV.7.1.12 Eburicol, 4-Methyl- und 4,4-Dimethylfecosterol

Eburicol (24-Methylen-24,25-dihydrolanosterol) wurde bisher aus *Agaricus campestris*, *Phycomyces blakesleeanus, Neurospora crassa* und einigen *Candida spp*. isoliert [104]. 4-Methyl- und 4,4-Dimethylfecosterol wurden in *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago maydis* und *Fusarium spp*. gefunden [87, 89]. Es sind keine Daten zur Bioaktivität verfügbar.

IV.8 Bioaktivitätstests

IV.8.1 Antioxidative Assays

Es stellte sich heraus, dass die Aktivität der Extrakte von dem System abhängig war, in dem man sie testete: Lipophile Extrakte zeigen im lipophilen ORAC-System eine höhere Aktivität, während polarere Extrakte im klassischen hydrophilen ORAC eine höhere antioxidative Kapazität aufweisen (vgl. Abbildung IV.3).
Durch die Messung der Einzelsubstanzen konnte gezeigt werden, das lipophile Sterole und grenzflächenaktive Fettsäuren im ORAC-Testsystem effektiv Peroxylradikale abfingen. Diese Stoffgruppen trugen zur antioxidativen Kapazität der Hexan- und Dichlormethan-Extrakte bei *P. eryngii* und *A. aegerita* bei. Die klassischen phenolischen Antioxidantien liegen meist nur in geringen Mengen in Pilzen vor [126] und könnten der Grund für die geringen Aktivitäten im DPPH-Assay sowie der polareren Extrakte im ORAC-Assay sein.

IV.8.1.1 DPPH

Das Diphenylpikrylhydrazyl-Radikal kann besonders effektiv durch kleinere, phenolische Moleküle reduziert werden. Größere Moleküle können nur schwer das sterisch gehinderte Radikal reduzieren und können sogar inaktiv im Assay sein [6, 37]. Da Pilze (*Agaricus bisporus*, *P. ostreatus*, *Lentinus edodes*) sehr arm an

Phenolen sind und Flavonoide nicht detektiert wurden [126], war zu erwarten, dass im DPPH-Assay keine hohen Aktivitäten auftraten.

Lo [127] untersuchte Extrakte von *Agrocybe aegerita* mit verschiedenen antioxidativen Assays (u.a. ABTS, DPPH, Inhibierung der LDL-Oxidation) und bestimmte den Gesamtphenolgehalt nach der Folin-Ciocalteu-Methode. Dabei zeigte der Methanol-Rohextrakt einen Gehalt von 15,3 mg pro g Extrakt Gallussäure-Äquivalente (GAE), während der daraus gewonnene Ethylacetat-Extrakt durch die zusätzliche Aufkonzentrierung einen höheren Gehalt von 51,2 mg g^{-1} GAE erzielte. Die Konzentration der Ethylacetat-Fraktion, um 50% aller DPPH-Radikale zu reduzieren (EC_{50}), betrug 1,16 mg mL^{-1}. Diese Fraktion zeigte auch in allen anderen Tests die besten antioxidativen Eigenschaften und dies korrelierte mit dem Phenolgehalt.

Bei *Pleurotus ostreatus* wurde mit einer abgewandelten Methode im Methanol-Extrakt ein Gehalt von 15,7 mg g^{-1} GAE festgestellt, der EC_{50}-Wert dieses Extrakts betrug etwa 4 mg mL^{-1} [128]. Diese Gehalte sind höher als bei anderen kommerziell gezüchteten Speisepilzen wie z.B. *Flammulina velutipes*, aber niedriger als bei sogenannten medizinischen Pilzen wie z.B. *Ganoderma lucidum* [129].

Es wurden auch die radikalfangenden Eigenschaften eines kalten ethanolischen Extraktes von *P. ostreatus* und *P. eryngii* bestimmt. In einer Konzentration von 800 µg Extrakt pro mL zeigte *P. eryngii* eine einfangende Wirkung von 29,1 %, *P. ostreatus* von 25,6 %. Der Phenolgehalt nach Folin-Ciocalteu betrug 0,44 bzw. 0,39 mg g^{-1} [130]. In *P. eryngii* wurde über geringe Mengen an Gallussäure, Protocatechusäure und Naringin und bei *P. ostreatus* zusätzlich Homogentisinsäure, Chlorogensäure sowie Myricetin berichtet und eine positive Korrelation zwischen diesen Substanzen und den radikaleinfangenden Eigenschaften beim DPPH-Test gefunden [131]. Die Gesamtgehalte sind allerdings mit 28 µg g^{-1} bei *P. eryngii* bzw. 90 µg g^{-1} bei *P. ostreatus* recht gering.

Die sichtbare Entfärbung des DPPH-Reagenzes bei den Extrakten aus Fruchtkörpern und dem Kulturüberstand von *Agrocybe aegerita* (vgl. IV.1 und IV.6.2) könnte ein Hinweis auf einen höheren Phenolgehalt bzw. eine andere Zusammensetzung der phenolischen Komponenten als bei den *Pleurotus spp*. hindeuten.

IV.8.1.2 ORAC

Der ORAC-Assay wurde bereits auf viele Früchte, Gemüsesorten und Gewürze angewandt, aber nur auf wenige Pilze [42].

Für einen Extrakt mit 50 %igem Aceton aus *Pleurotus ostreatus* wurde ein Wert von 5,67 µmol TE für den lipophilen und 49,67 µmol TE pro g Trockenmasse für den hydrophilen ORAC angegeben [132]. Zusätzlich wurde auch die Fähigkeit getestet, Hydroxylradikale (HORAC), Peroxynitritanionen (NORAC) und Superoxidanionen (SORAC) abzufangen. Diese Werte wurden auch für *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* und *Grifola frondosa* bestimmt. Die Werte im ORAC-Assay und seinen Varianten wiesen auf signifikante Unterschiede zwischen den Pilzarten hin, jedoch zeigte *A. bisporus* die höchsten Aktivitäten in allen Assays. Dies korrelierte auch mit dem Gehalt an Polyphenolen nach der Folin-Ciocalteu-Methode, aber nicht mit dem Gehalt an Ergothionein. Ergothionein (2-Mercapto-N,N,N-trimethyl-L-histidiniumbetain) chelatisiert zweiwertige Metallionen und wirkte in mehreren Tests antioxidativ. Da es in Säugetiergewebe in Konzentrationen bis zu 2 mM vorkommt, wird vermutet, dass es *in vivo* antioxidativ wirkt [132, 133]. Der Ergothionein-Gehalt war in *P. ostreatus* mit 2,59 mg g^{-1} Trockengewicht am höchsten, die antioxidative Kapazität *in vitro* jedoch nicht.

Summiert man die Werte für den lipophilen und hydrophilen ORAC zum total ORAC-Wert (T-ORAC), so liegt der oben angegebene Wert für *P. ostreatus* bei ca. 55 µM TE pro Gramm Trockenmasse bzw. 5500 µM TE pro 100 g. Berücksichtigt man, dass die Trockenmasse nur ca. 10 % des Frischgewichts ausmacht, können die Trolox-Äquivalente auf ca. 550 µM TE pro 100 g Frischgewicht extrapoliert werden. Dies liegt im normalen Bereich für Gemüse (Tabelle IV-15).

Tabelle IV-15 T-ORAC-Werte für verschiedene Gemüsesorten [134] und Pilze (extrapoliert)

Gemüse	Zubereitungs-art	T-ORAC [µM TE pro 100 g]
Broccoli	roh	1362
Möhren	gekocht	317
Eisbergsalat	roh	438
Salat, rotblättrig	roh	2380
Austernpilze	roh	550

Die in dieser Arbeit gemessenen Werte lassen sich nicht direkt mit den Werten von Dubost et al. [132] vergleichen, da Dubost einen Kaltextrakt mit 50%igen wässrigen Aceton für seine Untersuchungen benutzte. Die Werte der Ethanol-Extrakte (vgl. IV.1) liegen mit 8,22 bis 8,76 µmol TE g^{-1} für alle drei Pilze deutlich unter den 49,67 µmol TE pro g Trockenmasse, die Dubost et al. für *P. ostreatus* ermittelten. Die T-ORAC Werte für *P. eryngii* (vgl. IV.2.2) liegen mit 12,9 bzw. 38,3 µmol TE g^{-1} für den Hexan- bzw. Methanol-Extrakt in derselben Größenordnung. Dennoch scheint ein Teil der antioxidativen Aktivität nur mit einem stark wässrigen Lösungsmittel extrahierbar zu sein.

IV.8.1.3 Comet-Assay

Der Comet-Assay wurde für wässrige Extrakte aus verschiedenen Pilzen eingesetzt. Bei *Inonotus obliquus*, *Agaricus bisporus* und *Ganoderma lucidum* zeigten sich protektive Effekte [44, 45]. *I. obliquus* wurde bei 85 °C extrahiert und der Extrakt (c = 0,5 mg mL^{-1}) an humanen Lymphozyten getestet, die 5 min mit 100 µM Wasserstoffperoxid geschädigt wurden. *A. bisporus* und *G. lucidum* wurden bei 25 °C bzw. 100 °C extrahiert und bei Raji Zellen eingesetzt, die für 30 min mit 10 µM Wasserstoffperoxid behandelt wurden. *I. obliquus* zeigte gegenüber der Positivkontrolle eine 40 %ige Reduktion der DNA-Schädigung, während der Kaltwasserextrakt von *A. bisporus* und der Heißwasserextrakt von *G. lucidum* einen praktisch vollständigen Schutz boten. Der Heißwasserextrakt von *A. bisporus* zeigte dagegen eine verstärkte Schädigung. Heiß- und Kaltwasserextrakte von *Pleurotus sajor-caju* wurden ebenfalls untersucht, zeigten aber keine protektiven oder zytotoxischen Effekte.

Der Methanol-Extrakt von *Pleurotus eryngii* zeigte in einer Konzentration von 0,1 mg mL^{-1} keinen Schutz gegen die DNA-Schädigung mit Wasserstoffperoxid, in einer Konzentration von 0,4 mg mL^{-1} reduzierte es die Schädigung jedoch um 41 % (Tabelle IV-5). *Agrocybe aegerita* zeigte in den anderen antioxidativen Vortests eine stärkere antioxidative Wirkung als *P. eryngii*, was auch in der 25 %igen Reduktion der DNA-Schädigung bei einer Konzentration von 0,1 mg mL^{-1} reflektiert wurde. Bei einer Konzentration von 0,4 mg mL^{-1} stieg die Schädigung der Zellen jedoch an. *A. aegerita* wurde im Soxhlet mit Methanol extrahiert, während *P. eryngii* bei Raumtemperatur mazerierte. Möglicherweise wurden bei der heißen Extraktion ähnlich wie bei *A. bisporus* Stoffe frei, die zellschädigende Wirkungen entfalteten.

IV.8.2 Cyclooxygenase-Assay

Der Cyclooxygenase-Assay zeigte bei den Extrakten negative Inhibierungen, die aber innerhalb des Toleranzbereiches von 20% lagen (Tabelle IV-1). Diese Ergebnisse wurden auf die komplexe Probenmatrix zurückgeführt. Diese Hypothese schien durch die Verwendung von Einzelsubstanzen bestätigt zu werden, weil hier keine negativen Inhibierungen auftraten (Tabelle IV-2). Nachdem bei den aufgereinigten CCC-Fraktionen ebenfalls viele negative Inhibierungswerte außerhalb des Toleranzbereiches auftraten (Tabelle IV-6), wurde auf Rückfrage bei Cayman Chemical das Cold Spike Protocol empfohlen. Die Anwendung dieses Protokolls führte aber nicht zu einer Behebung dieser Problematik (Tabelle IV-13). Selbst Ergosta-5,8-dien-3-ol führte als Reinsubstanz zu unschlüssigen Daten. Wahrscheinlich war dieser Kit für lipophile Substanzen wie Sterole nicht gut geeignet. Ein anderes Verfahren zur Messung der Cyclooxygenase-Inhibierung besteht darin, den Sauerstoffverbrauch dieses Enzyms zu messen. Zhang et al. [22, 23] untersuchten mit dieser Methode Ergosterol, Ergosterolperoxid, Ergosta-4,6,8,22-tetraen-3-on, Palmitinsäure und 1-Olyl-2-linoyl-3-palmitylglycerol sowie die Fettsäurefraktionen von *Grifola frondosa* und *Agrocybe aegerita* und stellten bei allen Substanzen Cyclooxygenase inhibierenden Eigenschaften fest.
Die gemessenen und schlüssig erscheinenden Werte für die Hexan- bzw. Pentan-Ether-Extrakte von *P. eryngii*, *P. ostreatus* und *A. aegerita* (Tabelle IV-3, Tabelle IV-13) reihten sich in diese Befunde ein, jedoch waren quantitative Aussagen nicht möglich.

IV.8.3 Xanthinoxidase-Assay

Es ist bekannt, dass neben Allopurinol verschiedene Flavonoide und Flavanole die Xanthinoxidase inhibieren können [27, 135].
Wenn Extrakte mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität behandelt werden, so reichern sich diese phenolische Komponenten häufig in einem mittelpolaren Lösemittel wie Ethylacetat an. Die in geringen Mengen enthalten phenolischen Verbindungen werden angereichert und können zu einer erhöhten Aktivität der Essigester-Extrakte bei *P. eryngii* und *A. aegerita* führen.

IV.8.4 Aussagekraft der Bioassays auf Wirkungen *in vivo*

Unter den Bioassays können enzymbasierte Assays und nicht-enzymbasierte Assays wie z.B. viele antioxidative Assays unterschieden werden.

Es gibt sehr viele *in vitro*-Testsysteme für Antioxidantien, von denen einige das Abfangen biologischer relevanter Radikale (z.B. von Peroxylradikalen, Superoxidradikalanionen), einige das Abfangen stabiler Radikale (z.B. DPPH) und andere reduzierende bzw. chelatisierende Eigenschaften (z.B. Ferric Ion Reducing Ability of Plasma (FRAP)) messen. Auch innerhalb einer Methode gibt es häufig verschiedene Varianten, um den Test durchzuführen. Eine Voraussetzung für die prinzipielle Übertragbarkeit von Ergebnissen auf *in vivo*-Verhältnisse ist daher die Verwendung von biologisch signifikanten Zielmolekülen unter physiologisch angepassten Reaktionsbedingungen (Konzentration, Temperatur, pH-Wert, Reaktionszeit) [6].

Bei enzymatischen Assays treten einige dieser Schwierigkeiten nur in geringerem Maße auf, da die Reaktionsbedingungen für das Enzym von vornherein physiologischen Bedingungen angepasst werden müssen. Bei der Übertragbarkeit auf *in vivo*-Systeme treten hier Überlegungen zu Resorption, Metabolismus und Verteilung der aktiven Verbindungen auf verschiedene Gewebe sowie der passenden Markersubstanzen in den Vordergrund. So sind einige Peptide bekannt, die *in vitro* eine Hemmung des Angiotensin Converting Enzyms (ACE) zeigen. Diese Peptide werden im Körper verdaut und meist als kleinere Bruchstücke in die Darmzellen und die Blutbahn aufgenommen. Auch wenn Mechanismen diskutiert werden, bei denen die aktiven Peptide nicht verdaut und nicht mit dem Peptidtransportsystem aufgenommen werden, sind die Wirkungen *in vivo* unklar [35]. *In vitro* festgestellte bioaktive Wirkungen sind daher nicht automatisch *in vivo* festzustellen.

Seit einigen Jahren werden dennoch verstärkt Daten zu bioaktiven und insbesondere antioxidativ wirksamen Substanzen in Lebensmitteln publiziert. Häufig weisen die Autoren darin auf die Anwendbarkeit als Nahrungsergänzungsmittel hin. In den USA werden Nahrungsergänzungsmittel bereits mit ORAC-Werten beworben, obwohl sich die empfohlene Menge an ORAC-Units recht problemlos aus der Nahrung beziehen lassen sollte. Ein Granny Smith-Apfel reicht aus, um die von Herstellern von

Nahrungsergänzungsmitteln empfohlene Menge von 5000 µmol TE pro Tag aufzunehmen [41].

Die Senatskommission zur Lebensmittelsicherheit der Deutschen Forschungsgemeinschaft fordert für Nahrungsergänzungsmittel und funktionelle Lebensmittel, die nicht nur mit Vitaminen, Mineralstoffen oder Spurenelementen angereichert sind, dass 1. das Produkt hinsichtlich Dosierung, Langzeitanwendung und unerwünschten Wechselwirkungen sicher ist, und dass vor allem 2. sein Nutzen belegt ist – am besten mit zwei unabhängigen, randomisierten Doppelblindstudien. Sie empfiehlt zudem die Sammlung von Daten über das Konsumentenverhalten und die Exposition dieses Produktes und die Einrichtung einer Stelle, die unerwünschte Nebeneffekte der Produkte dokumentiert [136].

In Rahmen des Verbundprojektes wurde daher eine Pilotstudie mit 21 Teilnehmern durchgeführt [137]. Die Teilnehmer wurden in zwei Gruppen eingeteilt und mussten entweder 3 Wochen lang jeden Tag 600 mL einer Austernpilzsuppe oder einer Tomatensuppe zu sich nehmen. Ein Teilnehmer schied wegen gastrointestinalen Beschwerden aus der Studie aus. Die Pilzsuppe enthielt 30 g getrocknete Austernpilze (*P. ostreatus*), was 300 g Frischgewicht entsprach. Dabei konnten folgende Wirkungen auf den Lipidstoffwechsel beobachtet werden:

- Signifikante Abnahme der Triglycerid-Konzentration
- Signifikante Abnahme des oxidierten LDLs
- Tendenz zur Abnahme des Gesamtcholesterolgehaltes

In dieser Studie konnten bereits im Tierversuch beobachtete Änderungen [66] auch am Menschen belegt werden. Diese Wirkung konnte allerdings nicht auf eine Einzelsubstanz zurückgeführt werden. Obwohl bekannt ist, dass Austernpilze Lovastatin enthalten [68], wurde weder in den Pilzen noch in der Suppe Lovastatin nachgewiesen. Der Beweis für den Nutzen eines Produktes aus *P. ostreatus* ist damit noch nicht zweifelsfrei erbracht, rechtfertigt aber weitere Studien zum aktiven Prinzip und zu Wirkung und Dosierung beim Menschen.

IV.9 Zusammenfassung und Ausblick

In den Fruchtkörpern von *Pleurotus eryngii* wurden Ergosterol und Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol und Pentadecansäure eindeutig identifiziert. Außerdem wurden Ergosta-7,22-dien-3-ol, Ergosta-5,7-dien-3-ol, Fungisterol und Cerevisterol schlüssig nachgewiesen. Diese Sterole waren bisher noch nicht in *P. eryngii* entdeckt worden. Der Gehalt an Ergosterol, Fungisterol, Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, Ergosta-7,22-dien-3-ol und Cerevisterol konnte auf 150 mg, 15 mg, 4 mg, 3 mg bzw. 2 mg pro 100 g Trockenmasse abgeschätzt werden.

In *Agrocybe aegerita* wurden ebenfalls Ergosterol und Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol eindeutig identifiziert. Die Anwesenheit von Ergosta-7,22-dien-3-ol und Ergosta-5,7-dien-3-ol sowie Liche-, Neoergo-, Epi-, Fungi-, Lano- und Cerevisterol sowie 4-Methylfecosterol, 4,4-Dimethylfecosterol und Eburicol wurde mit Daten aus der Literatur belegt.

Für Ergosterol und Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol konnten Troloxäquivalente von 7,5 µM bzw. 6,8 µM im lipophilen ORAC für eine Konzentration von 5 µg mL^{-1} ermittelt werden. Außerdem konnte qualitativ eine Inhibierung der Cyclooxygenase-Isoenzyme festgestellt werden.

Unter den Rohextrakten zeigte der Methanol-Extrakt von *P. eryngii* eine besonders hohe antioxidative Aktivität von 38,3 µmol TE pro g^{-1}. Auch im Comet-Assay zeigte dieser Extrakt protektive Effekte. Größere Unterschiede in der antioxidativen Kapazität zeigen sich in einem Vergleich mit einem wässrigen Aceton-Extrakt in der Literatur. Außerdem war die antioxidative Aktivität des Myzels von *A. aegerita* und *P. eryngii*, das auf Rapspresskuchen kultiviert wurde, erhöht. *A. aegerita* zeigte auch als einziger der drei untersuchen Pilze eine Entfärbung im DPPH-Assay.

In einer Pilotstudie konnte positiven Wirkungen einer Austernpilzsuppe auf den Lipidstoffwechsel nachgewiesen werden. Das aktive Prinzip blieb unbekannt, da Lovastatin weder in der Pilzsuppe noch in den unverarbeiteten Pilzen nachgewiesen werden konnte.

Hieraus ergeben sich verschiedene Anknüpfungspunkt für zukünftig Arbeiten: Die identifizierten Sterole können isoliert und als Einzelsubstanzen in den Assays untersucht werden. Hierbei könnte auch ein anderes Testsystem zur Untersuchung der COX-Inhibierung getestet werden. Hinsichtlich weiterer bioaktiver Inhaltsstoffe sind insbesondere eine Untersuchung des Methanol-Extraktes von *P. eryngii* auf

Antioxidantien und eine Untersuchung von *A. aegerita* auf phenolische Substanzen interessant. Außerdem sollten wässrige Extrakte in die Untersuchungen einbezogen werden. Ob die antioxidative Kapazität der Fruchtkörper durch die Kultivierung mit Rapspresskuchen erhöht werden kann, müssen Kultivierungsexperimente zeigen. Ebenso ist die Isolierung der Substanz aus *P. ostreatus* wichtig, die den Lipidstoffwechsel beim Menschen günstig beeinflusst.

V Anhang

V.1 Chromatogramme und Massenspektren

V.1.1 Hexan-Extrakt von *Pleurotus eryngii*

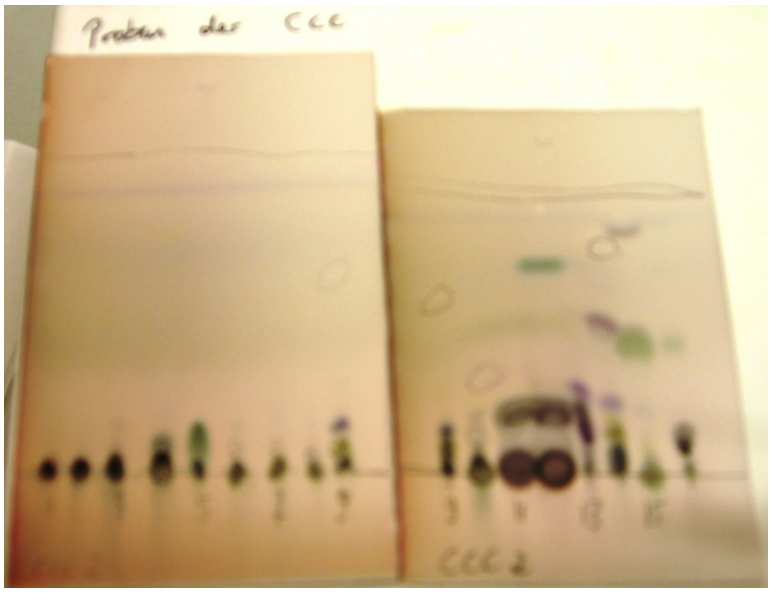

Abbildung V.1 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der zweiten HSCCC des Hexan-Extraktes (Kieselgel, Laufmittel Dichlormethan).

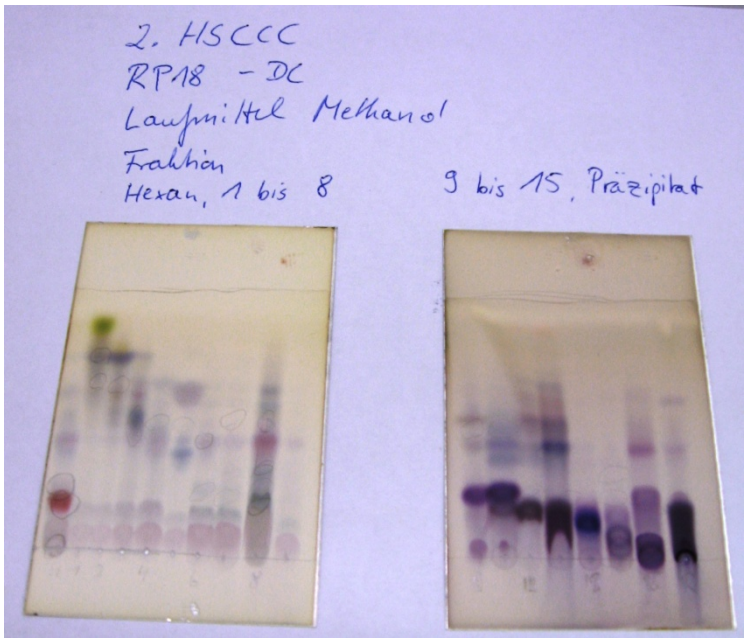

Abbildung V.2 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der zweiten HSCCC des Hexan-Extraktes (RP18, Laufmittel Methanol).

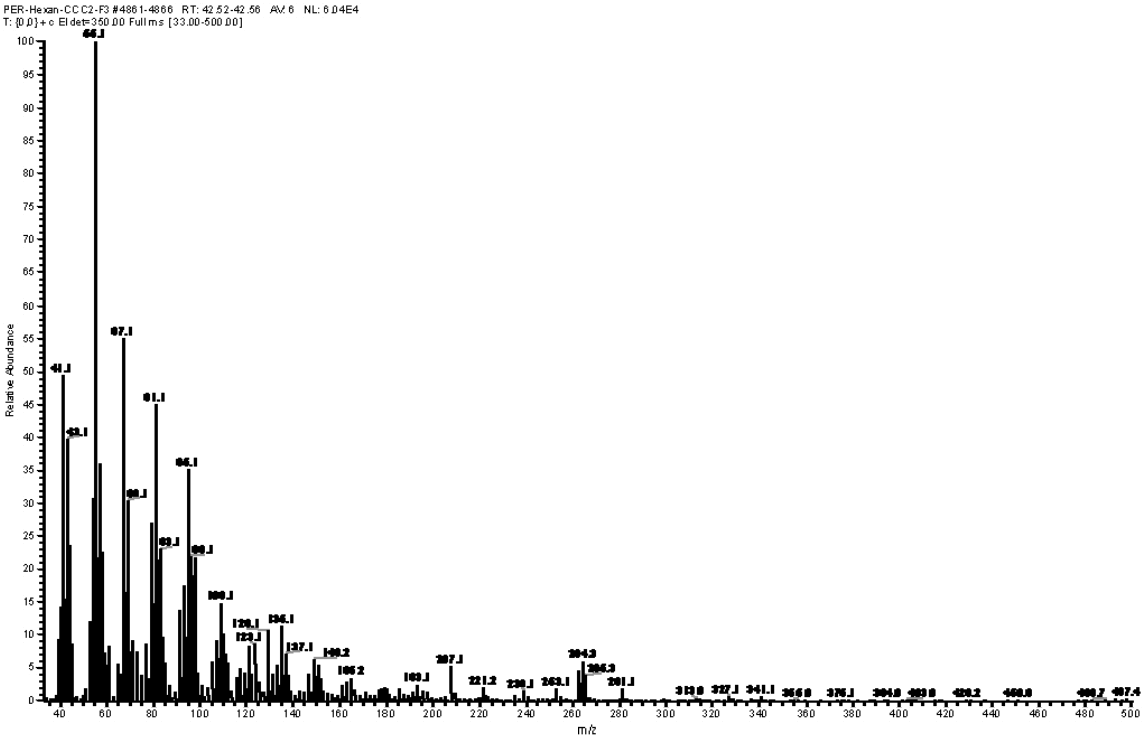

Abbildung V.3 Monoacylglycerol (KI = 2684, Strukturvorschlag: Octadeca-9,12-diensäure-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl)ethylester).

Tabelle V-1 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Hexan-Extraktes von *P. eryngii* laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
1824	Siehe (Tabelle V-2)		Pentandecansäuremethylester	Vergleich mit Standard	13
1859	242 (11), 213 (3), 199 (16), 129 (37), 55 (100)		Pentandecansäure		10
1925	Siehe (Tabelle V-2)		Palmitinsäuremethylester	Vergleich mit Standard	13
1960	Siehe (Tabelle V-2)		Palmitinsäure		7, 8
2099	Siehe (Tabelle V-2)		Ölsäuremethylester	Vergleich mit Standard	13
2138	Siehe (Tabelle V-2)		Linolsäure		5, 6, 7
2142	Siehe (Tabelle V-2)		Ölsäure		7, 8, 10
2684	341 (1), 264 (8), 135 (10), 55 (100)		Octadeca-9,12-diensäure-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl)ethylester (MW = 356)	Spektrenbibliothek	3
2954	376 (44), 361 (3), 251 (100), 236 (20), 223 (5), 221 (5), 209 (9), 197 (34), 155 (46), 141 (28)	C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen	Vergleich mit [85]	10, 11
3155	394 (13), 376 (15), 361 (7), 333 (1), 291 (3), 277 (4), 251 (100), 235 (11), 209 (30), 195 (28)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	Vergleich von MS und KI mit Syntheseprodukt	11, 12

Fortsetzung Tabelle V-1 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Hexan-Extraktes von *P. eryngii* laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
3196	396 (48), 376 (6), 363 (88), 337 (32), 271 (9), 253 (34), 211 (33), 55 (100)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (Ergosterol)	Vergleich mit Standard	11, 12
3204	398 (14), 383 (10), 365 (2), 337 (2), 300 (9), 273 (17), 271 (62), 255 (27), 253 (10), 229 (14), 213 (15), 161 (21), 145 (25), 55 (100)	1 Hydroxylgruppe,	Ergosta-7,22-dien-3-ol	Vergleich mit [85, 86]	13
3270	400 (91), 385 (38), 382 (5), 367 (8), 273 (26), 255 (97), 246 (10), 231 (30), 213 (42), 145 (33), 43 (100)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{19}-Seitenkette	Fungisterol, Ergost-7-en-3-ol	Spektrenbibliothek, Vergleich mit [85]	13
3330	426 (5), 411 (13), 400 (8), 393 (8), 281 (19), 255 (15), 207 (46), 55 (100)	1 Hydroxylgruppe, C_9H_{19}-Seitenkette			13
3441	410 (3), 392 (3), 377 (9), 339 (12), 266 (10), 249 (11), 55 (100)	1 Hydroxygruppe	Sterol		5
3483	426 (24), 411 (10), 393 (37), 377 (15), 251 (19), 207 (19), 55 (100)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Sterol		5
3496	458 (0,5), 440 (26), 425 (18), 407 (53), 377 (13), 251 (17), 55 (100)	mind. 1 Hydroxygruppe			11
3505	428 (1), 426 (3), 410 (8), 395 (4), 393 (4), 377 (14), 284 (7), 267 (15), 253 (17), 251 (13), 249 (11), 207 (32), 55 (100)	1 Hydroxygruppe			5
3634	412 (10), 397 (5), 394 (9), 383 (10), 379 (21), 287 (2), 269 (10), 251 (22), 207 (29), 55 (100)	1 Hydroxygruppe	Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (Cerevisterol , MW = 430)	Vergleich mit [85]	3

V.1.2 Dichlormethan-Extrakt von *Pleurotus eryngii*

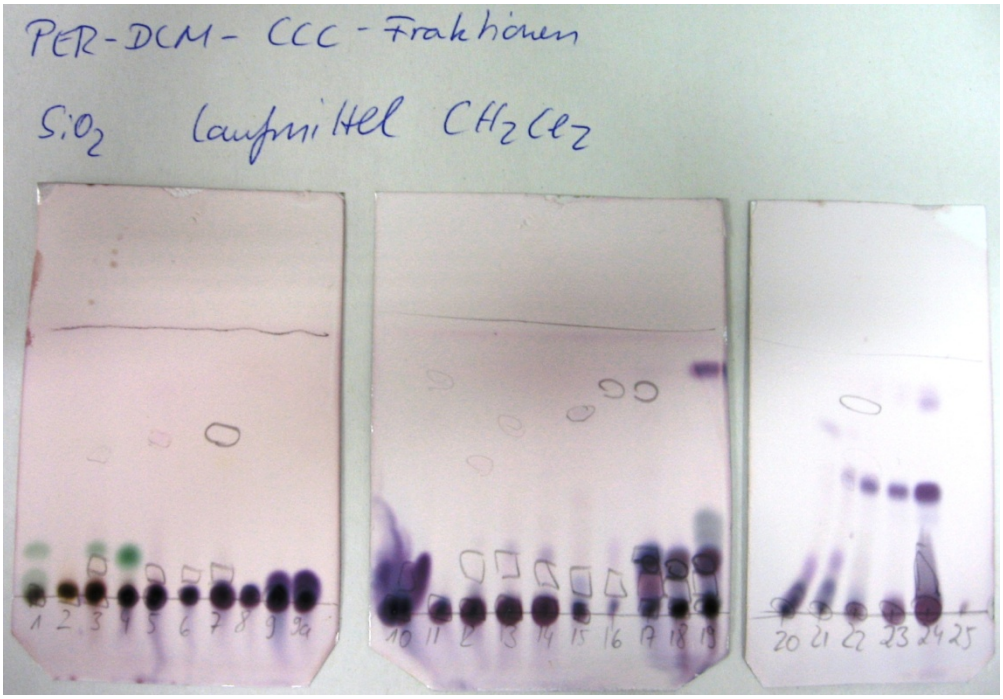

Abbildung V.4 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der HSCCC (Kieselgel, Laufmittel Dichlormethan).

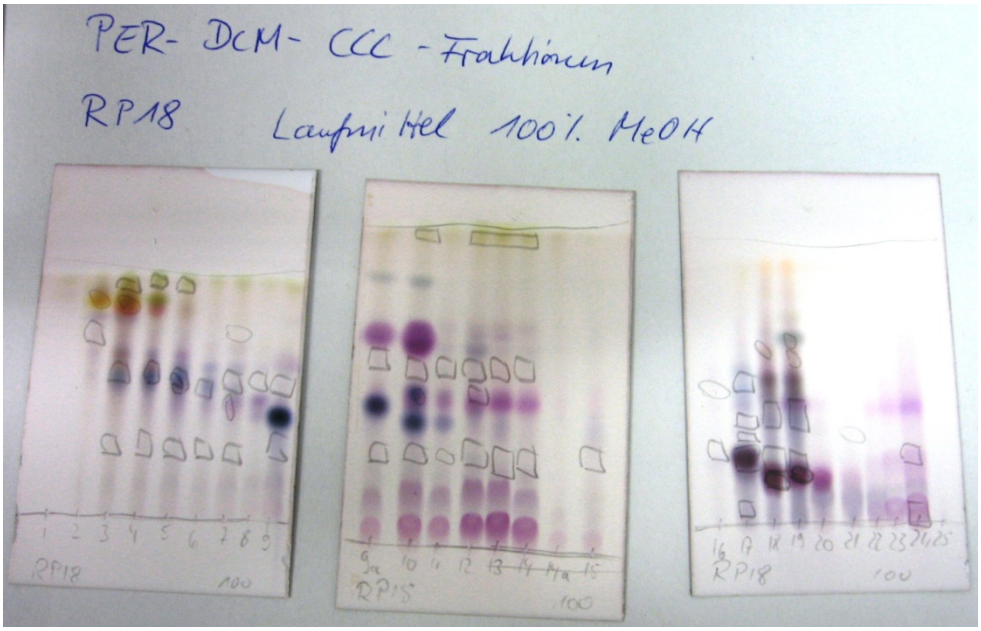

Abbildung V.5 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der HSCCC (RP18, Laufmittel Methanol).

V.1.2.1 Verbindungen aus dem Dichlormethan-Extrakt von *Pleurotus eryngii*

Tabelle V-2 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes *P. eryngii* laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
1824	256 (5), 213 (11), 143 (18), 87 (89), 74 (100)		Pentadecansäuremethylester	Vergleich mit Standard	20, 21
1925	279 (4), 227 (8), 143 (16), 87 (87), 74 (100)		Palmitinsäuremethylester	Vergleich mit Standard	20, 21
1959	256 (12), 227 (3), 213 (13), 43 (100)		Palmitinsäure		13, 14
2021	284 (2), 241 (11), 143 (20), 87 (97), 74 (100)		Margarinsäuremethylester	Vergleich mit Standard	21
2094	294 (4), 263 (4), 220 (2), 81 (81), 67 (100)		Linolsäuremethylester	Vergleich mit Standard	19, 20
2101	264 (9), 235 (2), 222 (7), 180 (6), 55 (100)		Ölsäuremethylester		20, 21
2106	264 (8), 222 (4), 180 (4), 55 (100)		Isomer des Ölsäuremethylesters		20, 21
2121	298 (9), 255 (10), 143 (22), 87 (96), 74 (100)		Stearinsäuremethylester		21
2131	280 (4), 262 (18), 55 (100)		Linolsäure		9, 10
2139	282 (1), 264 (5), 222 (2), 55 (100)		Ölsäure	Vergleich mit Standard	13
2161	284 (17), 255 (3), 241 (13), 185 (16), 129 (35), 55 (100)		Stearinsäure		15
2954	376 (43), 361 (2), 251 (100), 236 (18), 223 (6), 221 (5), 209 (10), 197 (36), 155 (45), 141 (27)	C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen	Vergleich mit [85]	17
3158	394 (11), 376 (18), 361 (8), 333 (2), 291 (3), 277 (4), 251 (100), 235 (14), 209 (33), 195 (32)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol	Vergleich von MS und KI von Syntheseprodukt	17
3193	396 (34), 378 (9), 363 (67), 337 (24), 253 (42), 251 (10), 157 (42), 143 (55), 55 (100)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosterol	Vergleich mit Standard	17, 18, 19
3206	398 (9), 383 (7), 380(4), 365 (2), 363 (5), 300 (6), 273 (10), 271 (41), 255 (19), 253 (19), 161 (13), 159 (19), 55 (100)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-7,22-dien-3-ol	Vergleich mit [85, 86]	19, 20
3214	394 (3), 376 (55), 361 (9), 333 (2), 269 (4), 251 (100), 235 (23), 209 (19), 197 (39)	mind. 1 Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette			17
3260	398 (24), 383 (3), 380 (11), 365 (67), 339 (24), 271 (5), 253 (25), 157 (32), 145 (44), 143 (54), 43 (100)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{19}-Seitenkette	Ergosta-5,7-dien-3-ol		19

Fortsetzung Tabelle V-2 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes *P. eryngii* laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
3272	400 (66), 385 (29), 382 (8), 367 (9), 273 (19), 255 (72), 213 (34), 43 (100)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{19}-Seitenkette	Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol)	Spektrenbibliothek, Vergleich mit [85, 89]	19, 20, 21
3441	410 (4), 392 (9), 377 (13), 376 (9), 374 (8), 361 (5), 359 (4), 266 (20), 251 (22), 249 (37), 55 (100)	mind. 2 Hydroxygruppen	3,5-Dihydroxyergost-7,22-dien-6-on (MW = 428)		9
3506	428 (0,2), 410 (6), 392 (6), 377 (12), 374 (5), 359 (3), 284 (6), 267 (12), 251 (16), 249 (22), 55 (100)	2-3 Hydroxygruppen, $\Delta^{14,22}$-Struktur	Sterol		9, 10
3631	412 (7), 394 (10), 379 (14), 376 (10), 281 (11), 253 (15), 251 (38), 207 (35), 55 (100)	2 -3 Hydroxygruppen, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (Cerevisterol, MW = 430)	Vergleich mit [85]	4, 5

V.1.2.2 Nach Derivatisierung identifizierte Stoffe aus dem Dichlormethan-Extrakt von *Pleurotus eryngii*

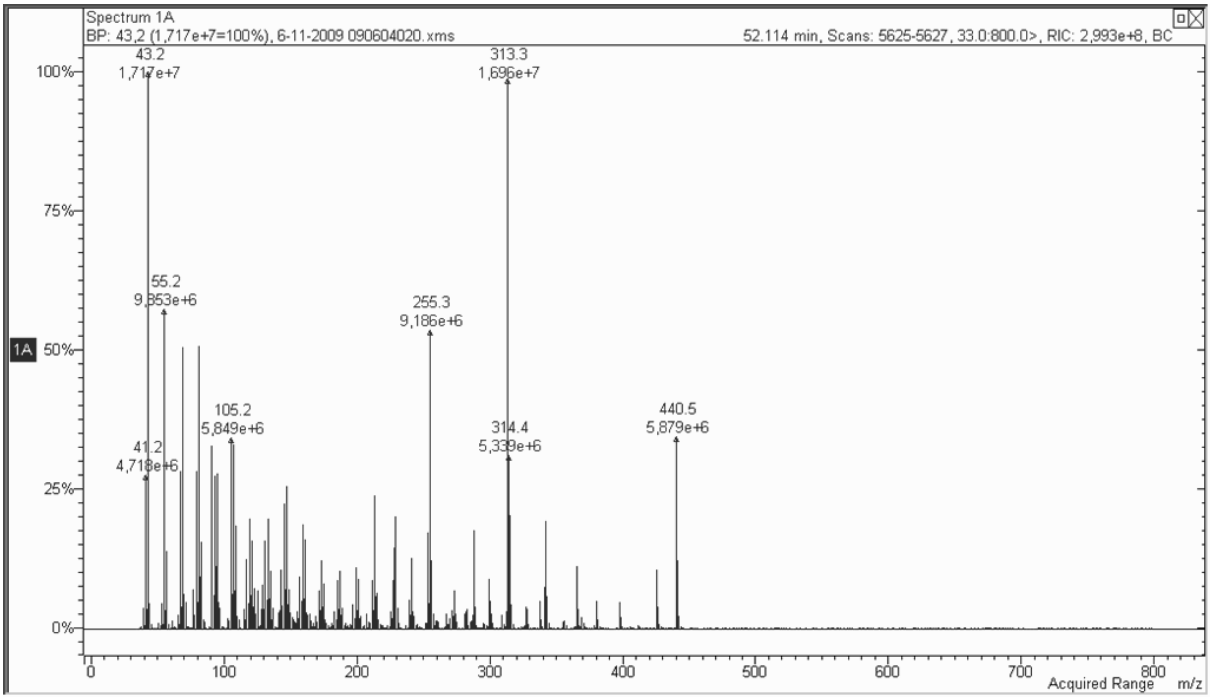

Abbildung V.6 Massenspektrum des Acetats von Ergosta-7,22-dien-3-ol.

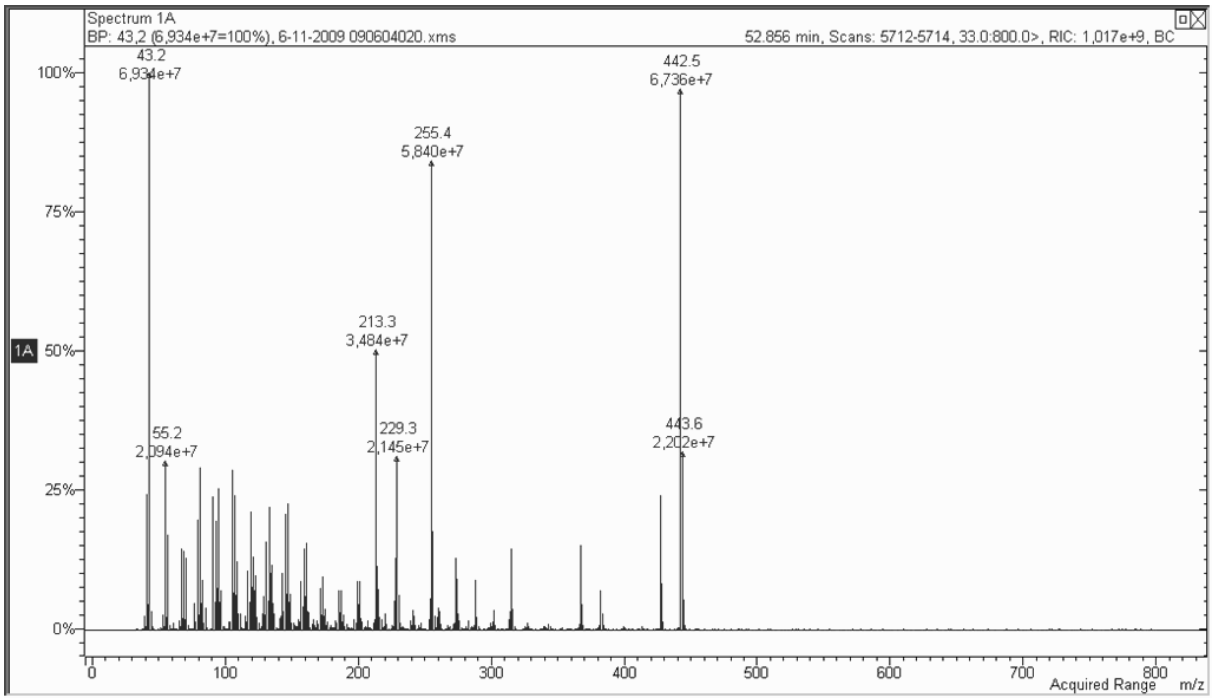

Abbildung V.7 Massenspektrum des Acetats von Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol).

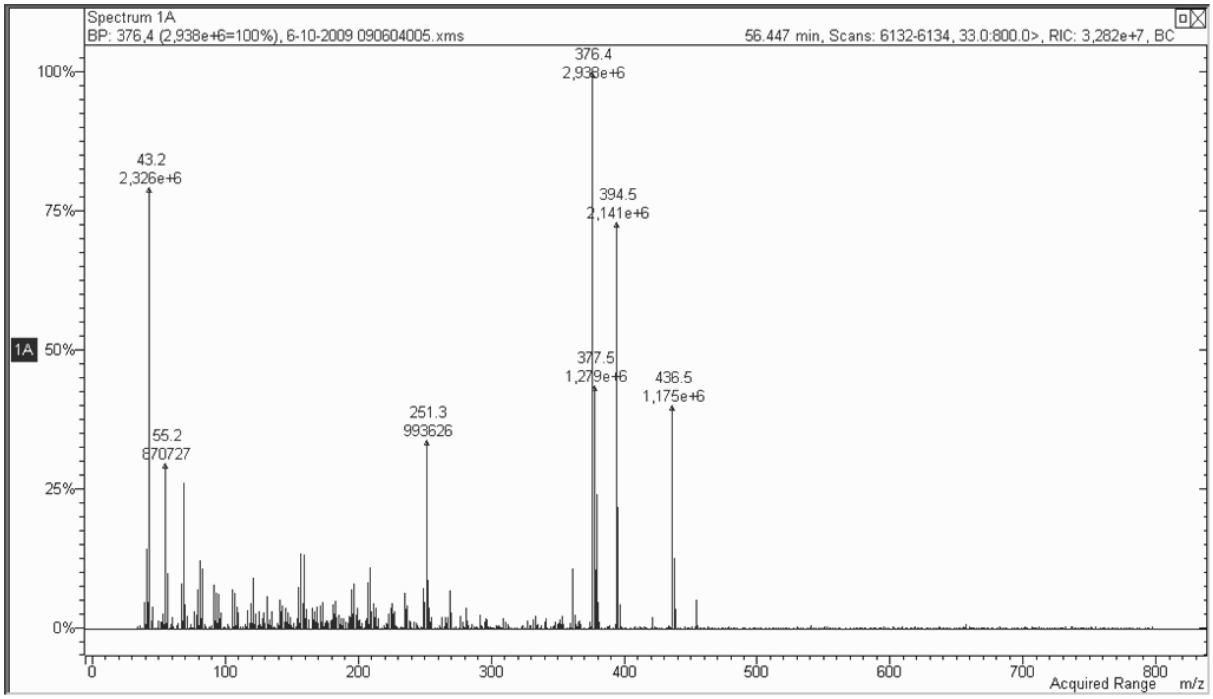

Abbildung V.8 Massenspektrum des Acetats von Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (Cerevisterol).

Tabelle V-3 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii*, acetyliert, laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
1827	256 (16), 225 (16), 213 (7), 74 (100)		Pentadecansäuremethylester	Vergleich mit Standard	20
1927	270 (17), 239 (7), 227 (16), 74 (100)		Palmitinsäuremethylester	Vergleich mit Standard	20, 21
2096	294 (19), 262 (12), 67 (100)		Linolsäuremethylester	Vergleich mit Standard	19, 20
2101	296 (7), 264 (23), 222 (16), 55 (100)		Ölsäuremethylester	Vergleich mit Standard	20, 21
2130	298 (27), 267 (7), 255 (18), 74 (100)		Stearinsäuremethylester	Vergleich mit Standard	15, 21
3169	470 (19), 410 (9), 401 (3), 346 (40), 345 (40), 303 (15), 286 (33), 285 (57), 267 (17), 257 (7), 43 (100)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette			9
3302	436 (11), 376 (100), 361 (12), 305 (2), 291 (3), 277 (5), 263 (4), 251 (51)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (MW = 394)	Vergleich mit Syntheseprodukt	17, 18
3364	440 (32), 425 (10), 397 (4), 380 (5), 365 (10), 342 (19), 327 (4), 313 (93), 288 (17), 255 (52), 241 (12), 229 (19), 213 (23), 43 (100)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-7,22-dien-3-ol (MW = 398)	Vergleich mit Bibliotheksspektrum und [87].	20
3427	442 (100), 427 (24), 382 (7), 367 (15), 315 (14), 288 (9), 273 (12), 255 (83), 229 (29), 213 (49)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{19}-Seitenkette	Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol, MW = 400)		20, 21
3454	452 (23), 406 (2), 392 (2), 374 (39), 359 (12), 327 (50), 281 (9), 267 (34), 249 (32), 207 (28)	mind. 1 Hydroxygruppe, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			8
3455	452 (32), 434 (7), 392 (3), 375 (21), 374 (49), 359 (14), 327 (65), 281 (10), 267 (46), 249 (51), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			17
3520	454 (4), 436 (6), 376 (45), 361 (25), 311 (8), 281 (7), 267 (1), 251 (100), 237 (37)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,8,22-trien-3,11-diol (Portensterol)		9
3596	470 (2), 410 (7), 392 (56), 377 (30), 349 (11), 327 (7), 285 (6), 267 (13), 266 (16), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette	3,5-Dihydroxyergosta-7,22-dien-6-on		9
3617	468 (45), 453 (4), 426 (3), 408 (100), 393 (62), 377 (40), 376 (33), 283 (14), 281 (8), 251 (33)	mind. 1 Hydroxygruppe, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			10

Fortsetzung Tabelle V-3 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii*, acetyliert, laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
3617	482 (13), 468 (44), 453 (3), 439 (6), 422 (37), 408 (98), 393 (43), 377 (41), 283 (13), 251 (38), 43 (100)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette			18
3661	410 (5), 392 (77), 377 (42), 363 (5), 349 (16), 285 (8), 281 (8), 267 (25), 266 (21), 43 (100)	mind. 1 (tertiäre) Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette			9
3754	454 (5), 436 (40), 421 (2), 394 (73), 376 (100), 361 (11), 281 (4), 251 (34), 207 (8), 157 (13)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (Cerevisterol, MW = 430)	Vergleich mit [138]	5
3756	454 (5), 436 (39), 429 (2), 421 (3), 405 (4), 394 (68), 376 (85), 361 (9), 269 (10), 251 (41), 157 (18), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			18
3781	498 (6), 484 (30), 452 (7), 437 (6), 424 (14), 392 (64), 377 (17), 364 (18), 267 (21), 239 (16), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 2 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			18
3801	470 (5), 452 (9), 429 (3), 392 (100), 377 (20), 364 (9), 343 (8), 267 (10), 265 (8), 213 (13), 207 (16)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert			18
3912	470 (22), 410 (28), 392 (50), 280 (8), 267 (11), 207 (54), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			18

V.1.2.3 Medium Pressure Liquid Chromatography

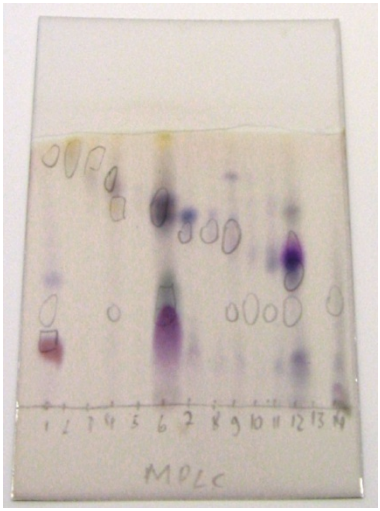

Abbildung V.9 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der MPLC (RP18, Laufmittel Methanol).

Tabelle V-4 Auswaage der gepoolten Fraktionen der MPLC-Trennung von *P. eryngii*

Fraktion	Auswaage [mg]	Fraktion	Auswaage [mg]
1	0,7	9	1,9
2	0	10	0,5
3	0,7	11	0
4	0,7	12	1,0
5	0	13	0,7
6	1,0	14	0,7
7	0	15	1,4
8	0	Summe	9,3

Tabelle V-5 Direkteinlass-EI-MS-Spektren der MPLC-Fraktionen von *P. eryngii*

Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Fraktion
475 (14), 431 (24), 417 (69), 378 (49), 253 (16), 237 (24), 193 (34), 179 (84), 69 (100)	CO_2-Abspaltung	1
410 (2), 392 (4), 378 (100), 376 (15), 363 (8), 316 (7), 253 (23), 251 (10)		1
475 (38), 431 (4), 417 (13), 237 (57), 57 (100)	CO_2-Abspaltung	12
446 (2), 428 (50), 414 (13), 413 (18), 396 (26), 395 (33), 379 (24), 251 (20), 55 (100)	2 Hydroxygruppen, Abspaltung von 32 Masseneinheiten (mögl. O_2)	12

V.1.2.4 Präparative HPLC

Tabelle V-6 Auswaage der gepoolten Fraktionen der präparativen HPLC-Trennung von *P. eryngii*

Fraktion	Auswaage [mg]	Fraktion	Auswaage [mg]	Fraktion	Auswaage [mg]
1	0,0	11	0,6	21	0,0
2	0,0	12	0,6	22	0,0
3	0,5	13	0,7	23	0,9
4	0,5	14	0,4	24	0,4
5	0,4	15	3,2	25	0,3
6	0,4	16	1,5	26	0,0
7	0,4	17	0,4	27	0,0
8	0,2	18	1,2	28	0,0
9	0,0	19	0,7		
10	0,3	20	0,5	Summe	14,1

Tabelle V-7 GC-MS-Daten der acetylierten Fraktionen aus der präparativen HPLC von *P. eryngii*

KI	Massenfragmente (%)	Strukturvorschlag	Fraktion
3290	376 (100)		25
3334	438 (11), 378 (100)	Ergosterol (MW = 396)	25
3353	440 (12), 313 (62), 281 (30), 43 (100)	Ergosta-7,22-dien-3-ol (MW = 398)	25

V.1.2.5 Säulenchromatographie

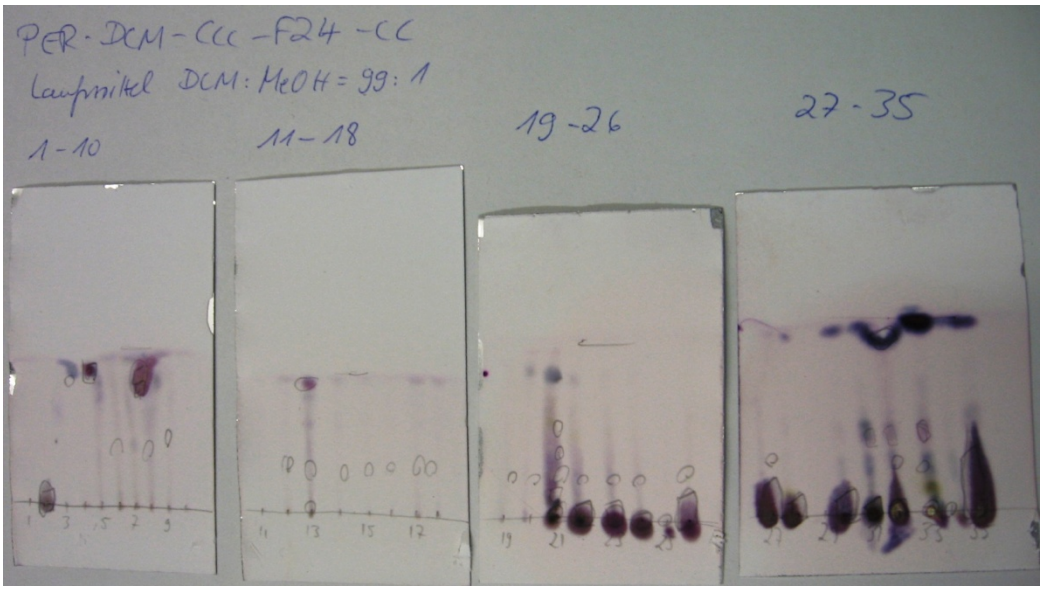

Abbildung V.10 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der Säulenchromatographie (Kieselgel, Laufmittel Dichlormethan : Methanol = 99 : 1).

Tabelle V-8 Auswaage der gepoolten Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung von *P. eryngii*

Fraktion	Auswaage [mg]	Fraktion	Auswaage [mg]	Fraktion	Auswaage [mg]
1	0,4	13	0,1	25	0,3
2	16,0	14	0,0	26	4,5
3	2,3	15	0,0	27	4,7
4	1,3	16	0,0	28	31,8
5	0,5	17	0,0	29	14,4
6	1,2	18	0,0	30	10,9
7	0,9	19	0,1	31	5,9
8	19,0	20	0,0	32	35,6
9	0,0	21	3,9	33	19,7
10	0,0	22	3,2	34	0,4
11	0,0	23	4,8	35	24,6
12	0,1	24	0,9	Summe	207,5

Tabelle V-9 GC-MS-Daten der acetylierten Fraktionen aus der Säulenchromatographie von *P. eryngii*

KI	Massenfragmente (%)	Strukturvorschlag	Fraktion
1596	226 (4), 99 (12), 85 (34), 71 (42), 57 (64), 43 (100)	Hexadecan	1
1795	254 (3), 99 (16), 85 (36), 71 (46), 57 (79), 43 (100)	Octadecan	1
1994	282 (3), 99 (13), 85 (43), 71 (53), 57 (77), 43 (100)	Eicosan	1
2197	310 (2), 99 (16), 85 (45), 71 (47), 57 (61), 43 (100)	Docosan	1
2392	99 (27), 85 (59), 71 (58), 57 (98), 43 (100)	Tetracosan	1
2592	99 (9), 85 (23), 71 (43), 57 (53), 43 (100)	Hexacosan	1
2790	99 (10), 85 (20), 71 (44), 57 (46), 43 (100)	Octacosan	1
2322	252 (2), 125 (8), 111 (15), 83 (38), 43 (100)	Octadeylacetat	13
2089	294 (15), 262 (12), 220 (6), 67 (100)	Linolsäuremethylester	33
2095	296 (7), 278 (1), 264 (26), 223 (15), 55 (100)	Ölsäuremethylester	33

V.1.3 Dimethyloxazolin-Derivate

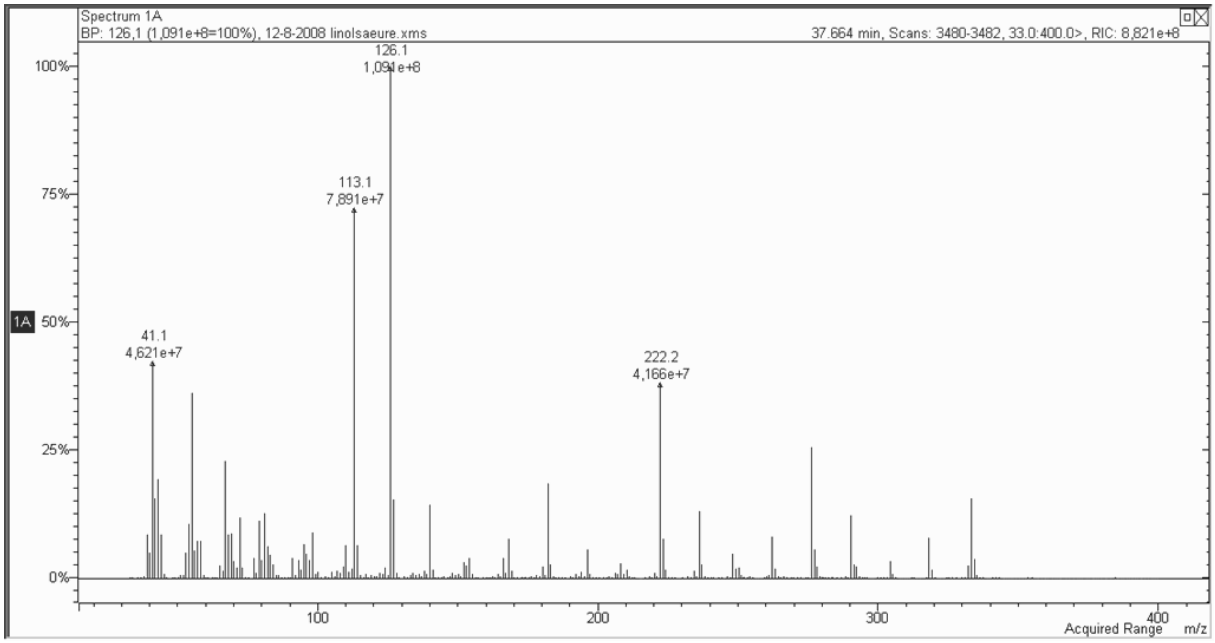

Abbildung V.11 DMOX-Derivat der 9,12-Octadecadiensäure (Linolsäure).

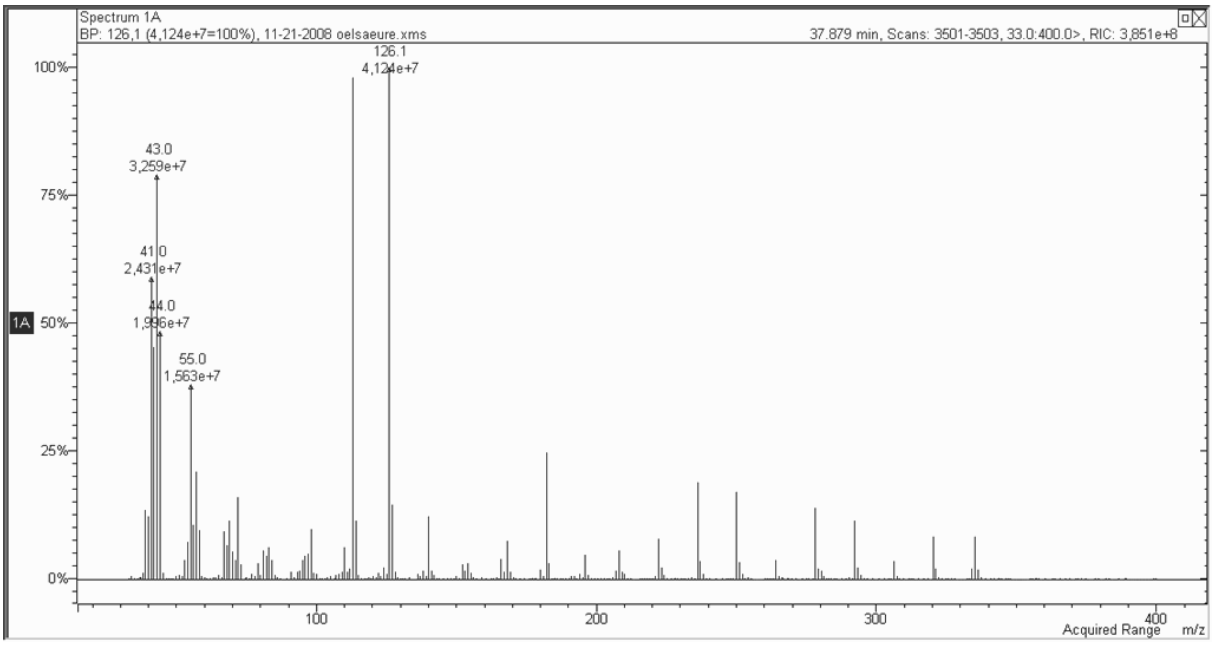

Abbildung V.12 DMOX-Derivat der 9-Octadecensäure (Ölsäure).

V.1.3.1 LC-MS von *Pleurotus eryngii*

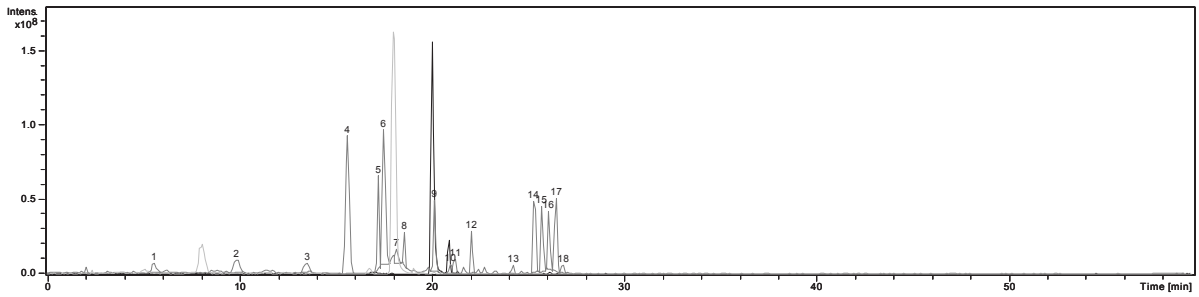

Abbildung V.13 vollständiges HPLC-APCI-MS-Chromatogramm (TIC) des Dichlormethan-Extraktes (dunkelgrau), von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (hellgrau) und Ergosterol (schwarz).

V.1.4 Dichlormethan-Extrakt von *Agrocybe aegerita*

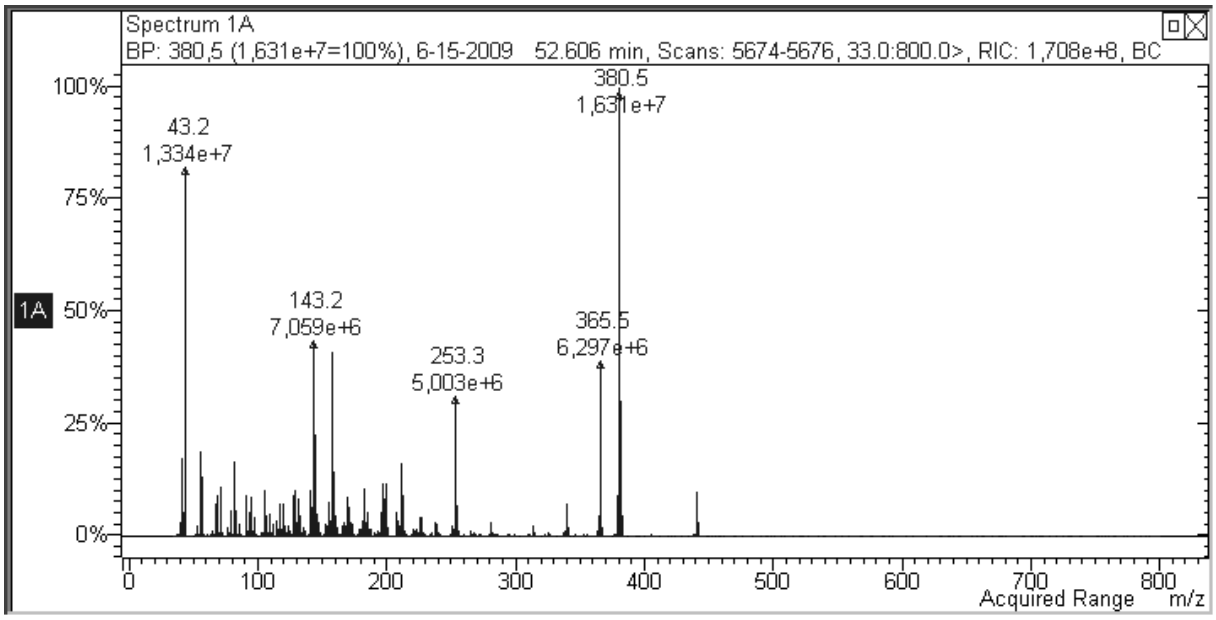

Abbildung V.14 Massenspektrum des Acetats von Ergosta-5,7-dien-3-ol.

Tabelle V-10 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *A. aegerita*, acetyliert, laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
1826	256 (17), 227 (4), 225 (5), 213 (16), 74 (100)		Pentadecansäuremethylester	Vergleich mit Standard	10
1926	270 (15), 241 (5), 239 (6), 227 (15), 74 (100)		Palmitinsäuremethylester	Vergleich mit Standard	10, 27
1961	256 (33), 239 (1), 227 (6), 213 (22), 43 (100)		Palmitinsäure		10
2095	294 (16), 262 (11), 220 (5), 67 (100)		Linolsäuremethylester	Vergleich mit Standard	8, 10, 20, 21, 22
2100	296 (6), 278 (1), 264 (25), 223 (14), 55 (100)		Ölsäuremethylester	Vergleich mit Standard	10
2107	296 (5), 278 (1), 264 (19), 222 (11), 55 (100)		Isomer des Ölsäuremethylesters		10
2128	298 (21), 269 (3), 267 (6), 255 (16), 74 (100)		Stearinsäuremethylester	Vergleich mit Standard	15
2135	280 (17), 262 (2), 220 (1), 67 (100)		Linolsäure		8, 10
2137	282 (2), 264 (13), 222 (4), 41 (100)		Ölsäure		10
2141	282 (2), 264 (12), 222 (6), 55 (100)		Isomer der Ölsäure		10
2168	284 (46), 267 (1), 255 (4), 241 (21), 43 (100)		Stearinsäure		15
2856	438 (1), 378 (3), 365 (1), 335 (1), 305 (1), 262 (25), 159 (42), 43 (100)		Linolsäuremonoglycerat-Diacetat (MW = 438)		4
3165	470 (18), 429 (3), 410 (12), 392 (2), 346 (45), 345 (39), 303 (8), 285 (71), 267 (15), 257 (15), 43 (100)	2 Hydroxygruppe, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			8
3184	410 (24), 395 (3), 392 (1), 382 (3), 377 (1), 367 (7), 349 (2), 341 (4), 327 (3), 311 (2), 285 (9), 267 (5), 203 (34), 55 (100)	1 Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette			8
3300	436 (9), 376 (100), 361 (13), 291 (4), 274 (5), 251 (51), 249 (15), 209 (24), 195 (22)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (MW = 394)	Vergleich mit Syntheseprodukt	19, 20, 21
3315	438 (3), 378 (88), 363 (100), 337 (10), 253 (45), 251 (11), 211 (18), 157 (43), 143 (31)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,8,22-trien-3-ol (Lichesterol, MW = 396)	Vergleich mit [87, 118]	20, 21, 22
3328	440 (24), 425 (16), 397 (2), 365 (18), 313 (39), 288 (19), 273 (3), 255 (33), 229 (17), 213 (11), 147 (2), 43 (100)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-8,22-dien-3-ol (MW = 398)	Vergleich mit [87]	25

Fortsetzung Tabelle V-10 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *A. aegerita*, acetyliert, laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
3344	362 (100), 347 (1), 264 (3), 237 (21), 235 (9), 195 (22), 183 (12), 181 (16), 141 (18)	C_9H_{17}-Seitenkette	19-Norergosta-5,7,9,22-tetraen-3-ol (Neoergosterol, MW = 380)	Bibliotheksspektrum, Vergleich mit [85]	15
3344	438 (12), 378 (100), 363 (32), 337 (6), 253 (46), 251 (9), 157 (40), 143 (35)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosterol (MW = 396)	Vergleich mit Standard	19, 20, 21
3361	440 (27), 425 (8), 397 (3), 365 (11), 313 (100), 273 (5), 255 (44), 229 (11), 213 (16)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-7,22-dien-3-ol (MW = 398)	Vergleich mit [87]	21, 22, 25
3362	438 (8), 378 (100), 363 (32), 313 (4), 253 (6), 251 (26), 211 (17), 209 (45), 197 (31), 195 (34), 157 (17), 143 (16)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,7,24(28)-trien-3-ol (MW = 396)		20, 21, 22
3390	442 (68), 427 (18), 382 (10), 367 (8), 327 (8), 315 (10), 273 (12), 255 (16), 229 (16), 213 (25), 43 (100)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{19}-Seitenkette	Ergosta-8-en-3-ol oder 8(14) (MW = 400)	Vergleich mit [87]	25, 27
3406	440 (10), 380 (100), 365 (36), 339 (6), 253 (27), 211 (17), 158 (42), 143 (48)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{19}-Seitenkette	Ergosta-5,7-dien-3-ol (MW = 398)	Vergleich mit [87]	20, 21, 22
3411	454 (26), 412 (4), 394 (7), 376 (11), 355 (10), 340 (14), 269 (87), 251 (36), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, C_9H_{17}-Seitenkette			19
3419	440 (6), 425 (8), 380 (6), 365 (7), 356 (27), 341 (7), 313 (100), 255 (10), 253 (17), 227 (11), 213 (21)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-7,24(28)-dien-3-ol (Episterol, MW = 398))	Vergleich mit [87]	20, 21
3426	442 (76), 427 (19), 382 (7), 367 (15), 327 (1), 315 (14), 288 (9), 273 (13), 255 (78), 229 (30), 213 (48), 161 (15), 159 (14), 147 (20), 145 (21), 105 (27), 43 (100)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{19}-Seitenkette	Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol, MW = 400))	Bibliotheksspektrum	25, 27
3440	454 (72), 439 (29), 394 (22), 379 (29), 370 (3), 356 (7), 355 (6), 327 (43), 295 (6), 287 (6), 269 (9), 267 (14), 241 (41), 227 (37), 207 (24), 43 (100)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_9H_{17}-Seitenkette	4-Methylfecosterol (MW = 412)	Vergleich mit [87]	25

Fortsetzung Tabelle V-10 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *A. aegerita*, acetyliert, laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
3445	468 (58), 453 (90), 408 (10), 393 (100), 301 (30), 297 (6), 255 (14), 241 (19), 161 (23), 109 (40)	1 acetylierte Hydroxygruppe, C_8H_{15}-Seitenkette	Lanosterol (MW = 426)	Vergleich mit [87]	25, 27
3452	452 (30), 374 (19), 359 (16), 327 (61), 267 (28), 249 (29), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			18
3459	396 (100), 381 (18), 354 (6), 288 (20), 275 (10), 255 (14)	C_9H_{17}-Seitenkette, $\Delta^{14,22}$-Struktur			25, 27
3504	482 (31), 467 (63), 422 (3), 407 (55), 383 (8), 321 (16), 301 (29), 255 (13), 241 (27)	1 acetylierte Hydroxygruppe	Eburicol (MW = 440)	Vergleich mit [87, 104]	27
3508	470 (12), 455 (3), 410 (9), 392 (14), 377 (7), 353 (10), 327 (10), 285 (5), 267 (11), 251 (9), 194 (35), 152 (39), 134 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			
3516	454 (4), 436 (8), 421 (5), 394 (1), 376 (26), 361 (21), 311 (4), 269 (6), 251 (100), 237 (51), 207 (14), 197 (28), 125 (28)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette	Ergosta-5,8,22-trien-3,11-diol (Portensterol, MW = 412)		8, 19, 20
3525	468 (56), 453 (20), 408 (23), 393 (34), 342 (38), 384 (2), 370 (9), 369 (7), 309 (5), 301 (5), 283 (9), 281 (24), 255 (23), 241 (28)	1 Hydroxygruppe, 1 acetyliert, Seitenkette gesättigt	4,4-Dimethylfecosterol (MW = 426)	Vergleich mit [87]	27
3559	468 (6), 431(7), 408 (3), 390 (5), 380 (12), 370 (9), 341 (21), 281 (21), 263 (8), 207 (33), 43 (100)	mind. 2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert	Lanosta-7,9(11),24-trien-3,21-diol (MW = 426)		18
3561	468 (40), 342 (30), 327 (7), 286 (23), 281 (8), 161 (48), 91 (31), 43 (100)	C_9H_{17}-Seitenkette, $\Delta^{14,22}$-Struktur			19
3577	474 (20), 438 (10), 429 (9), 405 (19), 378 (20), 363 (70), 341 (20) , 255 (15), 251 (82), 197 (40), 44 (100)	3 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{19}-Seitenkette			20
3593	470 (1), 452 (1), 437 (1), 410 (6), 392 (56), 377 (30), 349 (11), 327 (6), 285 (6), 267 (16), 266 (18), 251 (10), 209 (10), 159 (16), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette	3,5-Dihydroxy-7,22-dien-6-on (MW = 428)		8

Fortsetzung Tabelle V-10 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *A. aegerita*, acetyliert, laut GC-MS

KI	Massenfragmente (%)	Strukturinformation	Strukturvorschlag	Nachweis	Fraktion
3605	470 (6), 455 (3), 410 (8), 392 (8), 372 (9), 343 (15), 312 (11), 294 (12), 285 (20), 267 (15), 207 (10), 43 (100)	mind. 2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette (DB an C24)			8
3613	468 (37), 453 (3), 408 (82), 393 (55), 377 (29), 376 (28), 251 (32), 43 (100)	1 acetylierte Hydroxygruppe, $\Delta^{14,22}$-Struktur			19, 20
3634	470 (5), 410 (35), 395 (19), 367 (71), 343 (12), 312 (11), 285 (16), 281 (17), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			8
3658	470 (1), 452 (1), 437 (1), 410 (7), 392 (68), 377 (37), 349 (14), 285 (8), 267 (22), 213 (20), 159 (19), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette			8
3750	480 (5), 468 (5), 454 (6), 436 (15), 406 (10), 394 (43), 376 (63), 341 (13), 331 (13), 281 (25), 253 (22), 43 (100)	2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_8H_{17}-Seitenkette			19
3752	454 (4), 436 (46), 394 (78), 376 (100), 281 (11), 269 (6), 251 (33)	mind. 2 Hydroxygruppen, 1 acetyliert, C_9H_{17}-Seitenkette	Cerevisterol (MW = 430)	Vergleich mit [138]	4

V.1.5 Kultivierung

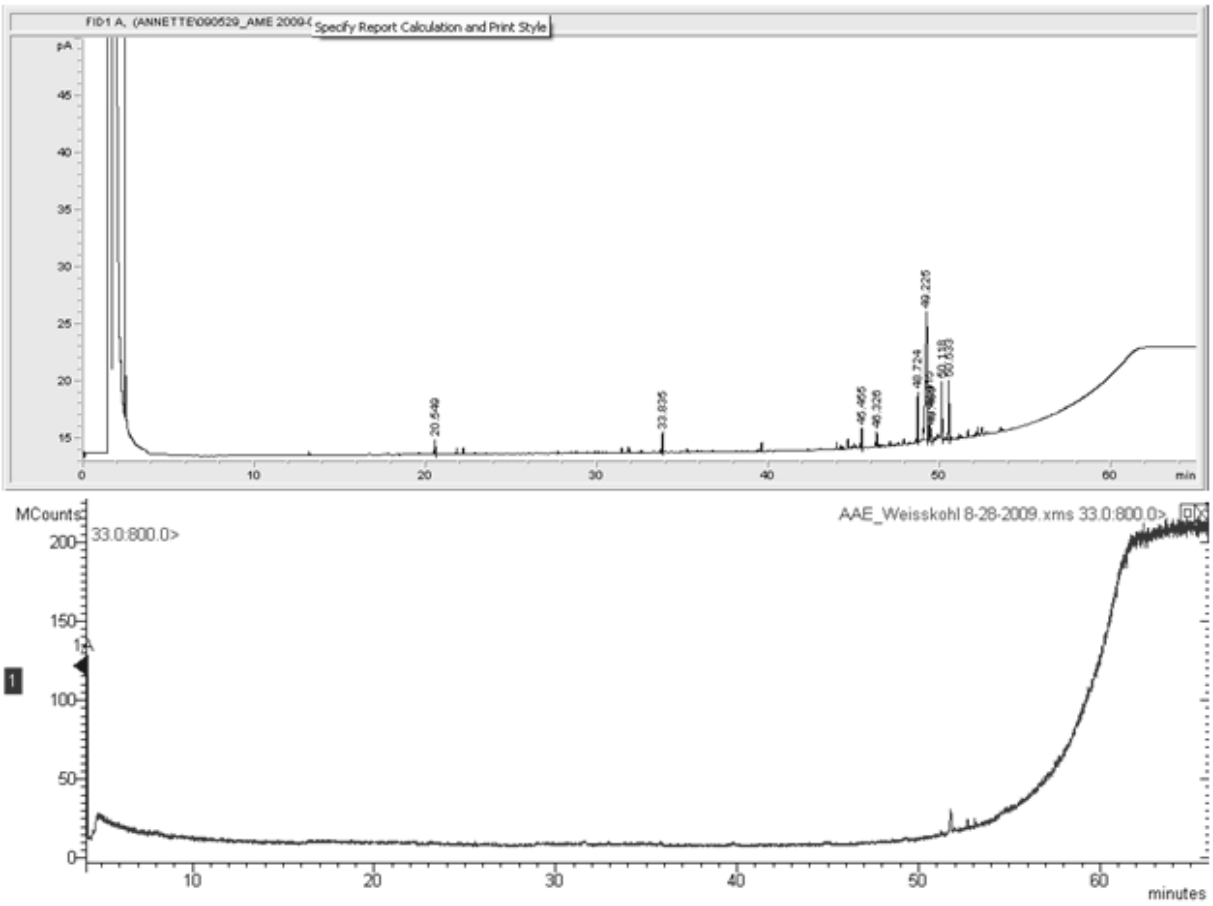

Abbildung V.15 Vergleich des GC-FID-Chromatogramms und des GC-MS-Chromatogramms des Myzels von *A. aegerita*, kultiviert auf Weißkohl.

V.1.6 Synthetisierte Stoffe

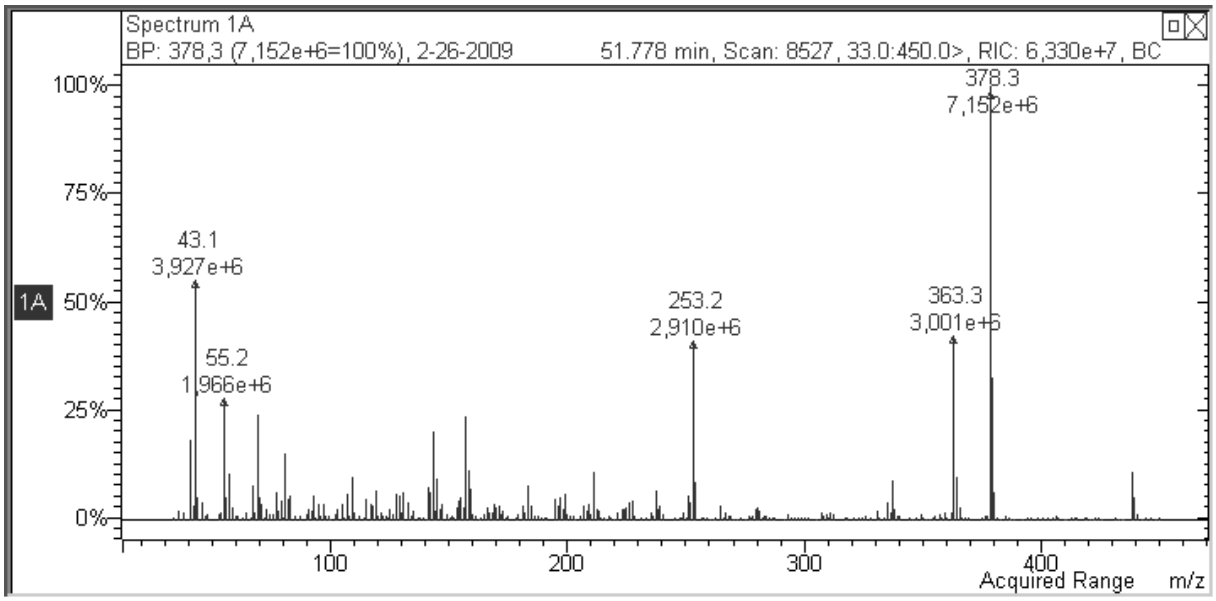

Abbildung V.16 Ergosterolacetat (Ergosta-5,7,22-trien-3-olacetat).

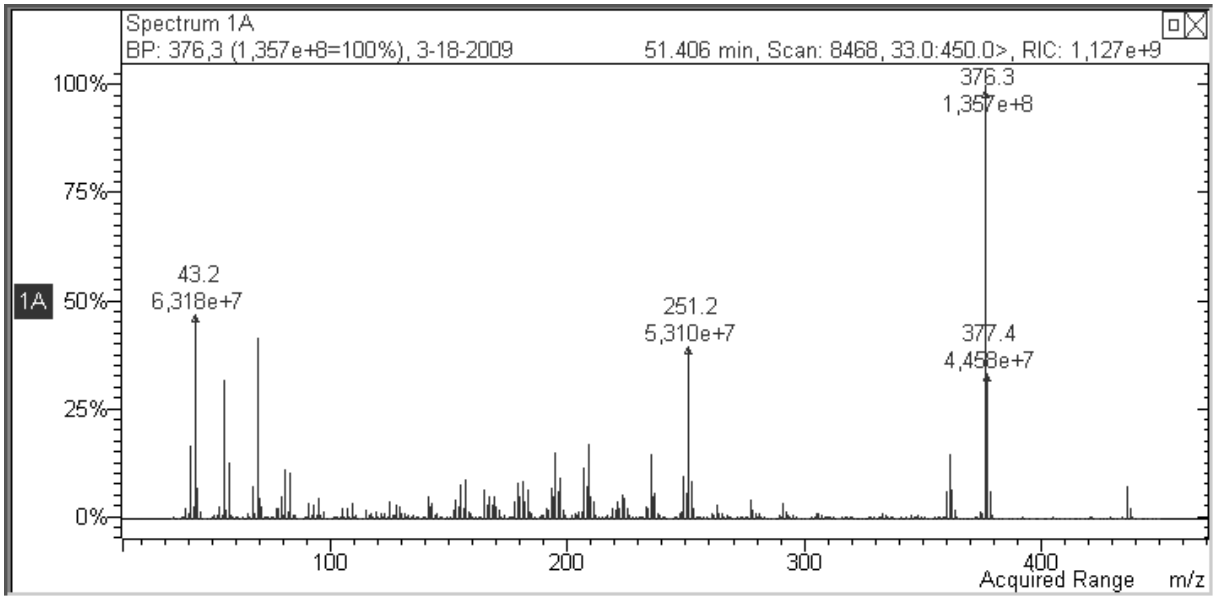

Abbildung V.17 Ergostatetraenolacetat (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetat).

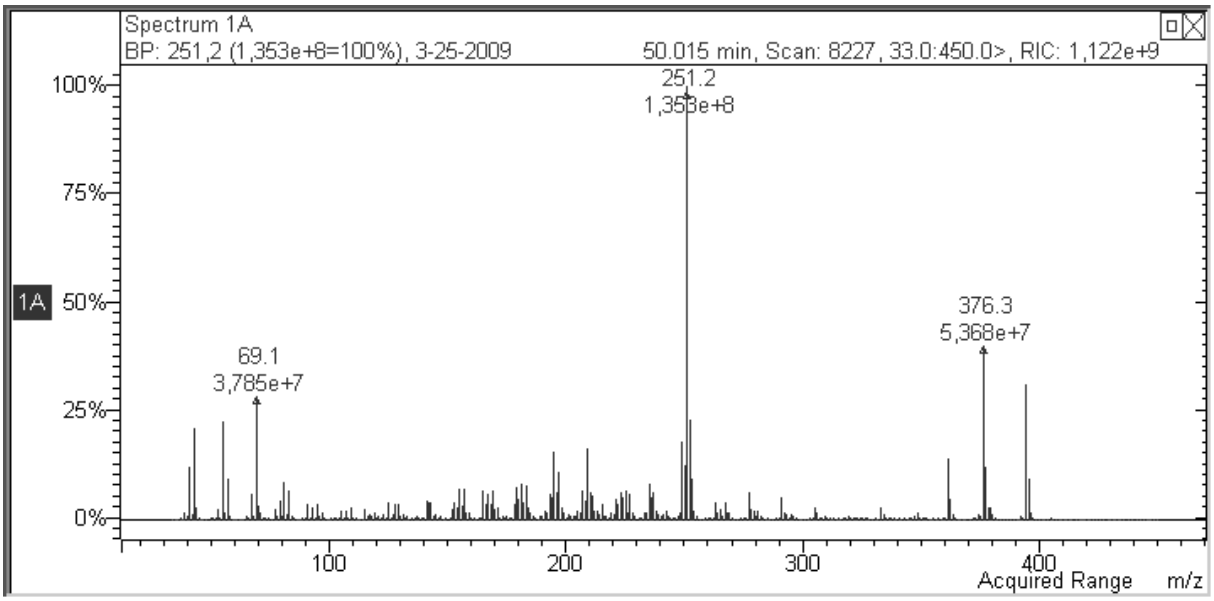

Abbildung V.18 Ergostatetraenol (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol).

V.2 NMR-Spektroskopie

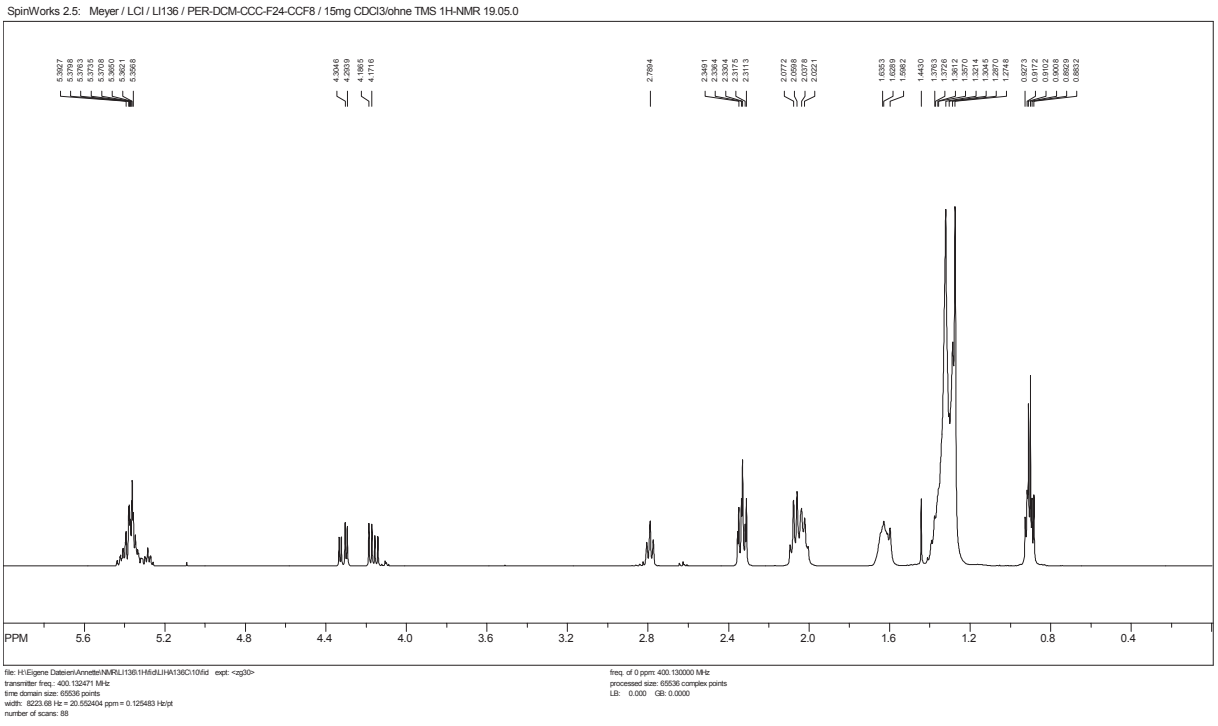

Abbildung V.19 ^{1}H-Spektrum verschiedener Triacylglycerole.

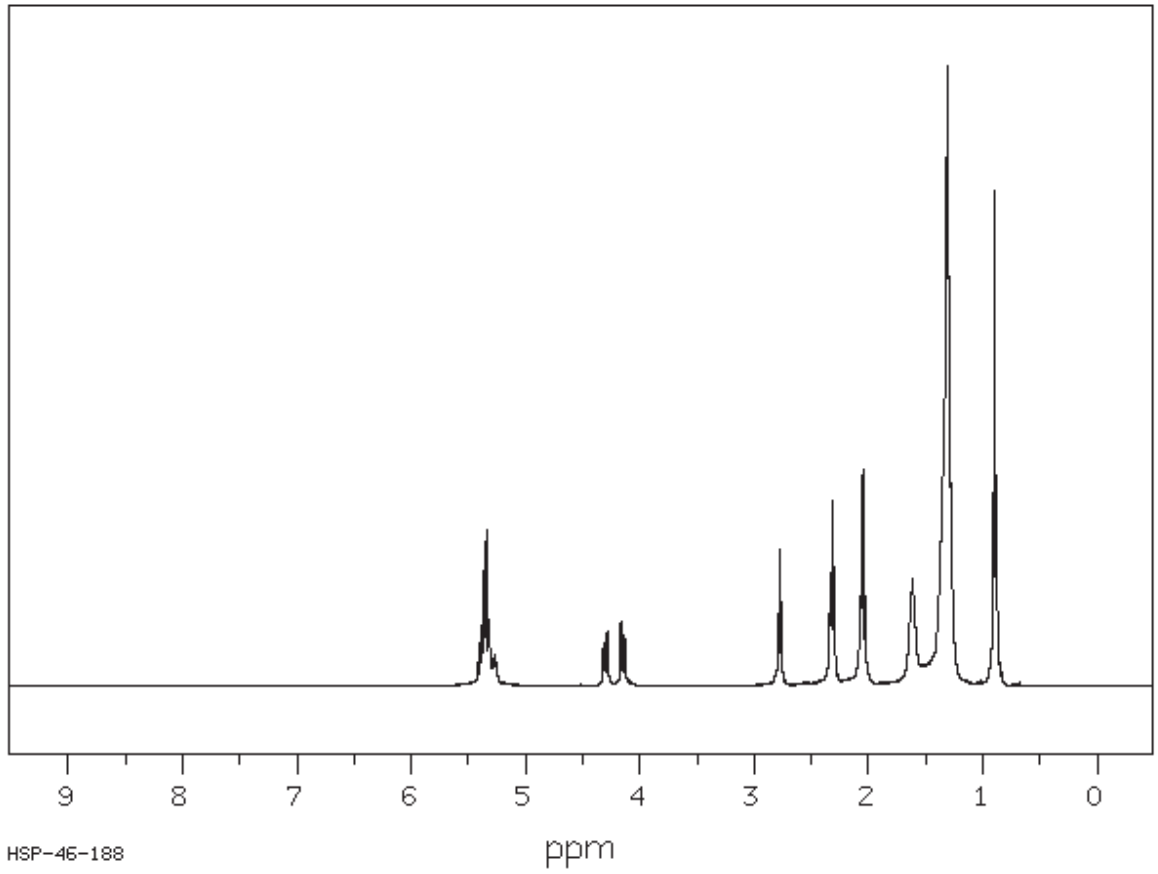

Abbildung V.20 ^{1}H-NMR für ein Trilinolylglycerol aus SDBS [139].

V.2.1 Identifizierte Stoffe

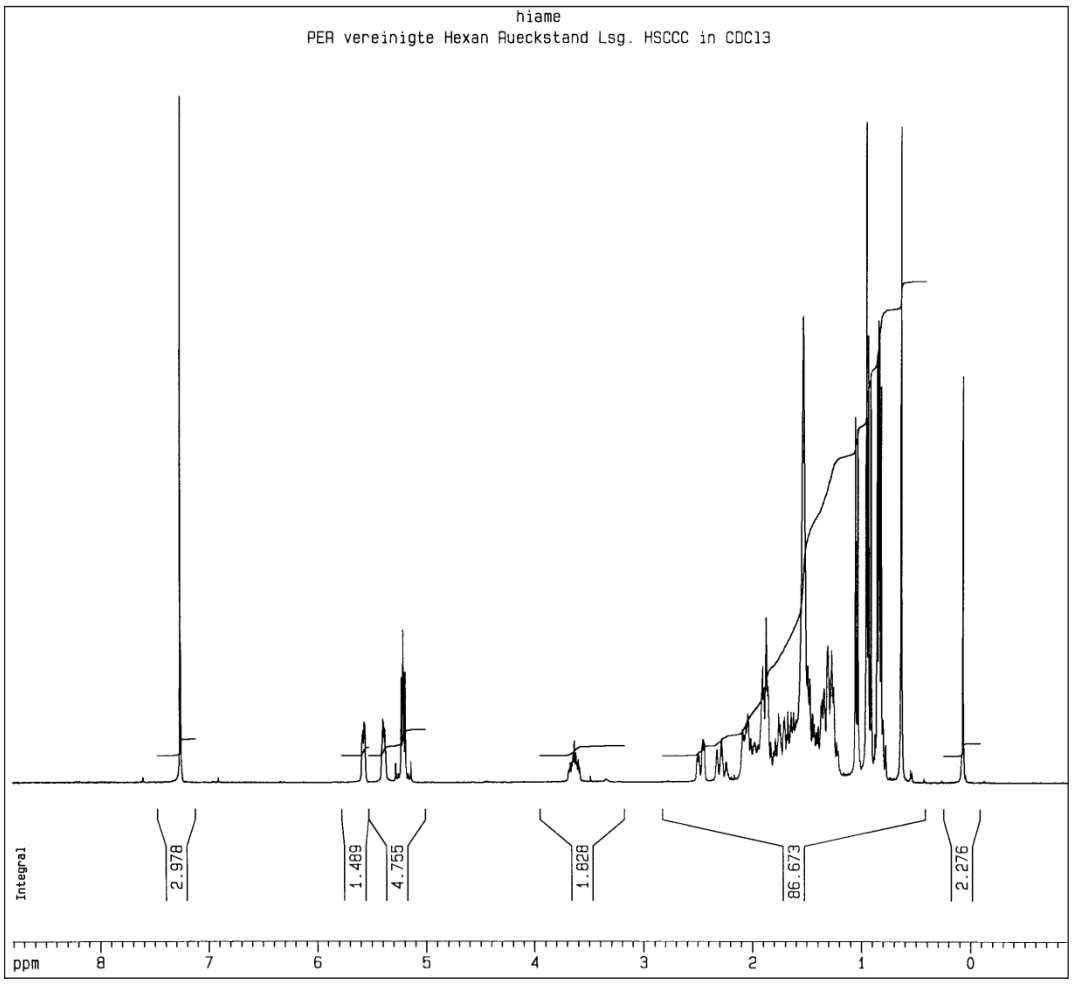

Abbildung V.21 ^{1}H-NMR Spektrum von Ergosterol.

V.2.2 Synthetisierte Stoffe

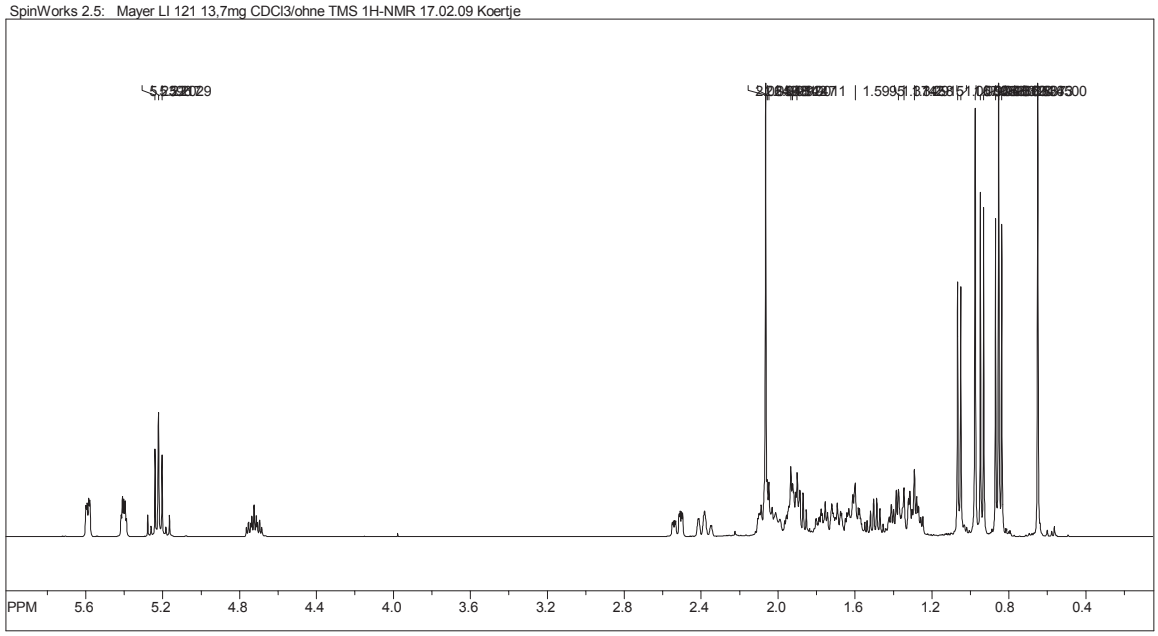

Abbildung V.22 ^{1}H-NMR von Ergosterolacetat.

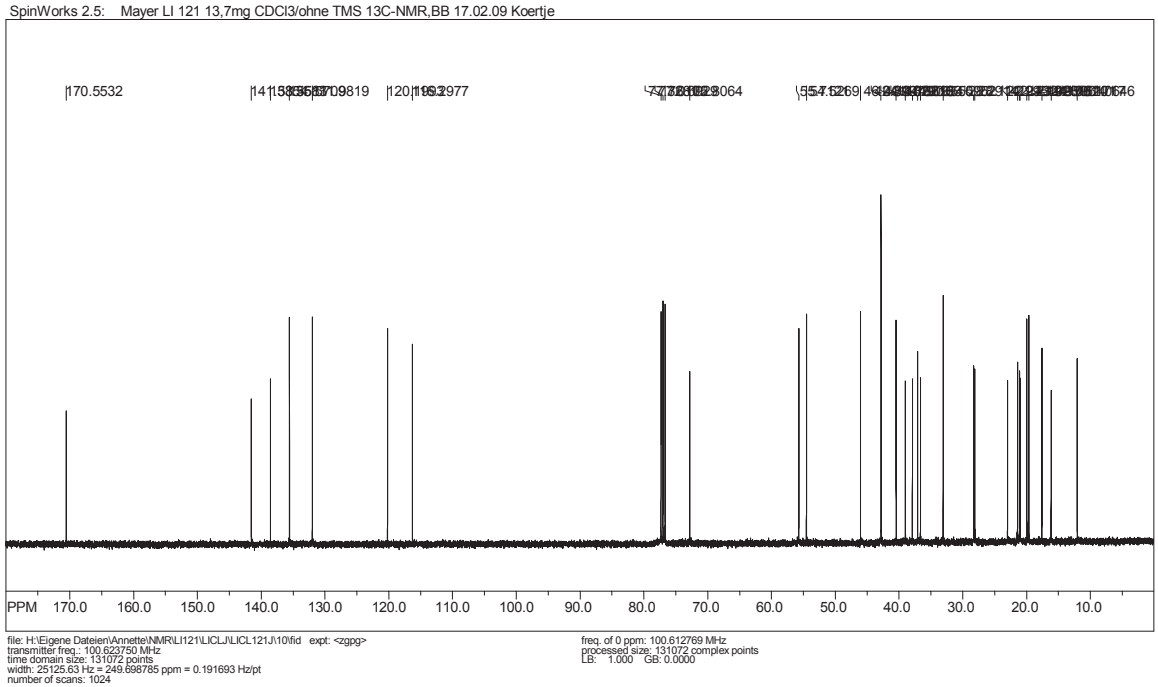

Abbildung V.23 ^{13}C-NMR von Ergosterolacetat.

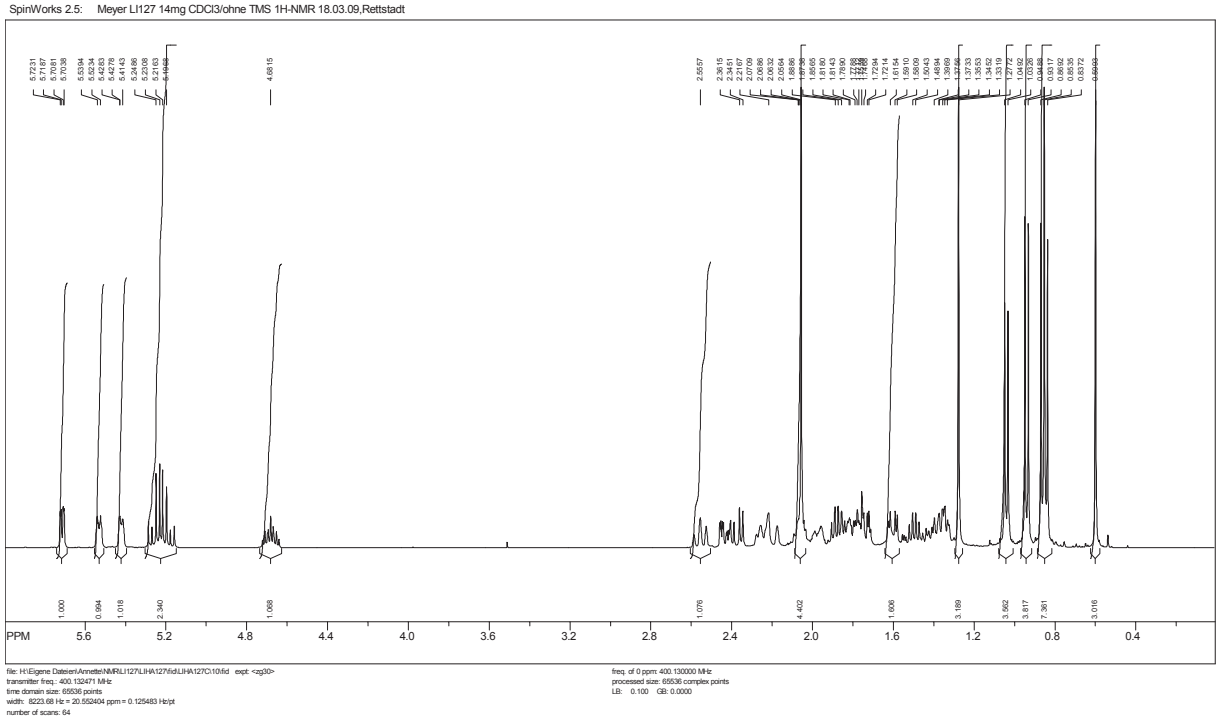

Abbildung V.24 ^{1}H-NMR von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraenolacetat.

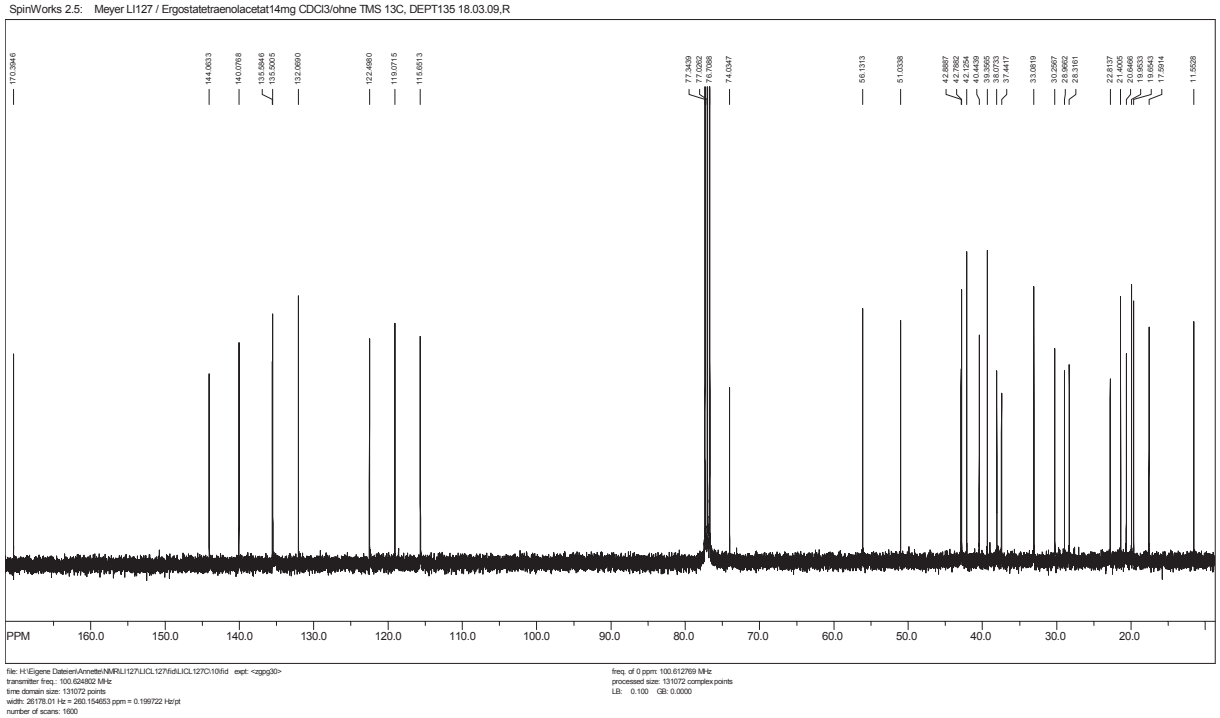

Abbildung V.25 ^{13}C-NMR von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraenolacetat.

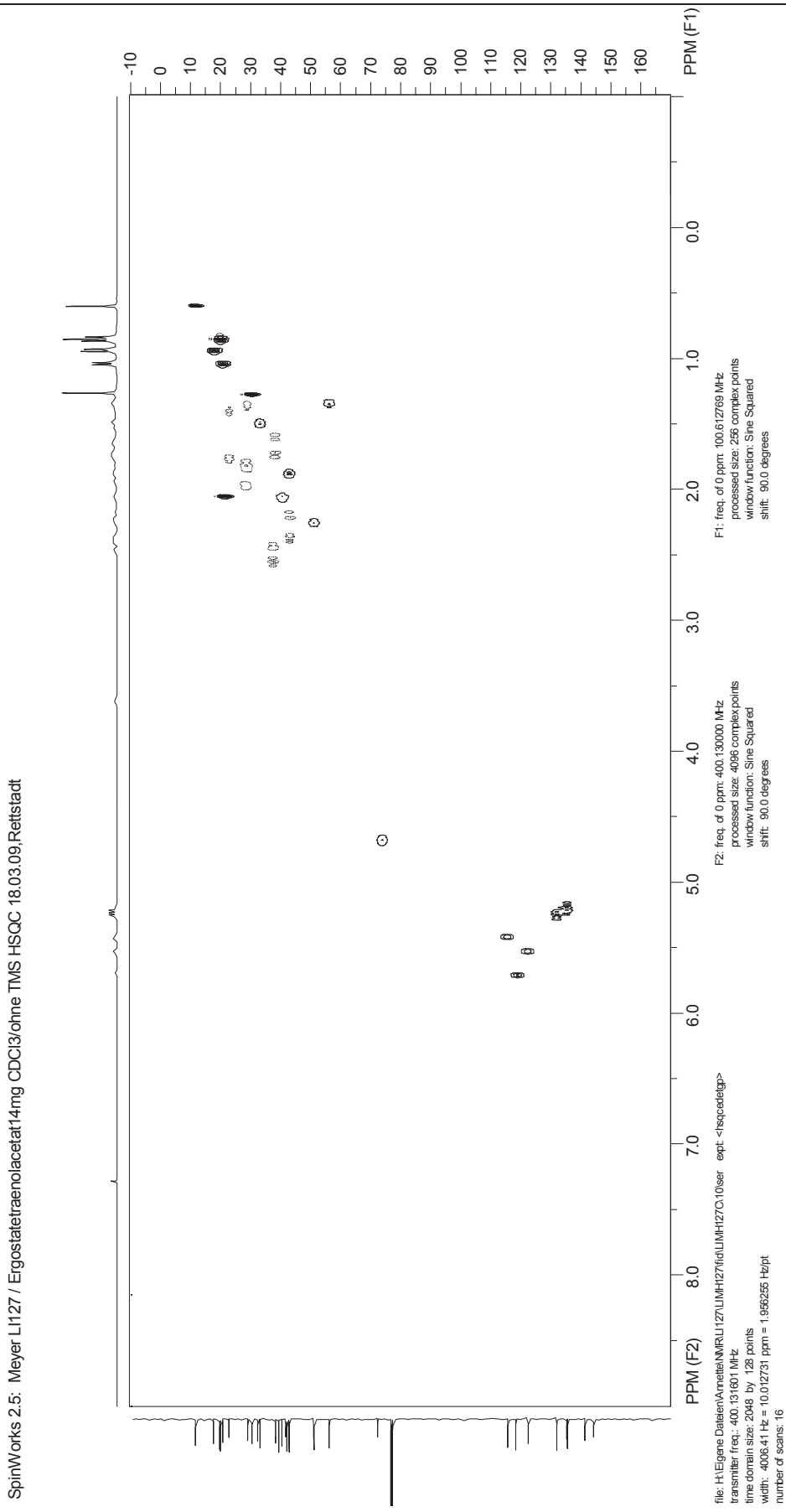

Abbildung V.26 HSQC von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetat.

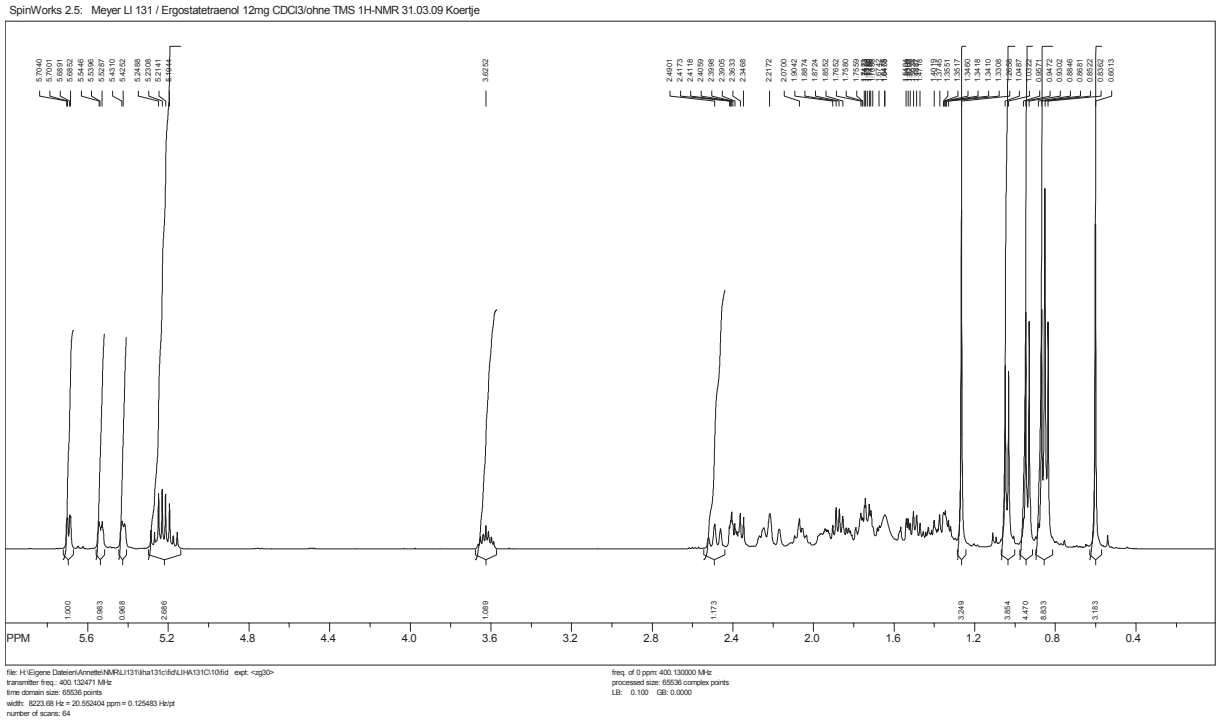

Abbildung V.27 ^{1}H-NMR von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol

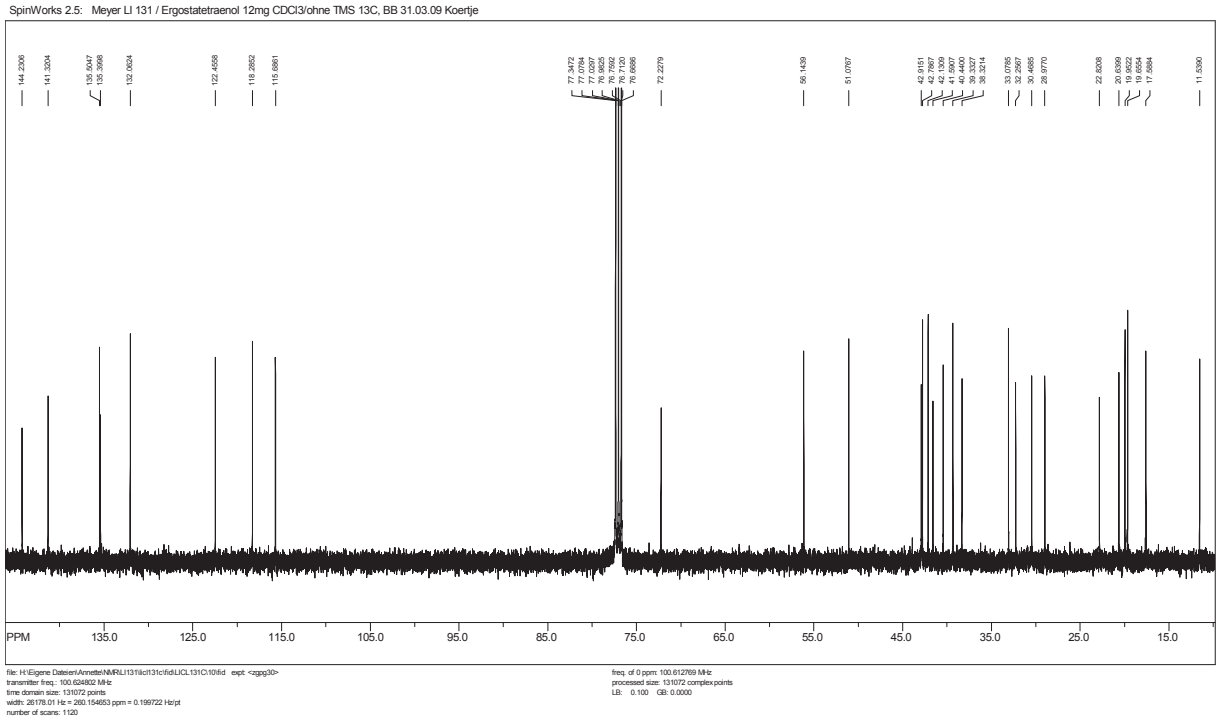

Abbildung V.28 ^{13}C-NMR von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol.

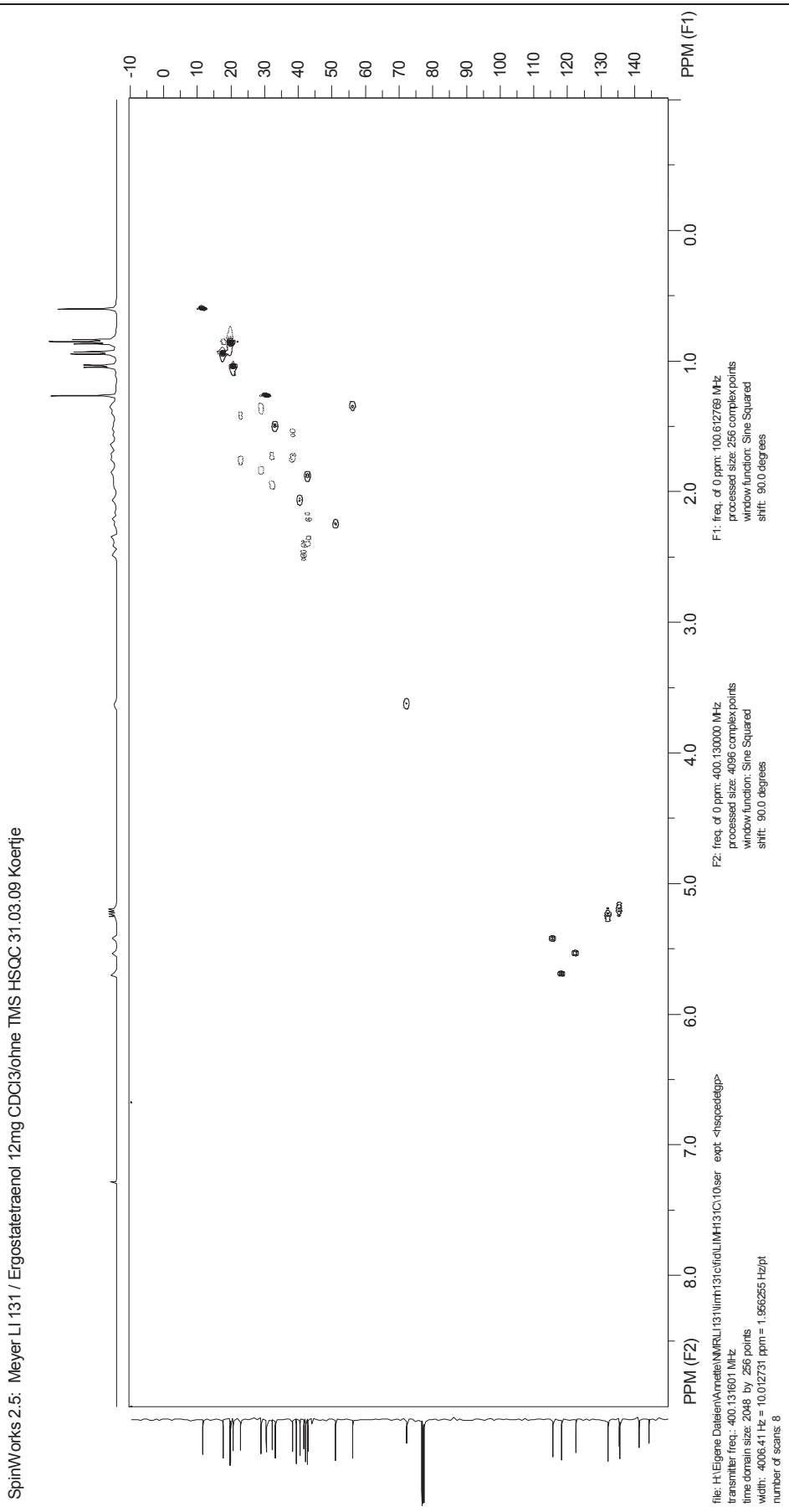

Abbildung V.29 HSQC von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol.

VI Verzeichnisse

VI.1 Abkürzungsverzeichnis

AAE	*Agrocybe aegerita*
AAPH	2,2′-Azobis(2-methylpropionamidin) dihydrochlorid
ACN	Acetonitril
AMP	2-Amino-2-methyl-1-propanol
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
AUC	area under curve (Fläche unter der Fluoreszenzabklingkurve)
BHA	3-*tert*-Butyl-4-hydroxyanisol
BHA-E	BHA-Äquivalente
BLK	Blank (Blindwert)
CCC	Countercurrent Chromatography (Gegenstromverteilungschromatographie)
COX	Cyclooxygenase
CTL	Control (Kontrolle, Lösungsmittelblindwert)
d	Dublett
DB	Doppelbindung
DCM	Dichlormethan
DMOX	Dimethyloxazolin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Essigester, Ethylacetat
EI	Elektronenstoßionisation
EtOH	Ethanol
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography
λ_{max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
LC	Liquid Chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
m	Multiplett
MeOH	Methanol
MIC	Minimal Inhibitory Concentration (minimale Hemmkonzentration)
MM	Minimalmedium
MPLC	Medium Pressure Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometrie
MW	molar weight (Molmasse)
n.b.	nicht bestimmt, nicht bekannt
NMR	nuclear magnetic resonance (kernmagnetische Resonanz)
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
P/E	Pentan-Diethylether
PBS	phosphate-buffered Saline (mit Phosphat gepufferte Salzlösung)
PER	*Pleurotus eryngii*
POS	*Pleurotus ostreatus*
s	Singulett
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
SNL	Standardnährlösung
SPL	Sample (Probe)
TBMe	*tert.*-Butylmethylether

TE	Trolox-Äquivalente
TMSIM	Trimethylsilylimidazol
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
XOD	Xanthin-Oxidase

VI.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.1 Ganoderiol F (links) und *Australic Acid* (rechts) aus *Ganoderma lucidum*. 3
Abbildung I.2 Eritadenin (links) und Lentinan (rechts)..... 4
Abbildung I.3 Schema der Arbeitsgänge des Projektes. 5
Abbildung II.1 Reaktion des DPPH-Radikals 8
Abbildung II.2 Stark (links) und wenig (rechts) geschädigte Zelle im Comet-Assay. 10
Abbildung II.3 Umsetzung von Xanthin durch Xanthinoxidase und Struktur von Allopurinol. 11
Abbildung II.4 Umwandlung von Arachidonsäure zu PGH_2 in der Prostaglandinbiosynthese. 12
Abbildung II.5 Aspirin, Naproxen und Celecoxib (von links nach rechts). 12
Abbildung II.6 *Pleurotus eryngii* aus agroindustriellem Anbau. 13
Abbildung II.7 *Agrocybe aegerita* auf Anzuchtbeutel. 14
Abbildung II.8 Ein Illudin aus [57] (oben links), ein Indol aus [58] (unten links) und das Ceramid aus [59] (rechts). 15
Abbildung II.9 *Pleurotus ostreatus* (aus [64], S. 282) 16
Abbildung II.10 Mevinolin. 17
Abbildung III.1 Synthesestrategie für Ergostatetraenol nach Recherche in Beilstein Crossfire. 32
Abbildung III.2 Nummerierung der Sterole am Beispiel des Ergosterolacetats 33
Abbildung IV.1 DPPH-Assay ethanolischer und Pentan-Ether-Extrakte der Fruchtkörper (c(Extrakte) = 0,625 mg mL^{-1} im Well). 46
Abbildung IV.2 Hydrophiler ORAC-Assay ethanolischer und Pentan-Ether-Extrakte (c(Extrakte) = 0,1 mg mL^{-1}). 46
Abbildung IV.3 Hydrophiler (rot) und lipophiler (blau) ORAC-Assay von *P. eryngii* mit den Extrakten aus Tabelle IV-4 (c(Extrakte) = 0,1 mg mL^{-1}). 49
Abbildung IV.4 Xanthinoxidase-Inhibierung durch *A. aegerita* und *P. eryngii* (c(Extrakte) = 1 mg mL^{-1}). 51
Abbildung IV.5 HSCCC-Chromatogramm des Hexan-Extraktes von *P. eryngii* bei 200 nm. Die Fraktionen sind mit blauen bzw. grünen Balken eingezeichnet, die Balkenhöhe deutet die relative Auswaage an. 53
Abbildung IV.6 GC-FID-Chromatogramm der HSCCC-Fraktion 13 des Hexan-Extraktes von *P. eryngii*. Die Geräteparameter sind in III.2.5.1 aufgeführt. 54
Abbildung IV.7 Massenspektrum bei KI = 3196 (Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, Ergosterol). 55
Abbildung IV.8 Nummerierung und typische Stereochemie von Mykosterolen. 55
Abbildung IV.9 Massenspektrum bei KI = 3155 (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol, Ergostatetraenol). 56
Abbildung IV.10 Massenspektrum bei KI = 2954 (Ergosta-2,5,7,9(11),22-pentaen). 56
Abbildung IV.11 Massenspektrum bei KI = 3270 (Ergost-7-en-3-ol, Fungisterol). 57
Abbildung IV.12 Massenspektrum bei KI = 3634 (Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol, Cerevisterol). 58
Abbildung IV.13 Ergebnisse des ORAC-Tests für die CCC-Fraktionen des Hexan-Extrakts 59

Abbildung IV.14 HSCCC-Chromatogramm des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii* bei 200 nm. Die Fraktionen sind mit blauen bzw. grünen Balken eingezeichnet, die Balkenhöhe deutet die relative Auswaage an. 62
Abbildung IV.15 Massenspektrum des Ergosteroltrimethylsilylethers aus dem Präzipitat. 63
Abbildung IV.16 Massenspektrum bei KI = 3214. 64
Abbildung IV.17 Massenspektrum bei KI = 3206 (Ergosta-7,22-dien-3-ol). 66
Abbildung IV.18 Massenspektrum bei KI = 3260 (Ergosta-5,7-dien-3-ol). 67
Abbildung IV.19 Massenspektrum bei KI = 3302 (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetat). 67
Abbildung IV.20 Massenspektrum bei KI = 3520 (Strukturvorschlag Ergosta-5,8,22-trien-3,11-diolacetat, Portensterolacetat). 68
Abbildung IV.21 Portensterol (links) und 3,5-Dihydroxyergosta-7,22-dien-6-on (rechts). 68
Abbildung IV.22 Massenspektrum bei KI = 3592 (Strukturvorschlag 3,5-Dihydroxyergosta-7,22-dien-6-on-acetat). 69
Abbildung IV.23 Ausschnitt aus dem HPLC-APCI-MS-Chromatogramm (TIC) des Dichlormethan-Extraktes (dunkelgrau), von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (hellgrau) und Ergosterol (schwarz). Die Ionisierungsbedingungen finden sich in III.2.6.1. 70
Abbildung IV.24 Ergebnisse des ORAC-Tests für die CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extrakts von *P. eryngii* (c = 0,1 mg mL^{-1}). 73
Abbildung IV.25 GC-FID-Chromatogramme der HSCCC-Fraktionen 17, 18, 19 und 20 (von oben nach unten) des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii*. Die Geräteparameter sind in III.2.5.1 aufgeführt. 77
Abbildung IV.26 Ergebnisse des lipophilen ORAC-Assays für die MPLC-Fraktionen von *P. eryngii* (c = 0,1 mg mL^{-1}). 79
Abbildung IV.27 Chromatogramm der RP18-Trennung bei 205 nm (vgl. III.2.6.2). 79
Abbildung IV.28 Ergebnisse des lipophilen ORAC-Assays für die Fraktionen der präparativen HPLC von *P. eryngii* (c = 0,1 mg mL^{-1}). 80
Abbildung IV.29 Ergebnisse des lipophilen ORAC-Assays für die Fraktionen der Säulenchromatographie von *P. eryngii* (c = 0,1 mg mL^{-1}). 81
Abbildung IV.30 HPLC-APCI-MS-Chromatogramm (TIC, Ausschnitt) von Fraktion 8 der Säulenchromatographie von *P. eryngii* (oben links), mit den Spektren der einzelnen Peaks. Die Ionisierungsbedingungen finden sich in III.2.6.1. 82
Abbildung IV.31 Massenspektrum bei KI = 3315 (Ergosta-5,8,22-trien-3-olacetat, Lichesterolacetat). 85
Abbildung IV.32 Massenspektrum bei KI = 3344 (19-Norergosta-5,7,9,22-tetraen-3-olacetat, Neoergosterolacetat). 86
Abbildung IV.33 Massenspektrum bei KI = 3362 (Strukturvorschlag Ergost-5,7,24(28)-trien-3-olacetat). 87
Abbildung IV.34 Massenspektrum bei KI = 3390 (Ergost-8-en-3-olacetat). 87
Abbildung IV.35 Massenspektrum bei KI = 3419 (Ergosta-7,24(28)-dien-3-olacetat, Episterolacetat). 88
Abbildung IV.36 Massenspektrum bei KI = 3440 (4-Methylergosta-8,24(28)dien-3-olacetat, 4-Methylfecosterolacetat). 89
Abbildung IV.37 Massenspektrum bei KI = 3445 (Lanosterolacetat). 89

Abbildung IV.38 Massenspektrum bei KI = 3504 (24-Methylen-24,25-dihydrolanosterolacetat, Eburicolacetat). 90
Abbildung IV.39 Massenspektrum bei KI = 3525 (4,4-Dimethylergosta-8,24(28)dien-3-olacetat, 4,4-Dimethylfecosterolacetat). 90
Abbildung IV.40 Massenspektrum bei KI = 3328 (Strukturvorschlag Ergosta-8,22-dien-3-olacetat). 91
Abbildung IV.41 Trockenmasse nach Gefriertrocknung des Myzels. 92
Abbildung IV.42 Fruchtkörper-und Sporenbildung von *A. aegerita* (von links nach rechts: SNL, Weißkohlabschnitte, Rapspresskuchen, Biertreber, Möhrentrester). 93
Abbildung IV.43 Trolox-Äquivalente des extrahierten Myzels (hellgrau) von *P. eryngii* mit Blindwerten (weiß) (c = 0,5 mg mL^{-1}). 94
Abbildung IV.44 Trolox-Äquivalente des extrahierten Myzels (grau) von *P. ostreatus* mit Blindwerten (weiß) (c = 0,5 mg mL^{-1})). 95
Abbildung IV.45 Trolox-Äquivalente des extrahierten Myzels von *A. aegerita* (dunkelgrau) mit Blindwerten (weiß) (c = 0,5 mg mL^{-1})). 95
Abbildung IV.46 GC-FID-Chromatogramm der Kultivierung auf Rapspresskuchen: Blindwert, *P. eryngii*, *P. ostreatus*, *A. aegerita* (von oben nach unten). Die Geräteparameter sind in III.2.5.1 aufgeführt. 96
Abbildung IV.47 Biosyntheseweg des Ergosterols im Basidiomyceten *Ustilago maydis* [89] (Lanosterol (a), Eburicol (b), 4,4-Dimethylergosta-8,14,24(28)-trien-3-ol (c), 4,4-Dimethylfecosterol (d), Fecosterol (e), Episterol (f), Ergosta-5,7,24(28)-trien-3-ol (g), Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3-ol (h), Ergosterol (i)). 101
Abbildung V.1 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der zweiten HSCCC des Hexan-Extraktes (Kieselgel, Laufmittel Dichlormethan). 115
Abbildung V.2 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der zweiten HSCCC des Hexan-Extraktes (RP18, Laufmittel Methanol). 115
Abbildung V.3 Monoacylglycerol (KI = 2684, Strukturvorschlag: Octadeca-9,12-diensäure-(2-hydroxy-1-hydroxymethyl)ethylester). 116
Abbildung V.4 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der HSCCC (Kieselgel, Laufmittel Dichlormethan). 118
Abbildung V.5 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der HSCCC (RP18, Laufmittel Methanol). 118
Abbildung V.6 Massenspektrum des Acetats von Ergosta-7,22-dien-3-ol. 120
Abbildung V.7 Massenspektrum des Acetats von Ergost-7-en-3-ol (Fungisterol). 121
Abbildung V.8 Massenspektrum des Acetats von Ergosta-7,22-dien-3,5,6-triol (Cerevisterol). 121
Abbildung V.9 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der MPLC (RP18, Laufmittel Methanol). 124
Abbildung V.10 Übersichts-DC über die gepoolten Fraktionen der Säulenchromatographie (Kieselgel, Laufmittel Dichlormethan : Methanol = 99 : 1). 126
Abbildung V.11 DMOX-Derivat der 9,12-Octadecadiensäure (Linolsäure). 127
Abbildung V.12 DMOX-Derivat der 9-Octadecensäure (Ölsäure). 128

Abbildung V.13 vollständiges HPLC-APCI-MS-Chromatogramm (TIC) des Dichlormethan-Extraktes (dunkelgrau), von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol (hellgrau) und Ergosterol (schwarz). 128
Abbildung V.14 Massenspektrum des Acetats von Ergosta-5,7-dien-3-ol. 129
Abbildung V.15 Vergleich des GC-FID-Chromatogramms und des GC-MS-Chromatogramms des Myzels von *A. aegerita*, kultiviert auf Weißkohl. 134
Abbildung V.16 Ergosterolacetat (Ergosta-5,7,22-trien-3-olacetat). 135
Abbildung V.17 Ergostatetraenolacetat (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetat). 135
Abbildung V.18 Ergostatetraenol (Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol). 136
Abbildung V.19 ^{1}H-Spektrum verschiedener Triacylglycerole. 136
Abbildung V.20 ^{1}H-NMR für ein Trilinolylglycerol aus SDBS [139]. 137
Abbildung V.21 ^{1}H-NMR Spektrum von Ergosterol. 138
Abbildung V.22 ^{1}H-NMR von Ergosterolacetat. 139
Abbildung V.23 ^{13}C-NMR von Ergosterolacetat. 139
Abbildung V.24 ^{1}H-NMR von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraenolacetat. 140
Abbildung V.25 ^{13}C-NMR von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraenolacetat. 140
Abbildung V.26 HSQC von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetat. 141
Abbildung V.27 ^{1}H-NMR von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol 142
Abbildung V.28 ^{13}C-NMR von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol. 142
Abbildung V.29 HSQC von Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol. 143

VI.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle III-1 Platten-Layout des ORAC-Testes 19
Tabelle III-2 Gradientenprogramm (linear) der LC-APCI-MS 27
Tabelle III-3 Gradientenprogramm (linear) der präparativen HPLC 28
Tabelle III-4 Gradient der Säulenchromatographie 30
Tabelle III-5 NMR-Daten aus HSQC für Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-olacetat 34
Tabelle III-6 NMR-Daten aus HSQC für Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3-ol 35
Tabelle III-7 SNL-Medium 37
Tabelle III-8 Spurenelement-Lösung 37
Tabelle III-9 Einwaage der Nebenströme 38
Tabelle III-10 Allgemeine Geräte 40
Tabelle III-11 Chemikalien für Bioassays 41
Tabelle III-12 Lösungsmittel 42
Tabelle III-13 Chemikalien für Synthesen 43
Tabelle III-14 Chemikalien für Nährmedien 43
Tabelle IV-1 Inhibierung der Cyclooxygenasen durch ethanolische Extrakte verschiedener Basidiomyceten 47
Tabelle IV-2 Inhibierung der Cyclooxygenase II durch Standardsubstanzen (c = 40 µg mL^{-1} in der Reaktionslösung) 48
Tabelle IV-3 Inhibierung der Cyclooxygenase II durch Pentan-Ether-Extrakte verschiedener Basidiomyceten 48
Tabelle IV-4 Auswaage der Extrakte von *P. eryngii* 49
Tabelle IV-5 Comet-Assay mit methanolischen Extrakten 51
Tabelle IV-6 Cyclooxygenase II-Inhibierung der CCC-Fraktionen des Hexan-Extraktes aus *P. eryngii* (c = 40 µg mL^{-1} in Reaktionslösung) 59
Tabelle IV-7 Zusammenfassung der bioaktiven Eigenschaften der HSCCC-Fraktionen des Hexan-Extraktes von *P. eryngii* 61
Tabelle IV-8 Auswaage der HSCCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extrakts von *P. eryngii* 63
Tabelle IV-9 Auszug aus der HPLC-MS-Messung 71
Tabelle IV-10 Zusammenfassung der bioaktiven Eigenschaften der HSCCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii* 73
Tabelle IV-11 Extrapolierte Gehalte einiger Sterole in *P. eryngii*. 75
Tabelle IV-12 Trolox-Äquivalente der Einzelsubstanzen im lipophilen ORAC. 83
Tabelle IV-13 Inhibierung der Cyclooxygenasen durch Einzelsubstanzen (c = 5 µg mL^{-1} in der Reaktionslösung) 84
Tabelle IV-14 Verbindungen aus der GC-MS-Untersuchung des auf Nebenströmen kultivierten Myzels 97
Tabelle IV-15 T-ORAC-Werte für verschiedene Gemüsesorten [134] und Pilze (extrapoliert) 108
Tabelle V-1 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Hexan-Extraktes von *P. eryngii* laut GC-MS 116

Tabelle V-2 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes *P. eryngii* laut GC-MS 119
Tabelle V-3 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *P. eryngii*, acetyliert, laut GC-MS 122
Tabelle V-4 Auswaage der gepoolten Fraktionen der MPLC-Trennung von *P. eryngii* 124
Tabelle V-5 Direkteinlass-EI-MS-Spektren der MPLC-Fraktionen von *P. eryngii* 125
Tabelle V-6 Auswaage der gepoolten Fraktionen der präparativen HPLC-Trennung von *P. eryngii* . 125
Tabelle V-7 GC-MS-Daten der acetylierten Fraktionen aus der präparativen HPLC von *P. eryngii* .. 125
Tabelle V-8 Auswaage der gepoolten Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung von *P. eryngii* 126
Tabelle V-9 GC-MS-Daten der acetylierten Fraktionen aus der Säulenchromatographie von *P. eryngii* 127
Tabelle V-10 Verbindungen der CCC-Fraktionen des Dichlormethan-Extraktes von *A. aegerita*, acetyliert, laut GC-MS 130

VI.4 Literaturverzeichnis

1. Lindequist, U., T.H.J. Niedermayer, and W.-D. Jülich, *The Pharmacological Potential of Mushrooms.* Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2005: p. 285-299.
2. Gao, Y., et al., *A randomized, placebo-controlled, multicenter study of Ganoderma lucidum (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphylloromycetidae) polysaccharides (Ganopoly R) in patients with advanced lung cancer.* International Journal of Medicinal Mushrooms, 2003. **5**(369-81).
3. Stamets, P. *Fungi Perfecti's Mycomedicinals*. [http://www.fungi.com/mycomeds/info.html] 2009 30.03.2009 [cited 2009 30.03.2009].
4. Eder, J. and C. Weig, *Pilze als Arzneipflanzen: Sekundäre Inhaltsstoffe in Pilzen (Gemüse) mit Bedeutung für die menschliche Gesundheit: 4. Mitteilung: Lentinus edodes, Shii-Take-Pilz.* Ernährungsumschau, 1988: p. 306-308.
5. Döll, M. and P. Winterhalter, *Betaglucane - Immunmodulatoren mit interessantem Wirkprofil.* Journal für Orthomolekulare Medizin, 2004. **12**(2): p. 1-8.
6. Magalhães, L.M., et al., *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.* Analytica Chimica Acta, 2008. **613**(1): p. 1-19.
7. Dávalos, A., C. Gómez-Cordovés, and B. Bartolomé, *Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**: p. 48-54.
8. Jayakumar, T., P.A. Thomas, and P. Geraldine, *In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, Pleurotus ostreatus.* Innovative Food Science & Emerging Technologies. **In Press, Corrected Proof**.
9. Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay.* Analytical Biochemistry, 1996. **239**: p. 70-76.
10. Krings, U. and R.G. Berger, *Antioxidant activity of some roasted foods.* Food Chemistry, 2000. **72**: p. 223-229.
11. Koleva, I.I., et al., *Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods.* Phytochemical Analysis, 2002. **13**(1): p. 8-17.
12. Huang, D., et al., *Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β-Cyclodextrin as the Solubility Enhancer.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(7): p. 1815-1821.
13. Megías, C., et al., *Immobilization of Angiotensin-Converting Enzyme on Glyoxyl-Agarose.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**: p. 4641-4645.
14. Tsutsumi, Y., et al., *In vitro screening of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from Japanese cedar (Cryptomeria japonica).* Journal fo Wood Science, 1998. **44**: p. 463-468.
15. Jayaprakasam, B., et al., *Terpenoids from Stinking Toe (Hymneae courbaril) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities.* Food Chemistry, 2007. **105**: p. 485-490.
16. Perera, P., et al., *Search for Natural Products which Affect Cyclooxygenase-2*, in *Bioactive Compounds from Natural Sources:*, C. Tringali, Editor. 2001, Taylor & Francis: London. p. 432-472.
17. Ellis, C.D., et al., *Synthesis and evaluation of thiazepines as interleukin-1b converting enzyme (ICE) inhibitors.* Bioorganic and Medicinial Chemistry Letters, 2006. **16**: p. 4728-4732.
18. Dirsch, V.M., H. Stuppner, and A.M. Vollmar, *The Griess Assay: Suitable for a Bio-Guided Fractionation of Anti-Inflammatory Plant Extracts?* Planta Medica, 1998. **64**: p. 423-426.
19. Cottam, H.B., et al., *New Adenosine Kinase Inhibitors with Oral Antiinflammatory Activity: Synthesis and Biological Evaluation.* Journal of Medicinal Chemistry, 1993. **36**: p. 3424-3430.
20. Laufersweiler, M.C., et al., *Synthesis and evaluation of tricyclic pyrrolopyrimidinones as dipeptide mimetics: Inhibition of interleukin-1b-converting enzyme.* Bioorganic and Medicinial Chemistry Letters, 2005. **15**: p. 4322-4326.
21. Ringbom, T., et al., *COX-2 Inhibitory Effects of Naturally Occurring and Modified Fatty Acids.* J. Nat. Prod., 2001. **64**(6): p. 745-749.
22. Zhang, Y., G.L. Mills, and M.G. Nair, *Cyclooxygenase Inhibitory and Antioxidant Compounds from the Mycelia of the Edible Mushroom Grifola frondosa.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**: p. 7581-7585.

23. Zhang, Y., G.L. Mills, and M.G. Nair, *Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the fruiting body of an edible mushroom, Agrocybe aegerita.* Phytomedicine, 2003. **10**: p. 366-390.
24. Buffalini, M., et al., *Novel and simple high-performance liquid chromatographic method for determination of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase activity.* Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2005. **819**: p. 307-313.
25. Lippe, G., et al., *Inhibition of Rat Liver Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase By Sulfhydryl Reagents, Coenzyme A Esters and Synthetic Compounds.* Biochemical Pharamcology, 1985. **34**(18): p. 3293-3297.
26. Astles, P.C., et al., *Acyl-CoA:Cholesterol O-Acyltransferase (ACAT) Inhibitors. 2. 2-(1,3-Dioxan-2-yl)-4,5-diphenyl-1H-imidazoles as Potent Inhibitors of ACAT.* Journal of Medicinal Chemistry, 1996. **39**: p. 1423-1432.
27. Iio, M., et al., *Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids.* Agricultural and Biological Chemistry, 1985. **49**(7): p. 2173-2176.
28. Mostafa, M., et al., *Free radical scavenging phenylethanoid glycosides from Leucas indica Linn.* Natural Product Research (früher: Natural Product Letters), 2007. **21**(4): p. 354-361.
29. Kubo, I., et al., *Antioxidant activity of anacardic acids.* Food Chemistry, 2006. **99**: p. 555-562.
30. Yawadio, R., S. Tanimori, and N. Morita, *Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities.* Food Chemistry, 2007. **101**: p. 1616-1625.
31. Logendra, S., et al., *Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from Artemisia dracunculus.* Phytochemistry, 2006. **67**: p. 1539-1546.
32. Iwata, S., et al., *Inhibitory effect of chalcone derivatives on recombinant human aldose reductase.* Biological and Pharmaceutical Bulletin, 1999. **22**(3): p. 323-325.
33. Kubo, I. and I. Kinst-Hori, *2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde: A Potent Tyrosinase Inhibitor from African Medicinal Plants.* Planta Medica, 1999. **65**: p. 19-22.
34. Carroll, A.R., et al., *Petrosamine B, an Inhibitor of the Helicobacter pylori Enzyme Aspartyl Semialdehyde Dehydrogenase from the Australian Sponge Oceanapia sp.* Journal of Natural Products, 2005. **68**: p. 804-806.
35. Vermeirssen, V., J. van Camp, and W. Verstraete, *Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides.* British Journal of Nutrition, 2004. **92**: p. 357-366.
36. Halliwell, B., et al., *Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo: What They Do and How They Work.* Critical Reviwes in Food Science and Nutrition, 1995. **35**(1&2): p. 7-20.
37. Huang, D.J., B.X. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(6): p. 1841-1856.
38. MacDonald-Wicks, L.K., L.G. Wood, and M.L. Garg, *Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. **86**: p. 2046-2056.
39. Blois, M.S., *Antioxidatn Determinations by the Use of a Stable Free Radical.* Nature, 1958. **181**(4617): p. 1199-1200.
40. Foti, M.C., C. Daquino, and C. Geraci, *Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH Radical in Alcoholic Solutions.* Journal of Organic Chemistry, 2004. **69**(7): p. 2309-2314.
41. Freier, M., *Was sind ORAC-Units?*, in *Knackpunkt*. 2008, Verbraucherzentrale Nordrhein-Westfalen: Düsseldorf.
42. Bhagwat, S., D.B. Haytowitz, and J.M. Holden, *USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of selected Foods*, in *American Institute for Cancer Research Launch Conference*. 2007: Washington D.C.
43. Hartmann, A., et al., *Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay.* Mutagenesis, 2003. **18**(1): p. 45-51.
44. Parka, Y.K., et al., *Chaga mushroom extract inhibits oxidative DNA damage in human lymphocytes as assessed by comet assay.* BioFactors, 2004. **21**(1-4): p. 109-112.
45. Shi, Y.-l., et al., *Mushroom-Derived Preparations in the Prevention of H2O2-Induced Oxidative Damage to Cellular DNA.* Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 2002. **22**(2): p. 103-111.
46. Scheller, P.R. *Gicht*. Römpp Online 2009 April 2009 [cited 2009 01.06.2009]; Available from: http://shan01.tib.uni-hannover.de/han/RoemppLexikonOnline/www.roempp.com/prod/index1.html.
47. Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla, *Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition.* Pharmacological Reviews, 2004. **56**(3): p. 387-437.

48. Cetto, B., *Enzyklopädie der Pilze*. Vol. 1. 1987, München, Wien, Zürich: BLV Verlagsgesellschaft.
49. Michael, E., *Handbuch für Pilzfreunde*. 4 ed. Vol. 3. 1987, Stuttgart, New York: Fischer.
50. Krause, K.C. and S. Himmel, *Anzucht von Pleurotus eryngii und Agrocybe aegerita auf Tee, Hanf und Hanf/Tee-Gemischen*, in *Fakultät für Forstwissenschaft und Waldökologie*. 2008, Georg August Universität Göttingen: Göttingen.
51. Ngai, P.H.K. and T.B. Ng, *A hemolysin from the mushroom Pleurotus eryngii.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2006: p. 1185-1191.
52. Itonori, S., K. Aoki, and M. Sugita, *Glycosphingolipids in edible fungi and their biological activities.* Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 2004. **209**(3): p. 211-218.
53. Kim, S.-W., et al., *Effects of mushroom, Pleurouts eryngii, extracts on bone metabolism.* Clinical Nutrition, 2006. **25**: p. 166-170.
54. Kreisel, H., *Liste der ethnomykologisch und biotechnologisch relevanten Pilze.* Feddes Repertorium, 2005. **116**(5-6): p. 339-391.
55. Bielli, E., *Pilze*. 1 ed. 1997, Klagenfurt: Neuer Kaiser Verlag.
56. Zhang, S., et al., *Antioxidative and antiaging effect of bioactive extract from Agrocybe aegerita.* Yingyang Xuebao, 2008. **30**(3): p. 294-297.
57. Stránsky, K., et al., *Antifungal Abtibiotic From The Mushroom Agrocybe aegerita (Brig.) Sing.* Collection of Chechoslovak Chemical Communications, 1992. **57**: p. 590-603.
58. Kim, W.-G., et al., *New Indole Derivatives with Free Radical Scavenging Activity from Agrocybe cylindracea.* Journal of Natural Products, 1997. **60**(7): p. 721-723.
59. Diyabalanage, T., et al., *Health-beneficial qualities of the edible mushroom, Agrocybe aegerita.* Food Chemistry, 2008. **108**(1): p. 97-102.
60. Ngai, P.H.K., Z. Zhao, and T.B. Ng, *Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom Agrocybe cylindracea.* Peptides, 2005. **26**(2): p. 191-196.
61. Kiho, T., S. Sobue, and S. Ukai, *Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of Agrocybe cylindracea.* Carbohydrate Research, 1994. **251**: p. 81-87.
62. Souci, Fachmann, and Kraut, *Die Zusammenstzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen*. 7 ed, ed. D.F.f. Lebensmittel. 2008, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
63. Schwantes, H.O., *Biologie der Pilze*. 1996, Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
64. Michael, E., *Handbuch für Pilzfreunde*. 3 ed. Vol. 4. 1985, Stuttgart, New York: Fischer.
65. Michael, E., *Handbuch für Pilzfreunde*. 5 ed, ed. H. Kreisel. Vol. 1. 1983, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
66. Bobek, P., L. Ozdín, and L. Kuniak, *Effect of oyster mushroom and isolated beta-glucan on lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed the cholesterol diet.* The Journal of Nutritional Biochemistry, 1997. **8**(8): p. 469-471.
67. Hozová, B., L. Kuniak, and B. Kelemenová, *Application of β-D-Glucans Isolated from Mushrooms Pleurotus ostreatus (Pleuran) and Lentinus edodes (Lentinan) for Increasing the Bioactivity of Yoghurts.* Czech Journal of Food Sciences, 2004: p. 204-214.
68. Gunde-Cimerman, N., *Medicinal Value of the Genus Pleurotus (fr.) P. Karst. (Agaricales s. l., Basidiomycetes).* International Journal of Medicinal Mushrooms, 1999. **1**: p. 69-80.
69. Gunde-Cimerman, N. and A. Plemenitaš, *Hypocholesterolaemic Activity of the Genus Pleurotus (Jeacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricales s. l., Basidiomycetes).* International Journal of Medicinal Mushrooms, 2001. **3**: p. 395-397.
70. Wang, H., J. Gao, and T.B. Ng, *A New Lectin with Highly Potent Antihepatoma and Antisarcoma Activities from the Oyster Mushroom Pleurotus ostreatus.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. **275**(3): p. 810-816.
71. Wilcoxen, S., *Cold Spike Methode for EIA Analysis*, A. Meyer, Editor. 2009, Cayman Chemical Company. p. 1-2.
72. Schlie, S., et al., *Three-Dimensional Cell Growth on Structures Fabricated from ORMOCER by Two-Photon Polymerization Technique.* Journal of Biomaterials Applications, 2007. **22**(3): p. 275-287.
73. *Wiley Registry of Mass Spectral Data, with NIST 2008, 8th Edition*. 2008, John Wiley & Sons.
74. Jork, H., *Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden : Band 1b: Physikalische und chemische Nachweismethoden: Aktivierungsreaktionen, Reagenzfolgen, Reagenzien II*. 1993, Weinheim u.a.: VCH.
75. Stansbury, H.A., *The Formation of Ergostatetraene-B During the Acetylation of Ergosterol.* Journal of the American Chemical Society, 1943. **65**(6): p. 1243.

76. Becker, H.G.O., *Organikum : organisch-chemisches Grundpraktikum ; mit 220 Tabellen und einem Faltblatt*. 20., bearb. und erw. Aufl. ed. 1996, Heidelberg u.a.: Barth. XX, 793 S.
77. Cushley, R.J. and J.D. Filipenko, *13C Fourier Transform n.m.r. XIII - Reassingment of the ^{13}C Spectrum of Ergosterol.* Organic Magnetic Resonance, 1976. **8**: p. 308-309.
78. Zürcher, A., et al., *Über Umwandlungen in den Ringen B, C und D des Ergosterins.* Helvetica Chimica Acta, 1954. **37**(5): p. 1562-1579.
79. Blau, K.H.F. and G.S. King, *Handbook of derivatives for chromatography*. 1978, London ;Philadelphia: Heyden. xvi, 576.
80. J.-F. Rontani, C.A., *Electron ionization mass spectral fragmentation of derivatized 4,5- and 5,6-epoxysterols.* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(9): p. 955-959.
81. Sprecher, E., *Über die Guttation bei Pilzen.* Planta, 1959. **53**(6): p. 565-574.
82. Rühl, M., *Ergosterol extraction*. 2008, Rühl, Martin: Göttingen. p. 1.
83. Cosceeva, O., *Isolierung und Charakterisierung von Triterpenen aus Agrocybe aegerita und Bestimmung deren bioaktiven Potenzials*, in *Institut für Lebensmittelchemie*. 2009, Technische Universität Braunschweig: Braunschweig. p. 112.
84. Budzikiewicz, H., C. Djerassi, and D.H. Williams, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*. Vol. II - Steroids, terpenoids, sugars and miscellaneous classes. 1964, San Francisco: Holden Day.
85. Nieto, I.J. and A.C. Chegwin, *Triterpenoids And Fatty Acids Identified In The Edible Mushroom Pleurotus sajor-cajú.* Journal of the Chilean Chemical Society, 2008. **53**(2): p. 1515-1517.
86. Niedermeyer, T.H.J., et al., *Antiviral Terpenoid Constituents of Ganoderma pfeifferi.* Journal of Natural Products, 2005. **68**(12): p. 1728-1731.
87. Debieu, D., et al., *Ergosterol biosynthesis and its inhibition by fenpropimorph in Fusarium species.* Phytochemistry, 1992. **31**(4): p. 1223-1233.
88. Schiller, H., *Massenspektren von Sterinderivaten.* Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1973. **75**(3): p. 145-150.
89. Baloch, R.I., et al., *Inhibition of ergosterol biosynthesis in saccharomyces cerevisiae and Ustilago maydis by tridemorph, fenpropimorph and fenpropidin.* Phytochemistry, 1984. **23**(10): p. 2219-2226.
90. Zaretskii, Z.e., *Mass Spectrometry of Steroids*. 1976, New York: John Wiley & Sons.
91. González, A.G., et al., *Espectrometria de Masas de Esteroides de Origen Natural y Sintetico.* Revista latinoamericana de quimica, 1984. **15**(3-4): p. 107-110.
92. Itoh, T., D. Sica, and C. Djerassi, *Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates. Part 35. Isolation and Structure Elucidation of Seventy-four Sterols from the Sponge Axinella cannabina.* Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1983(1): p. 147-153.
93. Hill, R.A., et al., eds. *Dictionary of Steroids*. 1 ed. 1991, Chapman & Hall: London.
94. Yaoita, Y., et al., *New sterols from two edible mushrooms, Pleurotus eryngii and Panellus serotinus.* Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2002. **50**(4): p. 551-553.
95. Ramos, S.S., et al., *Mass spectrometric analysis of epimeric 3α/3β functionalized steroids.* ARKIVOC, 2007. **14**: p. 163-171.
96. Zhan, Z.-J., et al., *Steroids from the Fungus Pleurotus ostreatus.* Acta Botanica Sinica, 2003. **45**(6): p. 753-756.
97. Berthod, A., *Band broadening inside the chromatographic column: The interest of a liquid stationary phase.* Journal of Chromatography A, 2006. **1126**(1-2): p. 347-356.
98. Köhler, N. and P. Winterhalter, *Altbekanntes Trennprinzip - neue Möglichkeiten.* Nachrichten aus der Chemie, 2005. **53**: p. 478-481.
99. Conrad, M.L., et al., *Natural product isolation using high speed counter current chromatography.* Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2004. **227**: p. U605-U605.
100. Marston, A., C. Borel, and K. Hostettmann, *Separation of natural products by centrifugal partition chromatography.* Journal of Chromatography, 1988. **450**(1): p. 91-99.
101. Kubo, I., *Recent Examples of Natural Products Isolation by Countercurrent Chromatographic Methods.* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 1992. **15**(15): p. 2843 - 2855.
102. de Paiva, S.B., M.R. Figueiredo, and M.A.C. Kaplan, *Isolation of secondary metabolites from roots of Plumbago auriculata Lam. by countercurrent chromatography.* Phytochemical Analysis, 2005. **16**(4): p. 278-281.
103. Murayama, W., et al., *Preparative Separation of Unsaturated Fatty Acids Esters by Centrifugal Partition Chromatography (CPC).* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 1988. **11**(1): p. 283-300.

104. Cole, R.J. and M.A. Schweikert, *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*. Vol. 2. 2003, San Diego: Academic Press (Elsevier Science).
105. Giera, M. and F. Bracher, *First Total Synthesis of Ergosta-5,8-dien-3β-ol.* Scientia Pharmaceutica, 2008. **76**(4): p. 599-604.
106. Weete, J.D., *Structure and Function of Sterols in Fungi.* Advances in Lipid Research, 1989. **23**: p. 115-167.
107. Lee, J.H., et al., *Human Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase (hACAT) Inhibitory Activities of Triterpenoids from Roots of Glycine max (L.) Merr.* Bulletin of the Korean Chemical Society, 2008. **29**(3): p. 615-619.
108. Nes, D.W., S. Xu, and W.F. Haddon, *Evidence for similarities and differences in the biosynthesis of fungal sterols.* Steroids, 1989. **53**(3-5): p. 533-558.
109. Atherton, L., J.M. Duncan, and S. Safe, *Isolation and Biosynthesis of Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol from Mucor rouxii.* Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1972: p. 882-883.
110. Delseth, C., Y. Kashman, and C. Djerassi, *Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3β-ol and its 24ξ-Ethyl Homolog. Two New Marine Sterols from the Red Sea Sponge Biemna fortis.* Helvetica Chimica Acta, 1979. **62**(6): p. 2037-2065.
111. Barton, D.H.R., U.M. Kempe, and D.A. Widdowson, *Investigations on the Biosynthesis of steroids and terpenoids. Part VI. The sterols of yeasts.* Journal the Chemical Society, Perkin Transactions 1, 1972: p. 513-522.
112. Cantrell, C.L., et al., *Antimycobacterial Ergosterol-5,8-endoperoxide from Ajuga remota.* Planta Medica, 1999. **65**: p. 732-734.
113. Nieto, I.J. and E.d.P. Cucaita, *Fatty Acids, Esters and Sterols of the Laccaria laccata mushroom.* Revista Colombiana de Quimica, 2007. **36**(3): p. 277-284.
114. Nieto, I.J. and M.A. Valencia, *Sterols, fatty acids and hydrocarbons of fruiting bodies of Ganoderma australe.* Boletin de la Sociedad Chilena de Quimica, 2002. **47**(4): p. 511-516.
115. Rivera, A., et al., *Dehydroergosterol: an artifact generated during extraction of sterols from Pleurotus sajor-caju.* Revista Colombiana de Quimica, 2005. **34**(2): p. 117-125.
116. Barrero, A.F., et al., *Phycomysterols and Other Sterols from the Fungus Phycomyces blakesleeanus.* J. Nat. Prod., 1998. **61**(12): p. 1491-1496.
117. Cook, J.W., et al., *The Estrogenic Activity of some Condensed-Ring Compounds in Relation to their other Biological Activities.* Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 1934. **114**: p. 272-286.
118. Patterson, G.W., M.J. Thompson, and S.R. Dutky, *Two new sterols from Chlorella ellipsoidea.* Phytochemistry, 1974. **13**(1): p. 191-194.
119. Kawagishi, H., K. Yazawa, and E. Harada, *Bone disease treatment agents containing fungal components with osteoclastogenesis inhibitory effect*, J.K.T. Koho, Editor. 2009: Japan.
120. Xu, M.-L., et al., *Cytotoxic Constituents Isolated from the Fruit Bodies of Hypsizigus marmoreus.* Archives of Pharmacal Research, 2007. **30**(1): p. 28-33.
121. Liu, J.Y., et al., *Antifungal and new metabolites of Myrothecium sp. Z16, a fungus associated with white croaker Argyrosomus argentatus.* Journal of Applied Microbiology, 2006. **100**: p. 195-202.
122. Cole, R.J. and M.A. Schweikert, *Secondary Fungal Metabolites*. Vol. 2. 2003: Elsevier Science.
123. Lehmkuhl-Gerber, A., et al., *Triterpenes and Sterols from Ganoderma australe (Fr.). Pat. (Aphyllophoromycetidae).* International Journal of Medicinal Mushrooms, 2000. **2**(4): p. 364-373.
124. Keller, A.C., M.P. Maillard, and K. Hostettmann, *Antimicrobial Steroids From The Fungus Fomitopsis Pinicola.* Phytochemistry, 1996. **41**(4): p. 1041-1046.
125. Smania, E.d.F.A., et al., *Antifungal activity of sterols and triterpenes from Ganoderma annulare.* Fitoterapia, 2003. **74**(4): p. 375-377.
126. Mattila, P., et al., *Contents of Vitamins, Mineral Elements, and Some Phenolic Compounds in Cultivated Mushrooms.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**: p. 2343-2348.
127. Lo, K.M. and P.C.K. Cheung, *Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of Agrocybe aegerita var. alba.* Food Chemistry, 2005. **89**: p. 533-539.
128. Yang, J.-H., H.-C. Lin, and J.-L. Mau, *Antioxidant properties of several commercial mushrooms.* Food Chemistry, 2002. **77**(229-235).
129. Mau, J.L., H.C. Lin, and C.C. Chen, *Antioxidant properties of several medicinal mushrooms.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(21): p. 6072-6077.

130. Fu, H.-Y. and D.-E. Shieh, *Antioxidant and Free Radical Scavenging Activiy of Edible Mushrooms.* Journal of Food Lipids, 2002. **9**(1): p. 35-43.
131. Kim, M.-Y., et al., *Phenolic Compound Concentration and Antioxidant Activities of Edible and Medicinal Mushrooms from Korea.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(16): p. 7265-7270.
132. Dubost, N.J., B.X. Ou, and R.B. Beelman, *Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to antioxidant activity.* Food Chemistry, 2007. **105**: p. 727-735.
133. Akanmu, D., et al., *The antioxidant action of ergothioneine.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1991. **288**(1): p. 10-16.
134. *Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods – 2007*, U.S.D.o. Agriculture, Editor. 2007, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (ARS): Beltsville, Maryland, USA.
135. Li, H., et al., *New Guaianolides and Xanthine Oxidase Inhibitory Flavonols from Ajania fruticulosa.* Journal of Natural Products, 1999. **62**(7): p. 1053-1055.
136. Eisenbrand, G., *Evaluation of food supplements containing other ingredients than vitamins and minerals.* Molecular Nutrition and Food Research, 2007. **51**: p. 1300-1304.
137. Schneider, I., et al., *Lipid lowering effects of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) in human.* Nutrition Research, 2009 (submitted).
138. Valisolalao, J., B. Luu, and G. Ourisson, *Steroides cytotoxiques de polyporus versicolor.* Tetrahedron, 1983. **39**(17): p. 2779-2785.
139. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, J. *Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)*. 2009 [cited 26.05.2009]; Available from: http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs.