

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
Shrnuti	XV
1 Einleitung - Zielsetzung	1
1.1 Schwerpunkt 1: Enzymatische Synthese	1
1.2 Schwerpunkt 2: Einfluss von Flavonoiden auf die Enzyymbildung	4
1.3 Vorgehensweise und Methoden	4
2 Stand der Forschung	5
2.1 Flavonoide als kosmetisch und pharmazeutisch relevante Wirkstoffe	5
2.1.1 Vorkommen	6
2.1.2 Eigenschaften und Wirkungen	7
2.1.3 Flavonoide und die menschliche Gesundheit	9
2.1.3.1 Antioxidative Wirkung	10
2.1.3.2 Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen	13
2.1.3.3 Immunmodulatorische Wirkung	14
2.1.3.4 Antimikrobielle Wirkung	14
2.1.4 Biosynthese von Flavonoiden	15
2.1.5 Bioverfügbarkeit und Verstoffwechslung	19
2.1.6 Gewinnung von Flavonoiden und Oxyfunktionalisierung	20
2.1.6.1 Isolierung aus biologischen Materialien	20
2.1.6.2 Hydroxylierung – chemisch	20
2.1.6.3 Hydroxylierung – biotechnologisch	22
2.2 Flavonoidreiche Pflanzen – Begründung der Auswahl	23
2.2.1 <i>Aronia melanocarpa</i>	24
2.2.2 <i>Trifolium pratense</i>	24
2.2.3 <i>Bellis perennis</i>	25
2.2.4 <i>Fragaria ananassa</i>	25
2.3 Enzymatische Transformationen der <i>Agrocybe-aegerita</i> -Peroxygenase (<i>AaeAPO</i>)	25
2.3.1 <i>Agrocybe-aegerita</i> -Peroxygenase (<i>AaeAPO</i>) – Aufbau und Katalysemechanismus	26
2.3.2 <i>Agrocybe-aegerita</i> -Peroxygenase (<i>AaeAPO</i>) – Hydroxylierung / Oxygenierung	30
2.3.3 <i>Agrocybe-aegerita</i> -Peroxygenase (<i>AaeAPO</i>) – Funktion	31

3	Material und Methoden	32
3.1	Geräte und Chemikalien.....	32
3.2	Versuchsorganismen.....	32
3.3	Kulturbedien	32
3.3.1	Agar-Medien.....	32
3.3.2	Flüssigmedien.....	32
3.3.2.1	Sojabohnenmehl-Medium.....	32
3.3.2.2	Kirk-Acetat-Medium.....	32
3.4	<i>Aae</i> APO - Enzymgewinnung und Reinigung	33
3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
3.6	Bestimmung enzymatischer Aktivitäten	34
3.6.1	Laccase (Lacc, EC 1.10.3.2).....	34
3.6.2	<i>Agrocybe aegerita</i> (<i>Aae</i> APO, EC 1.11.2.1).....	34
3.6.3	Mangan-Peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13).....	35
3.7	Extraktionsmethoden	35
3.7.1	<i>Aronia melanocarpa</i>	35
3.7.1.1	Mikrowellenextraktion.....	35
3.7.1.2	Ultraschallextraktion.....	35
3.7.2	<i>Fragaria ananassa</i>	36
3.7.3	<i>Trifolium pratense</i> , <i>Bellis perennis</i>	36
3.7.4	Festphasenextraktion (SPE).....	36
3.8	Analysenmethoden.....	37
3.8.1	HPLC (<i>high performance liquid chromatography</i>).....	37
3.8.1.1	HPLC-MS (Methoden 1, 2)	37
3.8.1.2	HPLC-DAD (Methoden 3, 4)	37
3.8.1.3	Präparative HPLC-DAD	38
3.8.2	NMR	39
4	Ergebnisse und Diskussion.....	40
4.1	Enzymgewinnung	40
4.2	Enzymatische Transformationen ausgewählter Flavonoide mittels <i>Aae</i> APO.....	40
4.2.1	Orientierende Vorversuche.....	40
4.2.2	Variation der Reaktionsbedingungen der enzymatischen Transformationen	47
4.2.2.1	Variation der Enzymkonzentration bei einmaliger Wasserstoffperoxidzugabe und Durchführung von Langzeitversuchen	48
4.2.2.2	Diskontinuierliche mehrmalige Wasserstoffperoxidzugabe	51
4.2.2.3	Kontinuierliche Wasserstoffperoxidzugabe (Spritzenpumpenversuche).....	52
4.2.3	Enzymatische Versuche zu weiteren Flavonoiden	55

4.2.3.1	Enzymatische Transformation von Flavanonen.....	56
4.2.3.2	Enzymatische Transformation von Flavonen	61
4.2.3.3	Enzymatische Transformation von Flavonolen	66
4.2.3.4	Enzymatische Transformation von Isoflavonen	69
4.2.4	Strukturaufklärung.....	73
4.2.4.1	Referenzverbindungen	73
4.2.4.2	Ergebnisse der NMR-Analysen	74
4.2.5	Vergleichende Diskussion der untersuchten Substanzklassen.....	88
4.2.6	Enzymatische Transformation – Intermediäre Epoxidbildung	90
4.2.7	Enzymatische Transformation - Herkunft des Sauerstoffs	92
4.2.8	Enzymatische Transformation - Kinetik.....	93
4.3	Untersuchung flavonoidhaltiger Pflanzenextrakte.....	95
4.3.1	Extraktherstellung.....	95
4.3.1.1	Beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE).....	95
4.3.1.2	Mikrowellenextraktion.....	95
4.3.1.3	Ultraschallextraktion.....	96
4.3.2	Identifizierung der Inhaltsstoffe	96
4.3.2.1	Aroniabeeren-Extrakte.....	96
4.3.2.2	Erdbeerblätter-Extrakte.....	100
4.3.2.3	Gänseblümchen-Extrakte.....	101
4.3.2.4	Rotklee-Extrakte	103
4.4	Wirkung der polyphenolischen Phytoextrakte auf die Enzymproduktion	105
4.4.1	<i>Agrocybe aegerita</i>	105
4.4.1.1	Lösungsmiteleinfluss (Ethanol).....	108
4.4.2	<i>Bjerkandera adusta</i>	109
4.4.2.1	Lösungsmiteleinfluss (Ethanol).....	111
4.4.3	Vergleichende Diskussion der Induktionsversuche.....	112
5	Ausblick	114
6	Quellenverzeichnis	116
Anhang	135