

Abschluss zum Forschungsprojekt

„Pilzsekretome zum effizienten Ligninaufschluss“

gefördert durch die



Deutsche Bundesstiftung Umwelt

Aktenzeichen: 13199

Verfasser: Dr. H. Bouws, I. Schüttmann, Prof. Dr. H. Zorn (Technische Universität Dortmund); Dr. C. Liers, Prof. Dr. M. Hofrichter (IHI Zittau); Dr. S. Müllner, Dr. A. Wattenberg (Protagen AG, Dortmund)

Projektbeginn: 01.06.2007

Laufzeit: 12 Monate

Dortmund/Zittau 2008

1. Projektkennblatt

der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13199	Referat	32	Fördersumme	124.950,00 €
Antragstitel	Förderschwerpunkt Biotechnologie: Pilzsekretome zum effizienten Ligninaufschluss				
Stichworte	Schwerpunkt-Biotechnologie Umweltchemikalien, nachwachsende Rohstoffe, Emission, Abwasser, Wasser				
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
1 Jahr	01.06.2007	31.05.2008			
Bewilligungsempfänger	Protagen AG Otto-Hahn-Str. 15 44227 Dortmund			Tel	0231-9742-6300
				Fax	0231-9742-6301
				Projektleitung Dr. Müllner	
				Bearbeiter	
Kooperationspartner	- Internationales Hochschulinstitut (IHI) Zittau, Lehrstuhl für Umweltbiotechnologie, 02763 Zittau - Universität Dortmund, Arbeitsgruppe Technische Biochemie, 44227 Dortmund				

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

In Deutschland fallen im Rahmen der landwirtschaftlichen Produktion, der Holzverarbeitung und der Papierherstellung jährlich tausende Tonnen an Stroh- und Holzabfällen an. Diese verholzten Biomaterialien lassen sich allerdings nicht direkt verarbeiten, da die Hauptbestandteile der pflanzlichen Zellwand (Cellulose, Hemicellulosen und Lignin) ein komplexes und widerstandsfähiges, chemisch nur schwer zugängliches Netzwerk bilden. Höhere Pilze besitzen eine in der Natur einzigartige Ausstattung an extrazellulären Enzymen (das „Sekretom“), welche dieses Netzwerk unter schonenden und umweltkompatiblen Bedingungen aufzuschließen und damit die verschiedenen ökonomisch interessanten Grundbestandteile zugänglich zu machen vermag. In einem neuartigen interdisziplinären Projektansatz soll das extrazelluläre Enzymsystem zweier ausgewählter Pilze qualitativ und quantitativ untersucht werden. Um den in der Natur hocheffizient ablaufenden Kohlenstoffkreislauf abzubilden und gezielt für die biotechnische Verwertung von nachwachsenden Rohstoffen nutzbar zu machen, werden die Instrumentarien der Biologie, der Chemie und der Verfahrenstechnik kombiniert. Durch die Produktion der Schlüsselenzyme in Pilzzellkulturen wird ein „enzymatischer Werkzeugkasten“ generiert, der für die Bereitstellung von Spezialchemikalien sowie auch zur Zellstoffbleichung (Papierherstellung) und zur Produktion von Bioethanol und eingesetzt werden kann.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Jeweils ein Vertreter aus der Klasse der Basidio- (*Pleurotus sapidus*) und der Ascomyceten (*Xylaria polymorpha*) wurde submers auf Rapsstroh als alleiniger Kohlenstoffquelle kultiviert. Dabei wurden relevante, mit dem Lignocellulose-Abbau in Verbindung zu bringende, enzymatische Aktivitäten (u. a. Peroxidase-, Laccase-, Lipase-, Esterase-, Peptidase-, Xylanase- und Glucanase-Aktivität) detektiert und deren Bildung kinetisch verfolgt. Parallel dazu wurden an ausgewählten Kulturtagen die extrazellulären Enzyme über Zentrifugation/Filtration, Ultrafiltration und anschließende Präzipitation aus dem Kultursystem abgetrennt, gereinigt und konzentriert. Die Sekretome beider Pilze wurden mittels hochauflösender zweidimensionaler Gelelektrophorese, kolloidaler Coomassiefärbung und massenspektrometrischer Detektion (MALDI-TOF, ESI/MS-MS) analysiert. Die Reproduzierbarkeit der gesamten analytischen Vorgehensweise wurde durch unabhängige Doppelbestimmungen sichergestellt. Basierend auf den Resultaten der Sekretomanalysen wurden die jeweils charakteristischen Schlüsselenzyme in der zweiten Projekthälfte gezielt in Submers- oder Emerskultursystemen produziert und in zellfreien Reaktionsansätzen zum enzymatischen Aufschluss von gemahlenem Rapsstroh eingesetzt (*In-vitro*-Assay).

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Anlass und Zielsetzung	2
3. Experimentelle Vorgehensweise	4
3.1. Vorbehandlung des Substrates (Rapsstroh).....	4
3.2. Kultursysteme.....	5
3.3. Gewinnung und Anreicherung extrazellulärer Proteine	7
3.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten	8
3.5. Proteinbiochemische und massenspektrometrische Untersuchungen	9
3.5.1. 2D Gelelektrophorese	9
3.5.2. MALDI-MS/MS	9
3.5.3. LC-ESI-MS/MS.....	10
3.5.4. De-Novo Sequenzierung.....	10
3.6. Zellfreie Umsetzung von gemahlenem Rapsstroh mit Enzym-Rohextrakten	11
3.7. Zellfreier Aufschluss von gemahlenem Rapsstroh mit gereinigten Enzymen	12
4. Ergebnisse	14
4.1. Charakterisierung des verwendeten Rapsstrohs (IHI Zittau).....	14
4.2. Kulturführung und Produktion extrazellulärer Enzyme.....	15
4.2.1. <i>Pleurotus sapidus</i> (TU Dortmund).....	15
4.2.2. <i>Xylaria polymorpha</i> (IHI Zittau).....	18
4.3. Identifizierung der Schlüsselenzyme des Lignocelluloseabbaus	22
4.3.1. <i>Pleurotus sapidus</i> (TU Dortmund).....	23
4.3.2. <i>Xylaria polymorpha</i> (IHI Zittau).....	26
4.4. Zellfreie Umsetzung („in vitro“) von gemahlenem Rapsstroh (TU Dortmund).....	28
4.5. HPSEC-Analytik der freigesetzten Lignocellulosefragmente (IHI Zittau)	31
4.6. Emerskultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i>	34
5. Diskussion	36
6. Fazit	38
7. Öffentlichkeitsarbeit	39
8. Literatur	40
9. Abbildungsverzeichnis	44
10. Tabellenverzeichnis	46
11. Abkürzungen	47

12. Anhang	48
12.1. Peptiddaten (Protagon).....	48
12.2. Sequenzhomologien	53

1. Zusammenfassung

Einheitliche Kultur- und Aufarbeitungsmethoden wurden etabliert, um vergleichende Sekretomanalysen von *Pleurotus sapidus* und *Xylaria polymorpha* zu ermöglichen. Die zu unterschiedlichen Pilzklassen gehörenden Spezies sind in der Lage, in Submers-Kultur mit Rapsstroh als einziger Kohlenstoffquelle, Biomasse zu bilden. Dabei wurden relevante, mit dem Lignocellulose-Abbau in Verbindung zu bringende, enzymatische Aktivitäten detektiert und deren Bildung kinetisch verfolgt.

An ausgewählten Kulturtagen wurden extrazelluläre Proteinpräparationen mittels 2D-elektrophoretischer und massenspektrometrischer Analyse untersucht. Hochauflösende zweidimensionale Gele zur Sekretomanalyse beider Pilze wurden durch den Projektpartner Protagen entwickelt und charakteristische Proteinspots mittels massenspektrometrischer Methoden (MALDI-TOF-, Nano-LC-, ESI-MS/MS-Analysen) sequenziert. Anhand von Datenbankrecherchen wurden zahlreiche Schlüsselenzyme des Lignocelluloseabbaus identifiziert.

Sekretome beider Pilze wurden in entsprechenden Submers- und Emers-Kulturen durch die Projektpartner IHI Zittau und TU Dortmund produziert. Als Enzym-Rohextrakte in zellfreien Reaktionsansätzen (*in vitro*) wurden diese erfolgreich zur direkten Umsetzung von fein gemahlenem Rapsstroh eingesetzt, die Vorgehensweise dazu optimiert und die entstandenen Produkte analytisch erfasst (Glucosefreisetzung, HPSEC und HPLC-DAD). Die Enzym-Rohextrakte der Versuchsorganismen, Kulturüberstände von *P. sapidus* und *X. polymorpha*, setzten alkalilösliche Bruchstücke über einen weiten Molekülgrößenbereich (0,6 – 30 kDa) frei. Damit wurde eine effektive, von alternierenden Aktivitäten (oxidativ und hydrolytisch) gekennzeichnete Strategie des Lignocelluloseabbaus zellfrei eingesetzt.

Ebenso gelang der Nachweis einer enzymatischen Zerlegung von Rapsstroh mit Hilfe einer Kombination von eigenen und kommerziell erhältlichen Pilzenzymen. Das HPSEC-Elutionsprofil der gebildeten alkalilöslichen Fragmente unterscheidet sich vor allem im hoch- und mittelmolekularen Größenbereich (>200 – 7 kDa) deutlich von den Umsetzungen mit einzelnen Enzympräparaten (→ synergistischer Effekt).

2. Anlass und Zielsetzung

Höhere Pilze, Basidiomyceten und Ascomyceten, verfügen über eine Vielzahl extrazellulärer Enzyme, von denen einige in der Natur einzigartig sind und deren Gesamtheit als das „Sekretom“ bezeichnet wird. Dieses vielseitige „Enzymbesteck“ erlaubt es den Pilzen, komplexe makromolekulare Naturstoffe wie Lignocellulose (Lignin, Cellulose, Hemicellulose; Abb. 1) effektiv aufzuschließen und als Kohlenstoffquellen nutzbar zu machen.

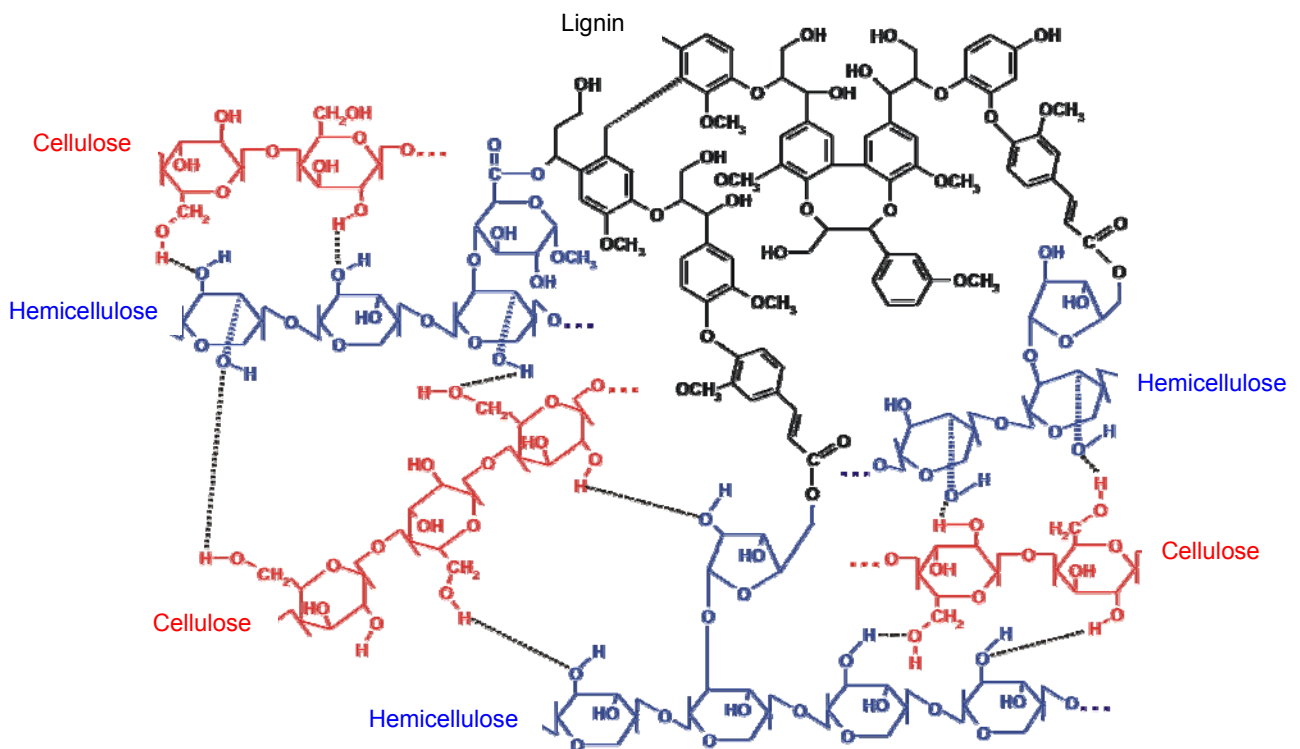


Abb. 1: Lignocellulose ist ein komplexes widerstandsfähiges Netzwerk aus Cellulosen, Hemicellulosen und Lignin

Untersuchungen zum synergistischen Zusammenwirken der einzelnen Bestandteile des Enzymbestecks der holzersetzenden Pilze *Pleurotus sapidus* (Basidiomycet; Abb. 2) und *Xylaria polymorpha* (Ascomycet; Abb. 2) sollten im vorliegenden Projekt Erkenntnisse liefern, die es zukünftig erlauben, mit Hilfe von „Enzymcocktails“ einen gerichteten biokatalytischen Aufschluss lignifizierter Materialien zu erreichen. Damit wird die Grundlage für die Entwicklung nachhaltiger und ressourcenschonender Technologien zur

stofflichen und energetischen Verwertung nachwachsender Roh- und Reststoffe geschaffen.



Abb. 2: Basidiomycet *Pleurotus sapidus* (links) und Ascomycet *Xylaria polymorpha* (rechts)

3. Experimentelle Vorgehensweise

3.1. Vorbehandlung des Substrates (Rapsstroh)

Für die Untersuchungen zum Aufschluss von Lignocellulosen durch holzbesiedelnde Pilze wurde erntefrisches Rapsstroh verwendet, welches freundlicherweise von der Agrarbetriebsgemeinschaft GbR KIESDORF-DITTERSBACH zur Verfügung gestellt wurde.

Zunächst erfolgte eine Aufarbeitung des frischen Strohschnitts durch das IHI Zittau. Die primäre Zerkleinerung wurde als Voraussetzung für weitere Verarbeitungsschritte in einer Hammermühle durchgeführt. Ziel war es, Strohpartikel mit möglichst einheitlicher Größe zu gewinnen, um später die Homogenität der Kulturmedien und damit die Vergleichbarkeit der verschiedenen Versuchsansätze zu gewährleisten. Zusätzlich wurde durch den Mahlprozess die Oberfläche des Strohs vergrößert. Dies verkürzte die Versuchsdauer und erleichterte die Zugänglichkeit der Lignocellulose während des Fermentationsprozesses.

Um unerwünschte mikrobiologische und chemische Abbaureaktionen im gemahlene Stroh während der Lagerung zu vermeiden und eine einheitliche Qualität des Ausgangsmaterials zu gewährleisten, wurde es im Trockenschrank zwei Wochen bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Danach wurde das Rapsstroh bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Außerdem wurde das aufgearbeitete Rapsstroh analog einer Standardmethode der TAPPI (*Technical Association of the Pulp and Paper Industry*, 1998) partiell charakterisiert (Ligningehalt, Anteil organolöslicher flüchtiger und nicht flüchtiger Inhaltsstoffe). Zunächst wurden organolösliche Inhaltsstoffe der Lignocellulose mit Aceton entfernt. Anschließend wurden die Polysaccharide des Rapsstrohs mit 70%iger Schwefelsäure hydrolysiert, wobei Lignin, so genanntes „Klason-Lignin“, als unlösliche Fraktion zurückblieb und gravimetrisch bestimmt wurde.

3.2. Kultursysteme

Die Bildung extrazellulärer lignocellulytischer Enzyme durch holzbesiedelnde Vertreter der Klassen Basidiomycetes (*Pleurotus sapidus*) und Ascomycetes (*Xylaria polymorpha*) wurde während des Wachstums auf Rapsstroh untersucht. Die Pilze wurden dazu submers in einem Minimalmedium kultiviert (Abb. 3). Aus Voruntersuchungen war dem Projektpartner TU Dortmund die besondere Eignung dieses Mediums bezüglich Biomassebildung und Enzymsekretion in Gegenwart lignocellulosehaltiger Substrate bekannt (Zorn *et al.*, 2005). Nach dem im Zwischenbericht angesprochenen Vergleich verschiedener Medien (Medium A, B, C und D) wurde die Kultivierung im Medium B (ohne Glucose) fortgesetzt. Die verwendeten Medien enthielten 2% fein gemahlenes Rapsstroh (Partikel \varnothing 2-4 mm) und waren wie folgt zusammengesetzt:

Medium B (für 100 mL):

MgSO ₄	0,05 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
Hefeextrakt	0,2 g
Spurenelementlösung	0,1 mL
Rapsstroh (gemahlen)	2,0 g

Zusammensetzung der Spurenelementlösung:

FeCl ₃ × 6 H ₂ O	0,08 g L ⁻¹
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,09 g L ⁻¹
MnSO ₄ × H ₂ O	0,03 g L ⁻¹
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,005 g L ⁻¹
EDTA	0,4 g L ⁻¹

Eine ausreichende Biomasse- und Enzymsekretion durch die Pilzstämmen ist die entscheidende Voraussetzung für einen optimalen enzymatischen Aufschluss des Substrates. Aus diesem Grund wurde das Kulturmedium in Vorversuchen in seiner Zusammensetzung variiert. In Medium B bildete Rapsstroh die einzige Kohlenstoffquelle.

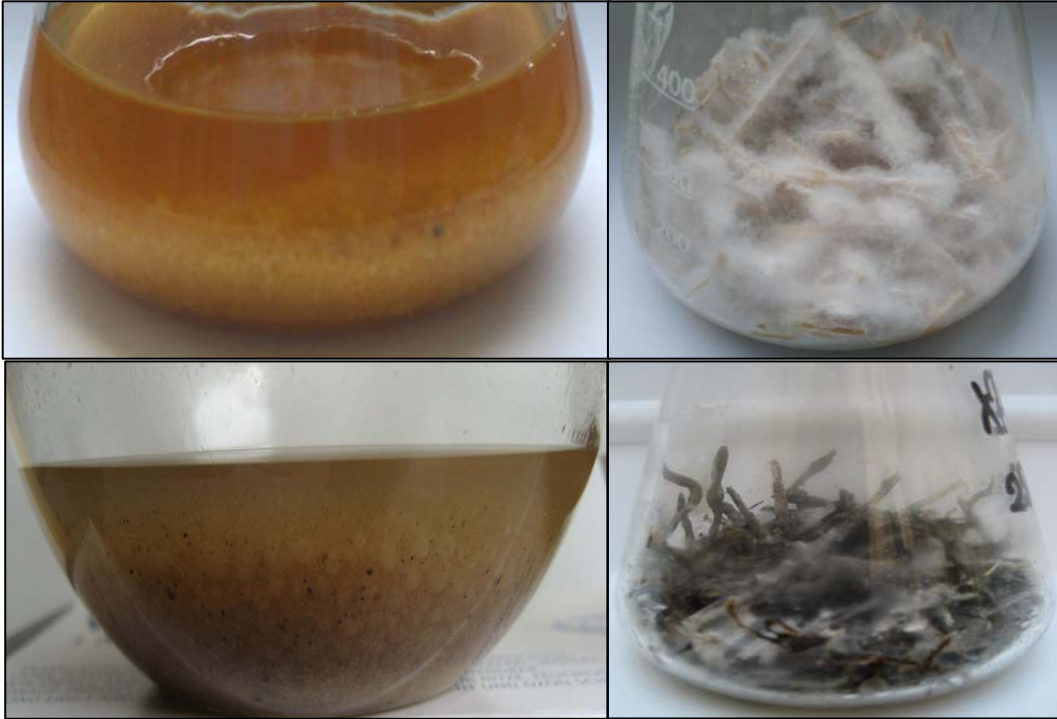


Abb. 3: Kultivierung von *P. sapidus* (oben) und *X. polymorpha* (unten) auf Rapsstroh als einzige Kohlenstoffquelle (links submers, rechts emers)

Die Flüssigmedien (100 mL) wurden jeweils mit 10 mL Pilzhomogenisat inokuliert und bei 24 °C und 150 rpm geschüttelt. In Abhängigkeit von der Entwicklung der Pilzbiomasse wurden im Abstand von zwei bis drei Tagen Proben entnommen (1 - 2 mL), um den pH-Wert und die Enzymaktivitäten zu bestimmen. Für jedes Medium wurden Doppelansätze untersucht.

Für die Emerskulturen wurden 40 g geschnittenes Stroh (steril) mit 60 mL Wasser und 40 mL Pilzhomogenisat inokuliert und bei 24 °C im Dunklen inkubiert. Es wurden ebenfalls Doppelansätze untersucht.

3.3. Gewinnung und Anreicherung extrazellulärer Proteine

Die Fermentation des Rapsstrohs durch die beiden holzzeretzenden Pilze erfolgte in den o.g. Flüssigmedien und war Voraussetzung für die Gewinnung der extrazellulären Enzyme für die anschließende Sekretomanalytik. Die Ernte des enzymhaltigen Kulturüberstandes erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten (jeweils in Doppelbestimmung). In Abständen von drei bzw. sechs Tagen (*X. polymorpha*: Kulturtag 6, 12, 15, 18; *P. sapidus*: Kulturtag 2, 6, 9, 12) wurden jeweils zwei Kolben des entsprechenden Mediums geerntet. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen (Medium ohne Pilz) von jedem Medium mitgeführt und untersucht. Die Pilzbiomasse wurde durch Filtration (Glasfaserfilter GF6, WHATMAN) bzw. Zentrifugation vom enzymhaltigen Kulturüberstand abgetrennt. Durch Ultrafiltration (Pall-Filtron® bzw. Amicon Ultra-15, Millipore) wurde das Kulturfiltrat anschließend unter Verwendung einer 10 kDa-Membran konzentriert und zur Entsalzung gewaschen. Nach einer Proteinpräzipitation (Wessel und Flügge, 1984) wurden die Proteine in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, getrocknet und bei -20°C gelagert (Abb. 4).

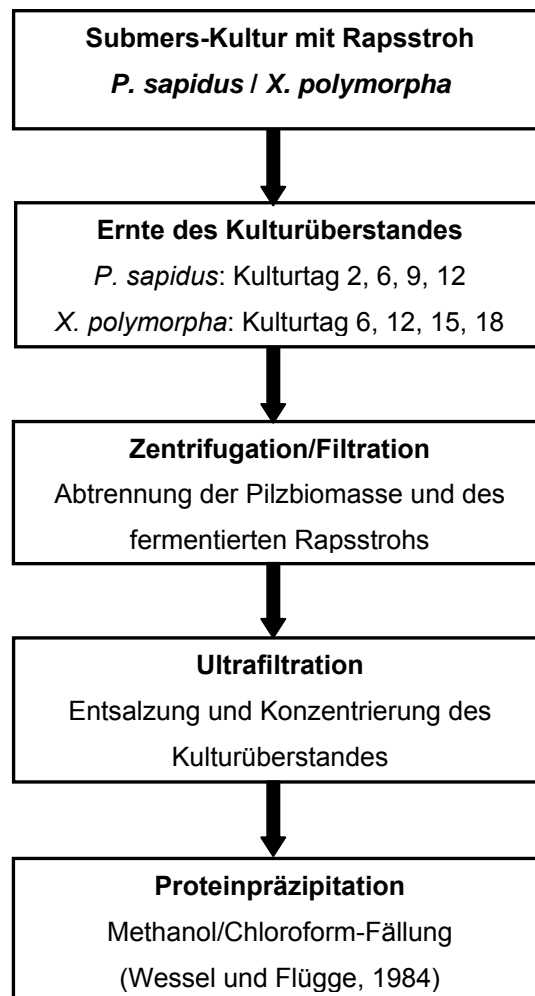


Abb. 4: Vorgehensweise zur Gewinnung und Anreicherung extrazellulärer Proteine aus Submers-Kulturen

Die quantitative Bestimmung der Proteinmengen erfolgte mittels Bradford-Assay (Bradford, 1976); am IHI Zittau wurde eine modifizierte Methode nach Bradford in 96-Loch-Mikrotiterplatten eingesetzt (Zor und Selinger, 1996).

Die Aufarbeitung der Emerskulturen erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten jeweils in Doppelbestimmung. In Abständen von zwei Wochen (*P. sapidus*: Kulturwoche 2, 4, 6, 8;) wurden jeweils zwei Kolben geerntet. Hierzu wurden den Kulturen 250 mL Wasser zugefügt und 1 Stunde bei 24 °C inkubiert. Die Überstände wurden analog der Submerskulturen weiterverarbeitet.

3.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Kulturbegleitend wurden verschiedene Enzymassays durchgeführt, wobei hydrolytische und oxidative Aktivitäten erfasst wurden (Tab. 1).

Tab. 1: Zusammenfassung der verwendeten Enzymassays

Enzym	Substrat	Produkt	Literatur
Laccase	ABTS	ABTS-Radikalkation	Bourbonnais und Paice, 1990
Peroxidase	ABTS/H ₂ O ₂	ABTS-Radikalkation	Eggert <i>et al.</i> , 1996
Lipase	Tween 80	Fettsäure	Linke <i>et al.</i> , 2005
Esterase	<i>p</i> -Nitrophenylacetat	<i>p</i> -Nitrophenol	Purdy und Kolattukudy, 1973
Peptidase	Azocasein	Säurelöslicher Azofarbstoff	Kilcawley <i>et al.</i> , 2002
Cellulase	Hydroxyethylcellulose	Cellobiose und Glucose	Bailey und Nevalainen, 1981
Xylanase	Xylan	Xylobiose und Xylose	Bailey und Nevalainen, 1991
β -Glucosidase	<i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-pyranosid	<i>p</i> -Nitrophenol	Herr, 1979

Aufgrund fehlender Aktivitäten wurde bei *X. polymorpha* kein Peroxidasetest durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Assays findet sich im Zwischenbericht.

3.5. Proteinbiochemische und massenspektrometrische Untersuchungen

3.5.1. 2D Gelelektrophorese

Die gefällten Überstände der Submers-Kulturen wurden mittels Ultraschall in Gegenwart von Proteaseinhibitoren und CHAPS gelöst. Zur isoelektrischen Fokussierung (erste Dimension) wurden Harnstoff und Thioharnstoff in Endkonzentration von 7 M bzw. 2 M zugesetzt und die Proteine durch Zugabe von 65 mM DTT reduziert. Das Homogenat wurde für 30 min zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Untersuchungen abgenommen.

Die Proteinmenge wurde vor dem Auftragen nach Popov bestimmt (Popov *et al.*, 1975). Anschließend wurden die Proben mit 2% Ampholyten versetzt.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgt nach einem modifizierten Protokoll (Klose, 1999 modifiziert) unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen (NEPHGE) (Weingarten *et al.*, 2005) unter Verwendung von 20 cm Röhrchengelen.

Nach Abbruch der Fokussierung wurden die IEF Gele auf SDS Gele (15% Arcylamid) der Dimension 250 x 200 mm² gelegt und anschließend nach ihrem apparenten Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Detektion der getrennten Proteinspots diente eine Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988).

Nach dem Ausstechen der Proteinspots wurden die Gelstücke gewaschen und mit Trypsin versetzt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Peptide mit 0.1% TFA extrahiert.

3.5.2. MALDI-MS/MS

Die Peptide wurden über eine Umkehrphasensäule gereinigt, bevor sie auf ein MALDI Target aufgegeben wurden. Als Matrix diente α -Cyanohydroxymizimsäure. Die Messung erfolgte mittels Ultraflex III TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik). Für Peptid-Massen-Fingerabdruckspektren (PMF, MS) wurden 200 Einzelspektren aufsummiert. Die Signale im Spektrum wurden mittels des SNAP Algorithmus detektiert. Die resultierenden Massenlisten wurden in der Proteinscape™ Datenbank gespeichert und ausgewertet. Peptid-Fragmentierungs-Fingerabdruckspektren (PFF, MS/MS) wurden von denjenigen Signalen aufgenommen, bei denen dies technisch machbar war.

Die Proteinidentifizierung wurde über eine Suche der Spektren gegen die NCBI Proteindatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vorgenommen. Hierzu wurden mehrere externe Suchalgorithmen verwendet (ProFound™, Mascot™, Sequest™).

3.5.3. LC-ESI-MS/MS

Die chromatographische Trennung der Peptide erfolgte mittels „Ultimate 3000 nano-HPLC“ (Dionex), die an ein Microtof-Q Hybrid-Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (Bruker Daltonik) gekoppelt war. Die Separation erfolgte in einem Wasser-Acetonitril-TFA Gradienten mit einer C18-Säule und 150 nL min^{-1} Flussrate. Die eluierenden Peptide wurden bei niedrigenergie-kollisionsinduzierten Bedingungen unter Verwendung von Argon als Kollisionsgas fragmentiert. Die erhaltenen Datensätze wurden mit der Software „DataAnalysis“ prozessiert und die resultierenden Massenlisten in der Proteinscape™ Datenbank gespeichert und ausgewertet. Zur Proteinidentifizierung diente eine Suche der Spektren gegen die NCBI Proteindatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hierzu wurden mehrere externe Suchalgorithmen verwendet (ProFound™, Mascot™, Sequest™).

3.5.4. *de novo*-Sequenzierung

Da die Mehrzahl der Pilzproteine nicht in Datenbanken vorhanden ist, wurden die gesamten Datensätze auch über *de novo*-Sequenzierung der PFF Datensätze ausgewertet. Hierzu wurde die Software „Peaks Studio“ (Bioinformatics Solutions Inc.) verwendet.

3.6. Zellfreie Umsetzung (*in vitro*) von gemahlenem Rapsstroh mit Enzym-Rohextrakten

Die Enzym-Rohextrakte beider Pilze wurden für die Untersuchungen zum zellfreien Aufschluss (*in vitro*) von fein gemahlenem Rapsstrohmehl verwendet. Analytisch begleitet wurden diese *In-vitro*-Umsetzungen durch die TU Dortmund und das IHI Zittau. Zur Bestimmung des Aufschlussgrades wurde reaktionsbegleitend eine Glucosebestimmung (Hexokinase-Assay, Slein *et al.* 1963) durchgeführt. Die Freisetzung alkalilöslicher Lignin- und Lignocellulose-Fragmente aus dem Stroh wurde anhand spezieller chromatographischer Methoden (HPSEC = *high performance size exclusion chromatography*, HPLC-DAD = *high performance liquid chromatography – diode array detection*) am IHI Zittau untersucht.

Um die Zugänglichkeit der Lignocellulose während der Fermentation durch die extrazellulären Enzyme gewährleisten zu können, wurde das Rapsstroh entsprechend vorbereitet. Zunächst wurde das grob zerkleinerte Stroh am IHI Zittau gemahlen. Die so erhaltene Strohfraktion wurde dann 24 Stunden bei 60 °C getrocknet, anschließend in einer Kugelmühle 72 Stunden zu einem feinen Pulver vermahlen und mit 500 mL Wasser pro Gramm Stroh gewaschen. Mikroskopisch wurde eine durchschnittliche Teilchengröße des Strohpulvers von ca. 8 - 10 µm bestimmt.

Enzymhaltige Kulturüberstände wurden den Submers-Kulturen der Tage 2, 6, 9 und 12 entnommen.

Jeder Ansatz des *In-vitro*-Assays enthielt 150 mg Stroh (Nassgewicht), 1,5 mL Kulturüberstand, 2 mM Wasserstoffperoxid und 3 µL eines Proteaseinhibitorcocktails (50 mM AEBSF (Applichem), 0,5 mM Pepstatin A (Applichem), 0,5 mM E-64 (Sigma-Aldrich), 500 mM 1,10-Phenanthrolin (Sigma-Aldrich), um endogenen peptidolytischen Verdau zu unterbinden. Die Inkubation erfolgte bei 900 rpm im Inkubationsschüttler (Eppendorf). Bei den dynamischen Abbaustrategien wurde der Austausch der Überstände jeweils nach 24 Stunden durchgeführt. Hierzu wurde die Hälfte (750 µL) des Überstandes als Probe entnommen, 10 Minuten auf 100 °C erhitzt, um Restaktivitäten zu inaktivieren und anschließend analysiert. Zum verbleibenden Reaktionsansatz wurden 750 µL des nächsten Kulturüberstandes (2fach konzentriert), 2 mM Wasserstoffperoxid, sowie ein Aliquot des Proteaseinhibitor-Cocktails (V = 3 µL) hinzugefügt und für weitere 24 Stunden inkubiert. Als Blindwerte wurden hitzeinaktivierte Kulturüberstände mit 2 mM Wasserstoffperoxid und Proteaseinhibitor benutzt. Alle *In-vitro*-Reaktionsansätze wurden insgesamt vier Tage durchgeführt.

Der Reaktionsansatz für die HPSEC-Analytik enthielt 100 mg fein gemahlene Rapsstroh und wurde mit 10 mL der enzymhaltigen Kulturflüssigkeit des jeweiligen Pilzes 12 Stunden auf einem Magnetrührer bei 24 °C inkubiert. Danach wurde der Enzym-Rohextrakt durch den des darauf folgenden Kultur- bzw. Erntetages ersetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze, die entweder mit denaturierter Kulturflüssigkeit (30 min bei 95 °C) oder Wasser inkubiert wurden. Nach einer Gesamtreaktionszeit von 48 h wurde der Überstand durch Zentrifugation abgetrennt und das verbliebene Rapsstroh-Pellet mehrmals gewaschen. Danach wurden die alkalilöslichen Lignocellulose-Fragmente mit 0,1 M NaOH 10 min im Ultraschallbad extrahiert und mittels HPSEC analysiert (Hofrichter *et al.* 2001).

3.7. Zellfreier Aufschluss von gemahlenem Rapsstroh mit gereinigten Enzymen

Um die synergistische Wirkung kombinierter Enzympräparate bezüglich der biokatalytischen Umsetzung von Rapsstroh zu untersuchen, wurde zunächst auf kommerziell erhältliche Pilzenzyme zurückgegriffen. Der Reaktionsansatz (10 mL) mit kombinierten Enzymen war wie folgt zusammengesetzt:

fein gemahlene Rapsstroh	100	mg
Natriummalonatpuffer (pH 4,5)	100	mM
MnCl ₂	1	mM
Tween 80	0,5	%
Mangan-Peroxidase (<i>Nematoloma frowardii</i> , JenaBios)	5	U ml ⁻¹
Laccase (<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> , JenaBios)	5	U ml ⁻¹
Cellulase (<i>Penicillium janthinellum</i> , JenaBios/ FH Lausitz)	5	U ml ⁻¹
Xylanase (<i>Trichoderma reesei</i> , Sigma-Aldrich)	5	U ml ⁻¹
Esterase (<i>Mucor miehei</i> , Sigma-Aldrich)	5	U ml ⁻¹
H ₂ O ₂	630	mM

Zum Zweck der Vergleichbarkeit wurden jeweils Reaktionen mit den einzelnen Enzymen unter identischen Bedingungen durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Enzyme gestartet und frisches Enzym (5 U mL⁻¹) fünfmal im Abstand von 12 h nachdosiert. Zum Reaktionsansatz mit kombinierten Enzymen und mit Mangan-Peroxidase (Hofrichter *et al.* 1999) wurde H₂O₂ (6,3 M Stammlösung; 10 µL h⁻¹) mittels einer Dosierpumpe über den gesamten Versuchszeitraum hinweg zudosiert.

Die Kontrollen enthielten Enzyme, die zuvor 30 min bei 95 °C denaturiert wurden. Nach 72 Stunden Inkubation bei 24 °C wurden die Ansätze zentrifugiert ($16.100 \times g$). Das fermentierte Strohpellet wurde zweimal mit dest. Wasser gewaschen und anschließend mit 0,1 M NaOH 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Freigesetzte alkalilösliche Lignin- und Lignocellulose-Fragmente wurden mittels HPSEC analysiert.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung des verwendeten Rapsstrohs (IHI Zittau)

Das als Substrat eingesetzte Rapsstroh wies bezüglich der organolöslichen Inhaltsstoffe (7,4%) und des säureunlöslichen Gehaltes an polymeren Bestandteilen (11,8%) eine für Süßgräser (*Poaceae*) typische Zusammensetzung auf (Tab. 2). Die Parameter können in Abhängigkeit von Herkunft oder Alter der Pflanze variieren.

Tab. 2: Charakterisierung des Rapsstrohs und Vergleich mit Literaturangaben

(* Valmaseda *et al.*, 1991; ** Pan *et al.*, 2005)

Parameter	Weizenstroh*	Reisstroh**	Rapsstroh
säureunlösliche Polymere (Klason-Lignin)	15,2 – 16,5 %	12,4 (± 0,3) %	11,8 %
säurelösliche Polymere (Polysaccharide, lösliches Lignin)	2,5 (± 0,2) %	6,1 (± 0,3) %	< 3%
organolösliche flüchtige Inhaltsstoffe	5,3 – 9,3 %	3,1 (± 0,1) %	5,7 %
organolösliche nicht-flüchtige Inhaltsstoffe			1,7 %
Trockenmasse	-	-	92,5 %
Fettgehalt	-	-	2,7 %

4.2. Kulturführung und Produktion extrazellulärer Enzyme

4.2.1. *Pleurotus sapidus* (TU Dortmund)

Bei jeder Kultivierung von *P. sapidus* wurden die o.g. Enzymassays durchgeführt. Alle Aktivitätsmessungen wurden als Mehrfachbestimmungen von mindestens zwei unabhängigen biologischen Proben vorgenommen.

Bereits nach zwei Kulturtagen waren hohe Laccaseaktivitäten zu detektieren, wobei im Kulturverlauf zwei weitere Maxima auftraten (Abb. 5). Für die dritte Kultivierungsreihe wurden die Bedingungen des Peroxidase-Assays (0,1 M Natriumtetratpuffer pH 3,0 und Inkubationstemperatur 50 °C) optimiert. Unter den neu festgelegten Reaktionsbedingungen wurde ein deutliches Maximum der Peroxidase-Aktivität nach neun Kulturtagen und keine weitere Aktivität im späteren Kulturverlauf detektiert (Abb. 5).

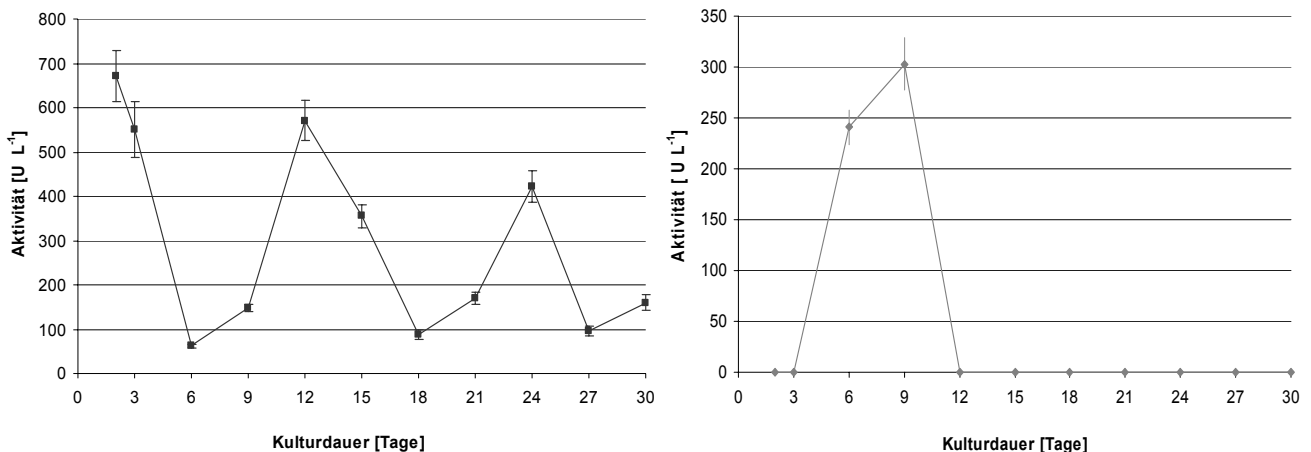


Abb. 5: Laccase- (links) und Peroxidase-Aktivitäten (rechts) in Kulturüberständen von *P. sapidus* innerhalb einer Kultivierungszeit von 30 Tagen

Eine signifikante Sekretion extrazellulärer Lipasen setzte ab dem 3. Kulturtag ein, wobei zwei Maxima von $>300 \text{ U L}^{-1}$ beobachtet wurden (Abb. 6). Die gemessene Esterase-Aktivität zeigte ein Maximum von $>300 \text{ U L}^{-1}$ am neunten Kulturtag. Im weiteren Verlauf sank die Aktivität kontinuierlich ab (Abb. 6).

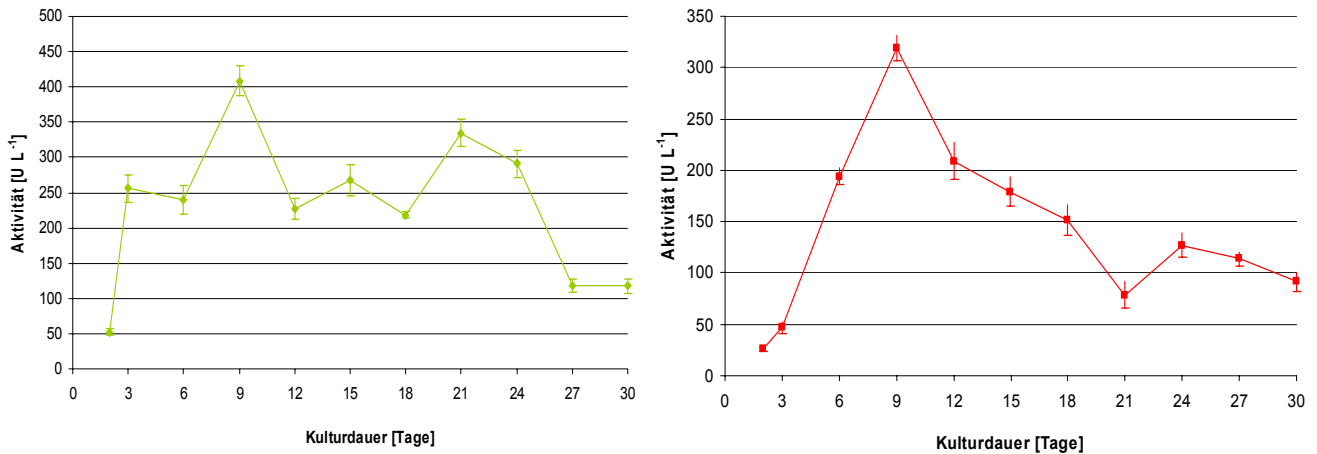


Abb. 6: Lipase- (links) und Esterase-Aktivitäten (rechts) im Kulturüberstand von *P. sapidus* innerhalb einer Kultivierungszeit von 30 Tagen

Xylanase- und Glucanase-Aktivitäten wurden im Überstand kontinuierlich nachgewiesen. Die Aktivitäten beider Enzyme waren nach einem initialen Maximum nach sechs Tagen über die gesamte Kulturdauer hinweg nahezu konstant (Abb. 7).

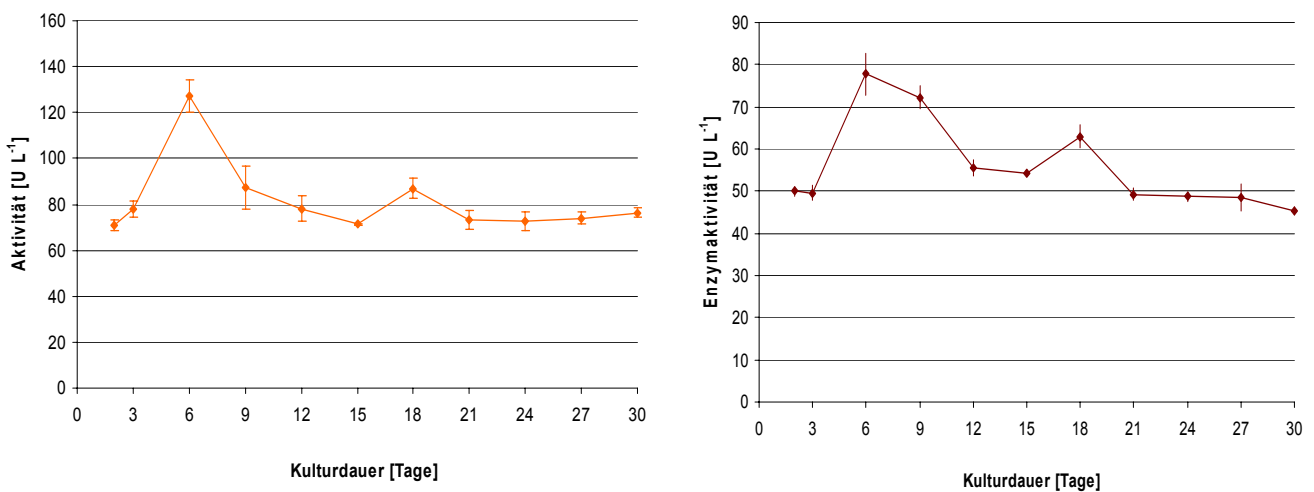


Abb. 7: Xylanase- (links) und Glucanase-Aktivitäten (rechts) im Kulturüberstand von *P. sapidus* innerhalb einer Kultivierungszeit von 30 Tagen

Kulturbegleitend wurde der Gesamtproteingehalt im Überstand nach Bradford ermittelt. Nach drei Tagen setzte eine verstärkte Bildung extrazellulärer Proteine ein, der Proteingehalt im Überstand erreichte nach neun Tagen Maximalwerte von $>300 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Abb. 8). Das Maximum der peptidolytischen Aktivität wurde am sechsten Kulturtag detektiert. Anschließend nahm die Aktivität kontinuierlich ab (Abb. 8).

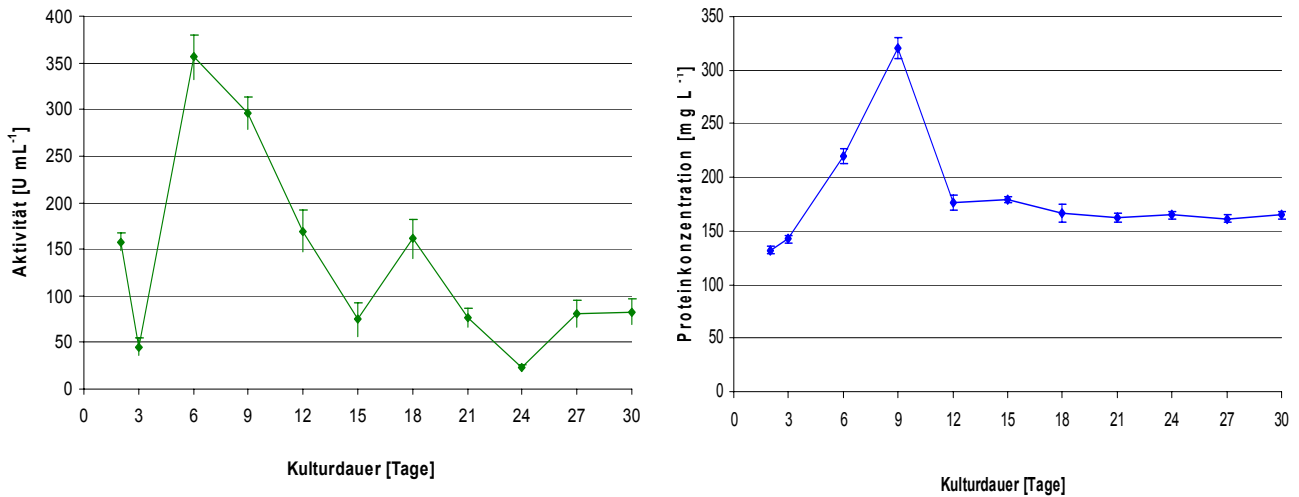


Abb. 8: Peptidase-Aktivität (links) und Proteingehalt (rechts) im Überstand von *P. sapidus*

Die o.g. Enzymaktivitäten wurden in den Kulturüberständen von *P. sapidus* in drei unabhängigen Messreihen („biologische Reproduzierbarkeit“) in jeweils zwei unabhängigen Proben in Doppelbestimmung („analytische Reproduzierbarkeit“) reproduzierbar nachgewiesen. Die relativen Aktivitäten sind in Abb. 9 zusammengefasst, wobei die maximale Aktivität eines Enzyms gleich 100% gesetzt wurde.

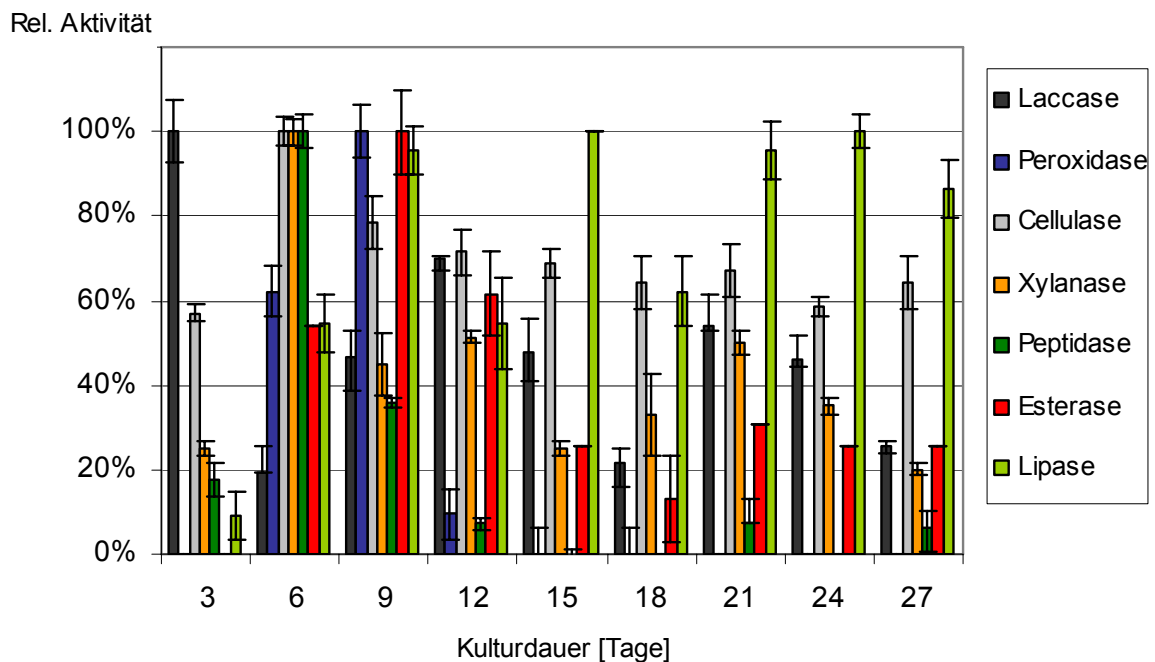


Abb. 9: Vergleich der relativen Enzymaktivitäten in Kulturüberständen von *P. sapidus*

An den Kulturtagen 2, 6, 9 und 12, an denen verschiedene Aktivitätsmaxima festgestellt wurden, wurden die Enzyme aus den Kulturüberständen auf die oben beschriebene Weise gewonnen.

Der Kulturüberstand vom Tag 2 war durch eine hohe Laccase-Aktivität charakterisiert, welche von *P. sapidus* initial sekretiert wurde. Bei den Überständen des 6. Kulturtags überwogen Glucanase- (Cellulase) und Xylanase-Aktivitäten. Das Maximum der Peroxidase-Aktivität wurde am neunten Tag detektiert. Hohe Esterase- und Lipase-Aktivitäten wurden zu diesem Zeitpunkt ebenfalls gemessen. In den Überständen vom 9. Kulturtag waren mit Ausnahme der Peptidase- und der Peroxidase-Aktivitäten vergleichsweise hohe Aktivitäten aller weiteren Enzyme vorhanden.

Ganz offensichtlich bewirkt der Basidiomycet *P. sapidus* den enzymatischen Aufschluss von Rapsstroh durch eine alternierende Sekretion oxidativer und hydrolytischer Enzym-Aktivitäten. Diese Strategie wurde in den nachfolgenden zellfreien Abbauversuchen (*In-vitro*-Tests) nachempfunden und weiter optimiert. Die Schlüsselenzyme des Lignocellulose-Aufschlusses wurden mittels 2D-Elektrophorese voneinander getrennt, massenspektrometrisch identifiziert und in großvolumigen Schüttelkolben-Kultivierungen produziert.

4.2.2. *Xylaria polymorpha* (IMI Zittau)

In der ersten Projekthälfte wurden für *X. polymorpha* während der Fermentation von Rapsstroh verschiedene extrazelluläre Oxidoreduktasen und Hydrolasen nachgewiesen und den Aktivitäten des Basidiomyceten *P. sapidus* gegenübergestellt (Tab. 3). Auch die Produktion größerer Mengen der lignocellulolytischen Biokatalysatoren gelang durch Fermentation des Rapsstrohs.

Ein Teil der gewonnenen Enzym-Rohextrakte von *X. polymorpha* wurde einer Proteinreinigung mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) unterzogen und danach partiell elektrophoretisch charakterisiert (Molekulargewichte und isoelektrische Punkte). Eine *In-vitro*-Freisetzung alkalilöslicher Lignocellulose-Fragmente wurde schließlich durch den kombinierten Einsatz eigener und kommerziell erhältlicher Enzyme nachgewiesen.

Tab.: 3: Gebildete maximale Enzymaktivitäten, die am Abbau von Rapsstroh beteiligt sind

Enzym	Maximale Enzymaktivitäten (U L ⁻¹)	
	<i>P. sapidus</i>	<i>X. polymorpha</i>
Glucanase	78	19
Xylanase	127	52
β -Glucosidase	n. b.	2
Esterase	319	22
Laccase	671	24
Peroxidase	300	-
Peptidase	35600	-
Lipase	409	-

Die Produktion lignocellulytischer Enzyme durch *X. polymorpha* wurde im 10-Liter-Bioreaktor (*submers*) und in Festsubstrat-Kulturen (*solid state fermentation*) in entsprechend großen Strohansätzen durchgeführt (Abb. 10). Mittels Festphasenfermentation konnten maximale Aktivitäten von 300 U Esterase und 35 U β -Glucosidase erreicht werden. Die *Submers*-Fermentation im Rührkesselreaktor lieferte ca. 150 U Laccase sowie 490 U β -1,4-Endoxylanase.



Abb. 10: Produktion größerer Mengen lignocellulytischer Enzyme durch *X. polymorpha* im 10-Liter-Rührkesselreaktor (links) und im Festsubstrat (200 g Strohkulturen, rechts)

Die Zielproteine wurden zunächst extrahiert bzw. von der Pilzbiomasse und dem fermentierten Rapsstroh mittels Zentrifugation und Filtration abgetrennt. Danach erfolgte die Proteinreinigung mit unterschiedlichen Methoden der FPLC (Ionenaustausch- bzw. Größenausschluss-Chromatographie, *Chromatofocussing*). Der Reinigungserfolg für die verschiedenen Enzyme von *X. polymorpha* ist in Tabelle 4 dargestellt. Ca. 30% der Laccase- (spez. Aktivität 822 U mg⁻¹) und der β -Glucosidase-Aktivität (spez. Aktivität 12 U mg⁻¹) von *X. polymorpha* blieben nach der Reinigung erhalten (Abb. 11). Dagegen erwies sich die Reinigung der Esterase als kompliziert. Hier betrug die Wiederfindungsrate der eingesetzten Enzym-Aktivitäten weniger als 1% (Moritz, 2007).

Tab. 4: Parameter zur Reinigung extrazellulärer Enzyme von *X. polymorpha*. (* produziert im Bioreaktor; # produziert in Festphasen-Kulturen)

Enzym	Reinigungsparameter				
	Proteinmenge (mg)	Aktivität (U)	spez. Aktivität (U mg ⁻¹)	Wiederfindung (%)	Reinigungs- faktor
Laccase*	0,05	45	822	31	6
Xylanase*	0,4	11	28	3	17
β -Glucosidase [#]	0,96	11	12	32	106
Esterase [#]	0,42	1	2,4	0,3	11

Die Produktion und Reinigung der Esterase von *X. polymorpha* wird derzeit am IHI Zittau weiter optimiert. Dabei soll insbesondere die präparative isoelektrische Fokussierung als eine bislang wenig genutzte, aber schonende und effektive Möglichkeit zur Proteinreinigung und -isolierung erprobt werden. Die Reinigung der Xylanase verlief ebenfalls wenig zufriedenstellend, da nur etwa 3% der Ausgangsaktivität zum Ende der Reinigung erhalten blieben. Hier liegt der Schwerpunkt weiterer Untersuchungen vor allem auf der Isolierung bzw. Fraktionierung möglicher Isoformen des Enzyms.

Die physiko-chemische Charakterisierung der isolierten und partiell gereinigten Proteine von *Xylaria polymorpha* ist in Tabelle 5 zusammengefasst.

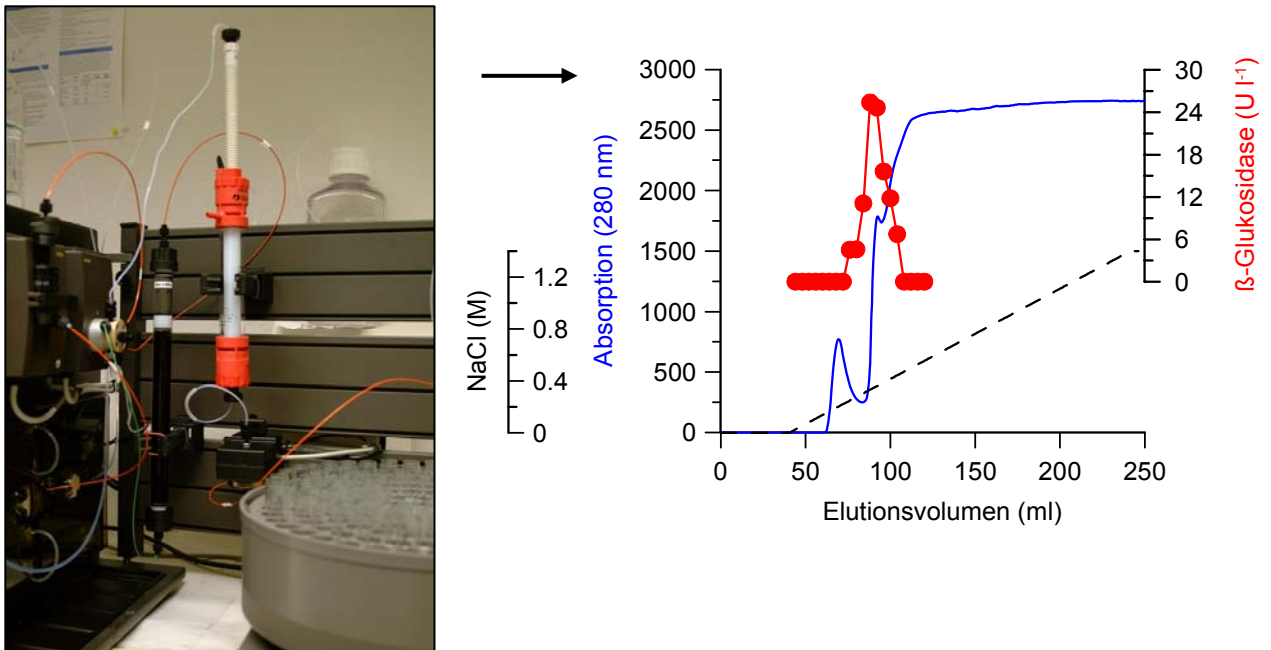


Abb. 11: Isolierung einer extrazellulären β -Glucosidase des Ascomyceten *X. polymorpha* mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* an einem schwachen Anionenaustauscher (links); Elutionsprofil des Zielproteins (rechts; rot – Enzymaktivität, blau - Gesamtprotein).

Tab. 5: Eigenschaften isolierter bzw. partiell gereinigter Enzyme von *X. polymorpha*, die während der Fermentation von Rapsstroh gebildet wurden (fett markiert – entsprechende Banden konnten bereits im eindimensionalen SDS-Gel nachgewiesen werden).

Enzym	Enzymeigenschaften	
	M_w (kDa)	pI
Laccase	67	3,1
Xylanase	33	nicht detektiert
β -Glucosidase	91	4,0 und 4,1
Esterase	45; 50; 53	nicht detektiert

Die partiell gereinigten bzw. isolierten Enzympräparate wurden mittels eindimensionaler Elektrophorese bezüglich des Molekulargewichts (M_w) und des isoelektrischen Punktes (pI) charakterisiert (Tab.5). Die Ergebnisse lassen neben Aussagen zur Reinheit des Zielproteins auch Rückschlüsse für die weiterführende Proteinanalytik und die Orientierung im entsprechenden 2D-Gel zu. Die Molekülgrößen der partiell gereinigten Proteine stimmten in den meisten Fällen mit den im SDS-Gel (Laemmli, 1970) zu Beginn des Projektes visualisierten Proteinen der konzentrierten Kulturüberstände überein (Abb. 12).

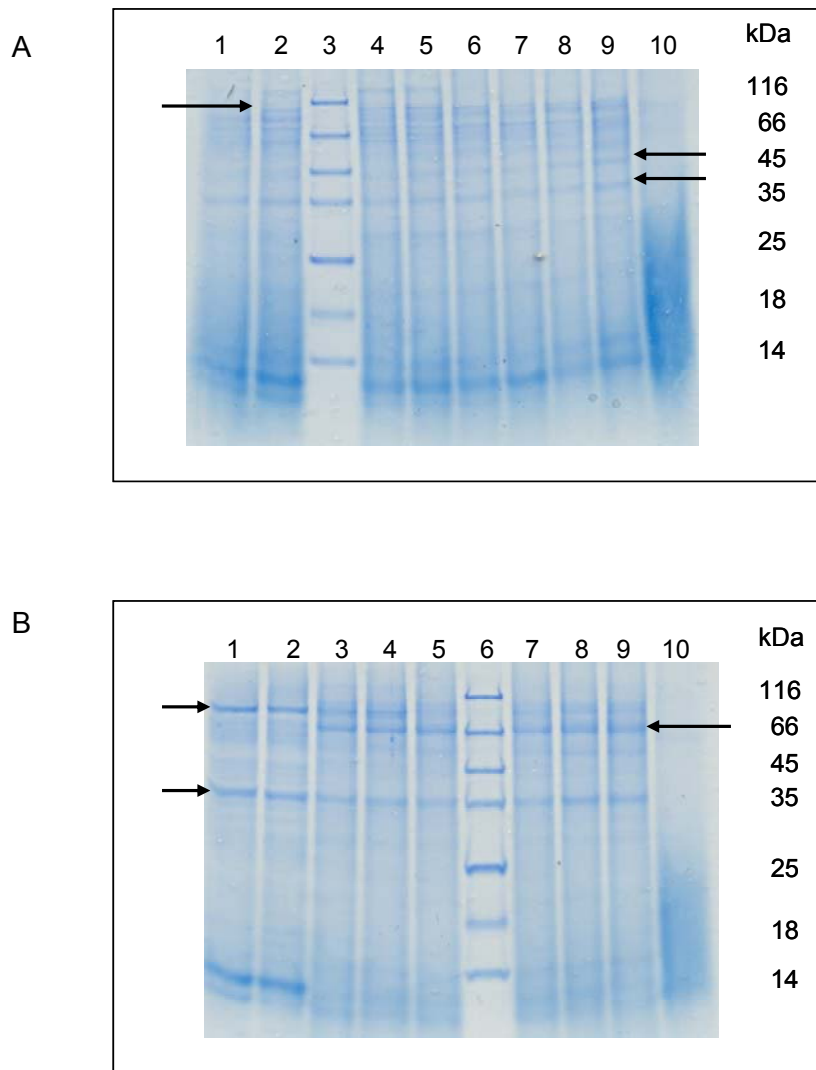


Abb. 12: Elektrophoretische Protein-Charakterisierung; SDS-PAGE der konzentrierten Kulturfiltrate von *X. polymorpha* nach der Fermentation von gemahlenem Rapsstroh im Medium A (A) und Medium B (B). Nach 6 (1, 2); 12 (3, 4); 15 (5, 6) und 18 (8, 9) Kulturtagen von links nach rechts. Molekulargewichts-Standard (6 bzw. 3), Kontrolle ohne Pilz (10). Deutlich ausgeprägte Banden sind durch Pfeile gekennzeichnet.

4.3. Identifizierung der Schlüsselenzyme des Lignocelluloseabbaus

Die proteinbiochemischen und massenspektrometrischen Untersuchungen wurden vom Projektpartner Protagen AG durchgeführt. Die Sekretome beider Pilze wurden mittels hochauflösender zweidimensionaler Gelelektrophorese, kolloidaler Coomassiefärbung und massenspektrometrischer Detektion analysiert. Zur eindeutigen Identifizierung der Proteine dienen sowohl MALDI-TOF- als auch ESI/MS-MS-Analysen. Die Reproduzierbarkeit der gesamten analytischen Vorgehensweise wurde durch unabhängige biologische und analytische Mehrfachbestimmungen sichergestellt.

4.3.1. *Pleurotus sapidus* (TU Dortmund)

Die präparierten Proteine der Kulturüberstände von *P. sapidus* vom 6., 9. und 12. Kulturtag wurden 2D-elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 13).

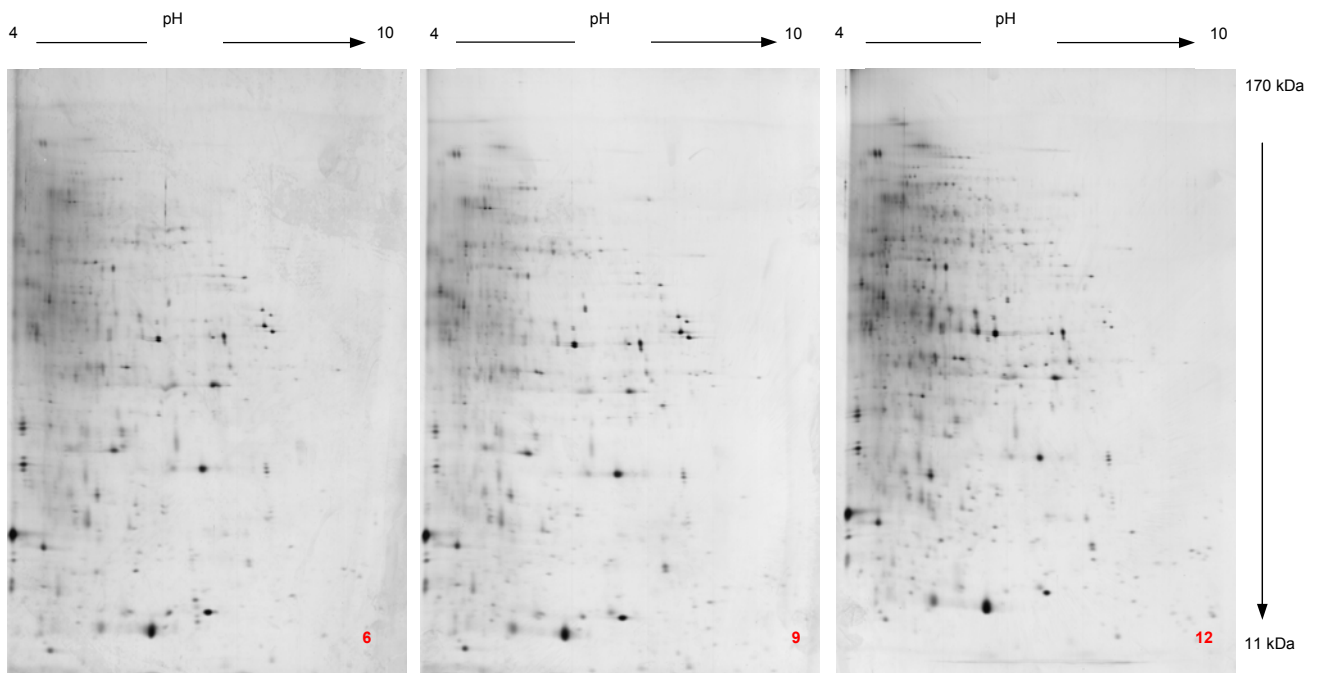


Abb. 13: 2D-elektrophoretische Darstellung sekretierter Proteine von *P. sapidus* der Kulturtage 6 (links), 9 (Mitte) und 12 (rechts)

Die Gele belegten eine hohe Reproduzierbarkeit der Proteintrennung. Vom Überstand des neunten Kulturtages wurden insgesamt 30 Spots ausgewählt und diese massenspektrometrisch analysiert (Abb. 14).

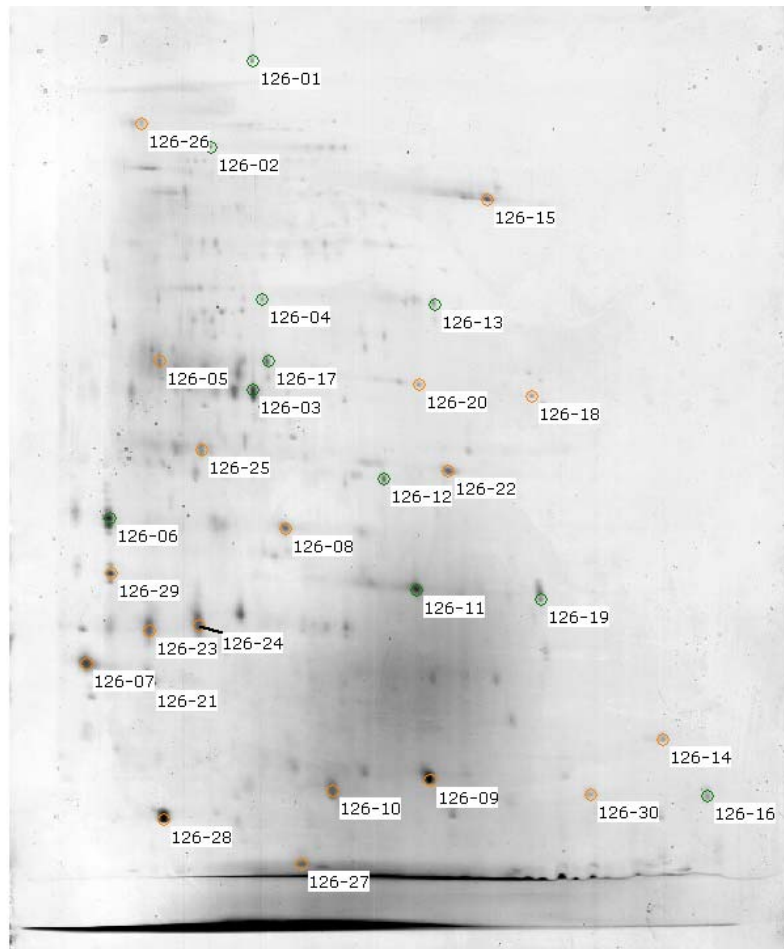


Abb. 14: 2D-Elektrophoresegel der extrazellulären Enzyme von *P. sapidus* vom 9. Kulturtag; Auswahl von 30 Proteinspots zur massenspektrometrischen Analyse

Insgesamt wurden von 30 Proteinspots 163 Peptidsequenzen generiert. Über Homologievergleiche (BLAST-Datenbank-Recherche) wurden Enzyme, die am Lignocelluloseabbau beteiligt sind, identifiziert (Tab. 6).

Die Peptiddaten sowie die Sequenzvergleiche befinden sich im Anhang. Anhand der ermittelten Sequenzen sollen in Fortsetzung der Arbeiten degenerierte Primer konstruiert und diese zur Isolierung der codierenden Sequenzen der Schlüsselenzyme eingesetzt werden.

Tab. 6: Proteinidentifizierung anhand von Peptidsequenz-Datenbankrecherchen; (*)Protein Blast NCBI (Altschul *et al.* 1997) und MS Blast EMBL (Shevchenko *et al.*, 2001) ; ≠: Peptide konnten keinem bekannten Protein zugeordnet werden; Sequenzdaten s. Anhang

Spotnummer	Homologie	
126-01*	Laccase 2, <i>Pleurotus sapidus</i>	100%
126-02	Arylalkohol-Oxidase Precursor, <i>Pleurotus eryngii</i>	94%
126-03*	Laccase 2, <i>Pleurotus sapidus</i>	92%
126-04	Xanthophyllester-Lipase Precursor, <i>Pleurotus sapidus</i>	88 - 100%
126-05	Serin-Protease aus <i>Xanthomonas campestris</i>	75 - 100%
126-06*	POXA 3a/b Laccase, <i>Pleurotus ostreatus</i>	84 – 92%
126-07	≠	≠
126-08	≠	≠
126-09	≠	≠
126-10	Alkohol-Oxidase, <i>Pichia glucozyma</i> , <i>Pichia trehalophila</i>	75%
126-11	Peptidyl-Lysyl-Metall-Endopeptidase, <i>Pleurotus ostreatus</i>	93%
126-12	div. Peptidasen, <i>Vibrio vulnificus</i>	77%
126-13	Methanol-Dehydrogenase, <i>Acinetobacter sp.</i>	66 – 85%
126-14	Serin/Threonin-Kinase, <i>Oryza sativa</i>	75 – 100%
126-15	≠	≠
126-16	Laccase 2, <i>Pleurotus sapidus</i>	75 – 85%
126-17	Laccase, <i>Pleurotus ostreatus</i>	90 – 100%
126-18	≠	≠
126-19*	≠	≠
126-20	Peroxidase, <i>Lactobacillus plantarum</i>	100%
126-21	Laccase, <i>Pleurotus ostreatus</i>	75%
126-22	≠	≠
126-23	≠	≠
126-24	≠	≠
126-25*	Aldehyd-Reduktase II, <i>Aspergillus fumigatus</i>	100%
126-26	≠	
126-27	Xanthophyllester-Lipase Precursor, <i>Laccaria bicolor</i>	72%
126-28	≠	≠
126-29*	POXA 3a/b Laccase, <i>Pleurotus ostreatus</i>	70 – 90%
126-30*	Aldehyd-Reduktase II, <i>Aspergillus fumigatus</i>	88%

4.3.2. *Xylaria polymorpha* (IMI Zittau)

Während des Wachstums im Rapsstrohmedium sekretierte der Ascomycet *X. polymorpha* zahlreiche Proteine. Im Verlauf der Kultivierung ist eine deutliche Intensitätszunahme einiger Proteinspots zu erkennen, was auf eine zunehmende Stoffwechselaktivität des Pilzes hindeutet (Abb. 15).

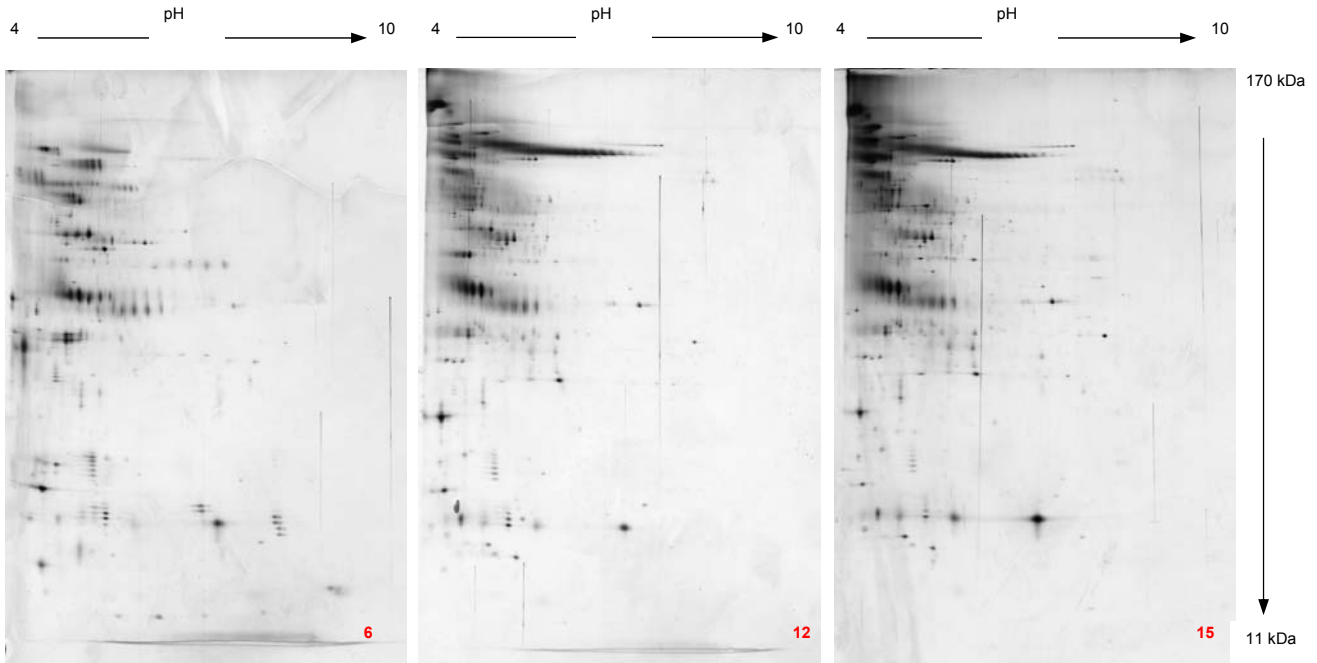


Abb. 15: 2D-elektrophoretische Trennung sekretierter Proteine von *X. polymorpha* der Kulturtage 6 (links), 12 (Mitte) und 15 (rechts)

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an 5 ausgewählten Proteinspots des 2-D-Gels des sechsten Kulturtages (vgl. Abb. 16) durch den Projektpartner Protagen AG. Die so generierten Peptid-Fragmente konnten allerdings bislang keinen in Datenbanken gespeicherten Proteinsequenzen zugeordnet werden, was die Neuheit des enzymatischen Systems des bisher kaum untersuchten Ascomyceten unterstreicht.

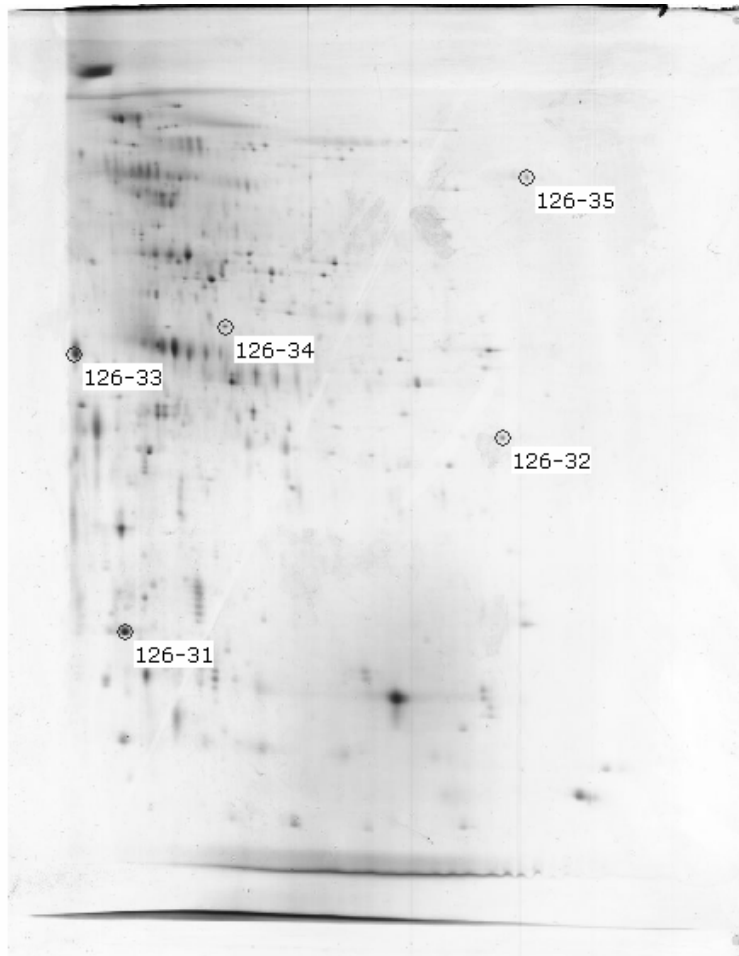


Abb. 16: 2D-elektrophoretische Trennung extrazellulärer Proteine von *X. polymorpha* vom 6. Kulturtag. Auswahl von 5 Proteinspots zur massenspektrometrischen Analyse.

4.4. Zellfreie Umsetzung (*in vitro*) von gemahlenem Rapsstroh (TU Dortmund)

Ausgehend von den Resultaten der Sekretomanalysen wurden die charakteristischen Schlüsselenzyme in der zweiten Projekthälfte gezielt in homologen Submers- oder Emers-Kultursystemen produziert und zellfrei zum enzymatischen Aufschluss von gemahlenem Rapsstroh eingesetzt.

Die Überstände der Kulturtage 2, 6, 9 und 12 wurden einzeln und in verschiedenen Kombinationen zum Reaktionsansatz gegeben und diese für vier Tage mit fein gemahlenem Rapsstroh bei 50 °C inkubiert. Als Indikator für den Lignocellulose-Aufschluss wurde die Glucosefreisetzung in Mehrfachbestimmungen gemessen. Alle Werte sind blindwertbereinigt. Eine Kombination aus dem Kulturüberstand des Tages 2 und 6 setzte innerhalb von vier Tagen die größte Menge (max. 85 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 4 Tagen) an Glucose frei (Abb. 17).

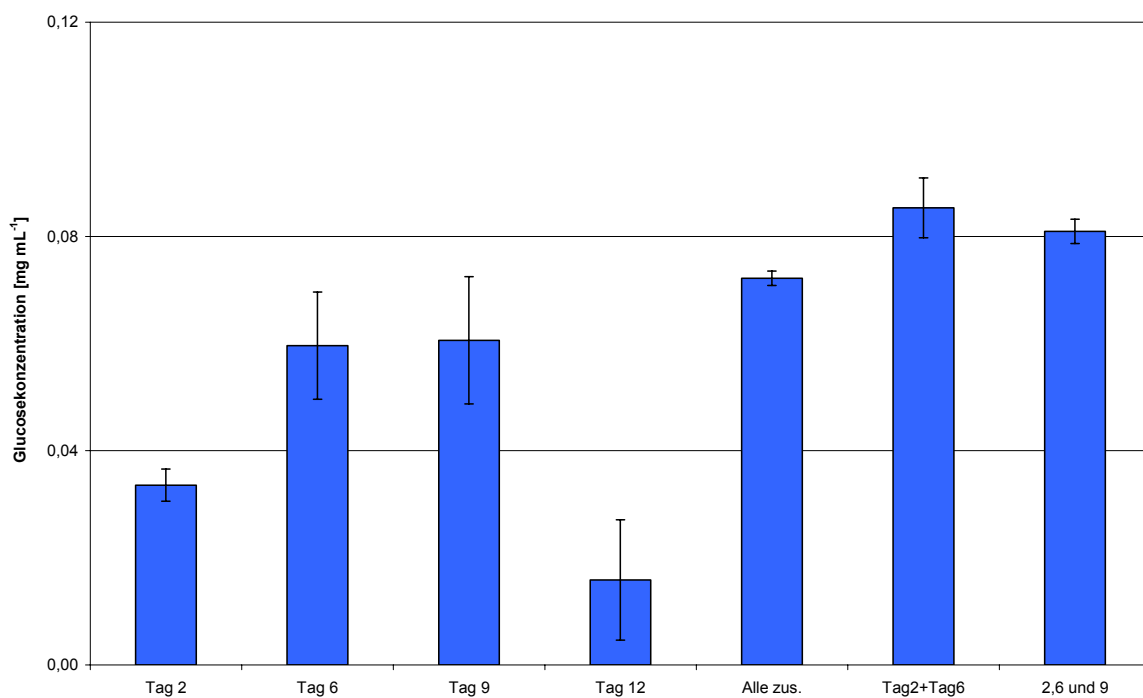


Abb. 17: Vergleich verschiedener statischer Abbaustrategien unter Einsatz der Kulturüberstände von *P. sapidus*; Ü2 = Kulturüberstand Tag 2, Ü6 = Kulturüberstand Tag 6, Ü9 = Kulturüberstand Tag 9, Ü12 = Kulturüberstand Tag 12

Um die Abbaustrategie von *P. sapidus* nachzuvollziehen und gegebenenfalls zu optimieren, wurden verschiedene Überstände im täglichen Wechsel nacheinander insgesamt vier Tage mit dem fein gemahlene Rapsstroh bei 50 °C inkubiert (Abb. 18).

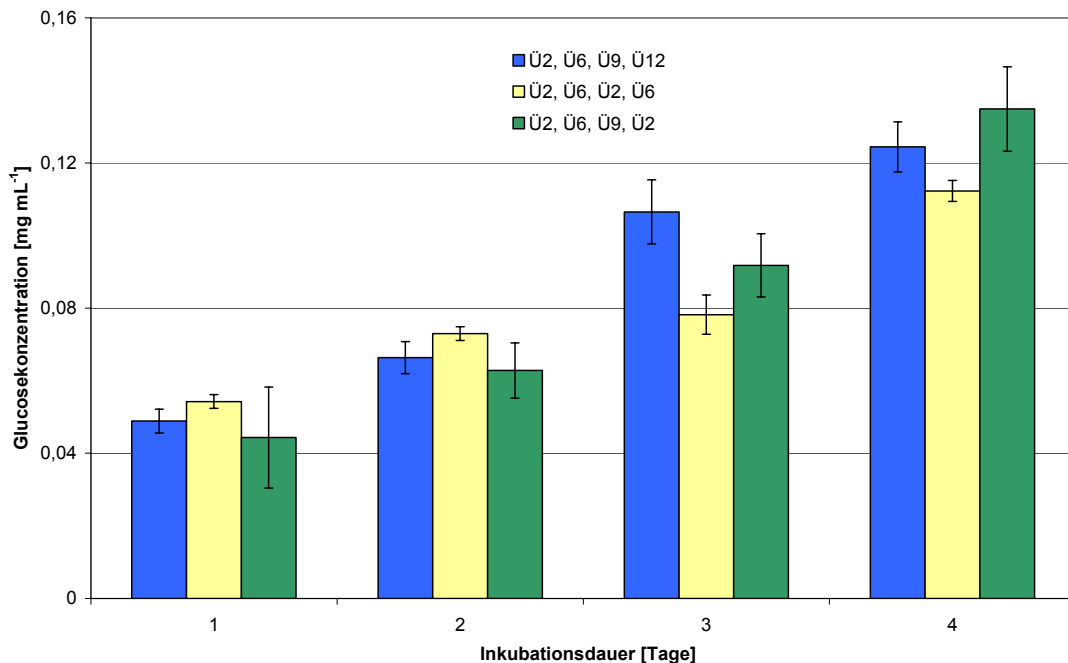


Abb. 18: Vergleich verschiedener dynamischer Abbaustrategien unter Einsatz der Kulturüberstände von *P. sapidus*; Ü2 = Kulturüberstand Tag 2, Ü6 = Kulturüberstand Tag 6, Ü9 = Kulturüberstand Tag 9, Ü12 = Kulturüberstand Tag 12

Der Einsatz dynamischer Abbaustrategien bewirkte eine deutliche Steigerung der Glucosefreisetzung (max. 130 µg mL⁻¹ in 4 Tagen). Für die weiteren Experimente wurde die Strategie (Ü2, Ü6, Ü9, Ü12) gewählt.

Durch Verwendung unterschiedlicher Kombinationen der Enzympräparate aus *P. sapidus* und *X. polymorpha* sollte der Lignocellulose-Abbau optimiert und beschleunigt werden. Kulturüberstände von *X. polymorpha* mit charakteristischen Enzymaktivitäten wurden in einem Verhältnis von 1:1 den Überständen aus *P. sapidus* zugeordnet, sodass die verwendete Enzymmenge pro Reaktionsansatz gleich blieb und eine vermehrte Glucose-Freisetzung allein auf eine synergistische Wirkung der Pilzenzyme zurückzuführen wäre. Zusätzlich wurde eine Temperaturoptimierung durchgeführt (Abb. 19).

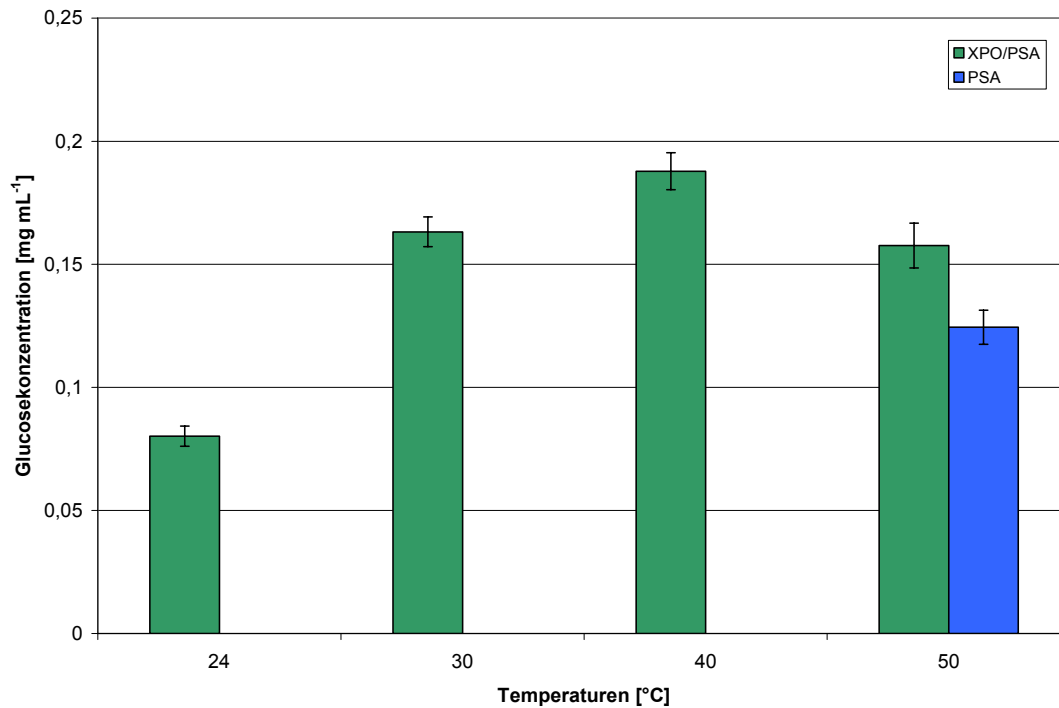


Abb. 19: Kombination der Kulturüberstände von *X. polymorpha* und *P. sapidus* im Verhältnis 1:1 und gleichzeitige Temperaturoptimierung

Die Glucose-Freisetzung bei 50 °C wurde aufgrund des synergistischen Zusammenwirkens der Pilzenzym-Kombination *X. polymorpha*/*P. sapidus* (XPO/PSA) von 120 µg mL⁻¹ (PSA) auf 160 µg mL⁻¹ gesteigert. Bei 40 °C wurde die freigesetzte Glucose-Menge sogar auf auf einen Wert von 190 µg mL⁻¹ erhöht. Der Einsatz größerer Enzym-Mengen lässt einen noch effizienteren Aufschluss des Lignocellulose-Netzwerks erwarten, wurde bislang allerdings nicht realisiert. Unter diesen optimierten Bedingungen (statisch-dynamisch, Kombination mit *X. polymorpha*, Temperaturoptimum) können nun Versuche zur Maßstabsvergrößerung durchgeführt werden.

4.5. HPSEC-Analytik der freigesetzten Lignocellulose-Fragmente (IHI Zittau)

Die Molekulargewichtsverteilung und Quantifizierung der freigesetzten alkalilöslichen aromatisch geprägten Lignocellulose-Fragmente aus dem Rapsstrohmehl durch Enzym-Rohextrakte von *P. sapidus* und *X. polymorpha* ist in Abbildung 20 dargestellt. In beiden Pilzen ist eine Änderung im Fragmentmuster im Vergleich zur Kontrolle klar erkennbar. Dabei erstreckt sich die Zunahme der freigesetzten Fragmente über einen weiten Bereich niedriger-, mittlerer und hoher Molekulargewichte (0,6 – 30 kDa).

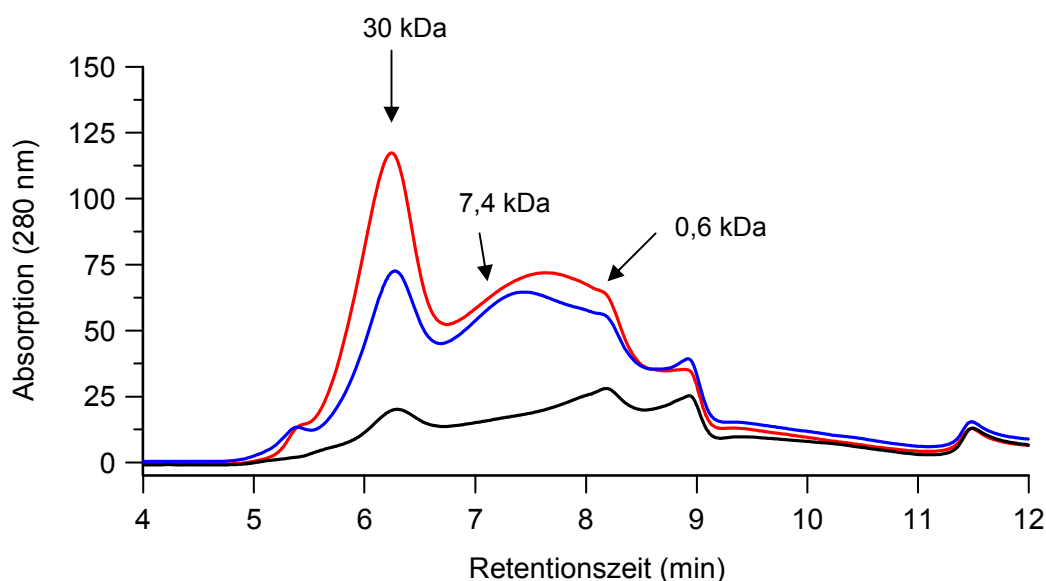


Abb. 20: HPSEC-Elutionsprofil (Molekulargewichtsverteilung) alkalilöslicher Lignocellulose-Fragmente, die aus Rapsstrohmehl nach der sukzessiven *In-vitro*-Umsetzung mit enzymhaltigen Kulturüberständen (nach 48 h Inkubation) von *X. polymorpha* (blaue Linie) und *P. sapidus* (rote Linie) im Vergleich zur Kontrolle freigesetzt wurden (schwarze Linie).

Im Vergleich zu den Kontrollen wurden durch die pilzlichen Kulturüberstände ca. 160% (*X. polymorpha*) bzw. 220% (*P. sapidus*) mehr aromatische Fragmente (polare Ligninbruchstücke) für die alkalische Extraktion verfügbar gemacht, was einen substantiellen Angriff auf das Lignocellulose-Gerüst voraussetzt. Dabei erwiesen sich die enzymhaltigen Kulturüberstände des Weißfäulepilzes *P. sapidus* um etwa 28% effektiver als die des Moderfäuleerregers *X. polymorpha*. Dies könnte auf die Beteiligung extrazellulärer Peroxidasen zurückzuführen sein, die der Weißfäulepilz während der Fermentation von natürlichen Lignocellulosen ausscheidet und die Ascomyceten fehlen (Zorn *et al.* 2005). Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die Kulturüberstände beider Pilze das Rapsstrohmehl aufzuschließen vermögen, wobei keine wesentlichen Unterschiede im Fragmentmuster beider Pilze zu erkennen sind.

Eine Kombination der Kulturüberstände beider Pilze lässt, wie im Fall der Glucose-Freisetzung, auch bezüglich der extrahierbaren aromatischen Ligninfragmente einen synergistischen Effekt erwarten.

Die *In-vitro*-Umsetzung von Rapsstroh mit einer Mischung aus kommerziell erhältlichen und eigenen Enzymen führte zu einer stark ausgeprägten Zerlegung des Lignocellulose-Gerüsts, was eine drastische Erhöhung der alkalilöslichen Aromatenfraktion zur Folge hatte (UV-Absorption im Bereich von 250 bis 280 nm; M_w der freigesetzten Fragmente 0,6 bis > 200 kDa; Abb. 21).

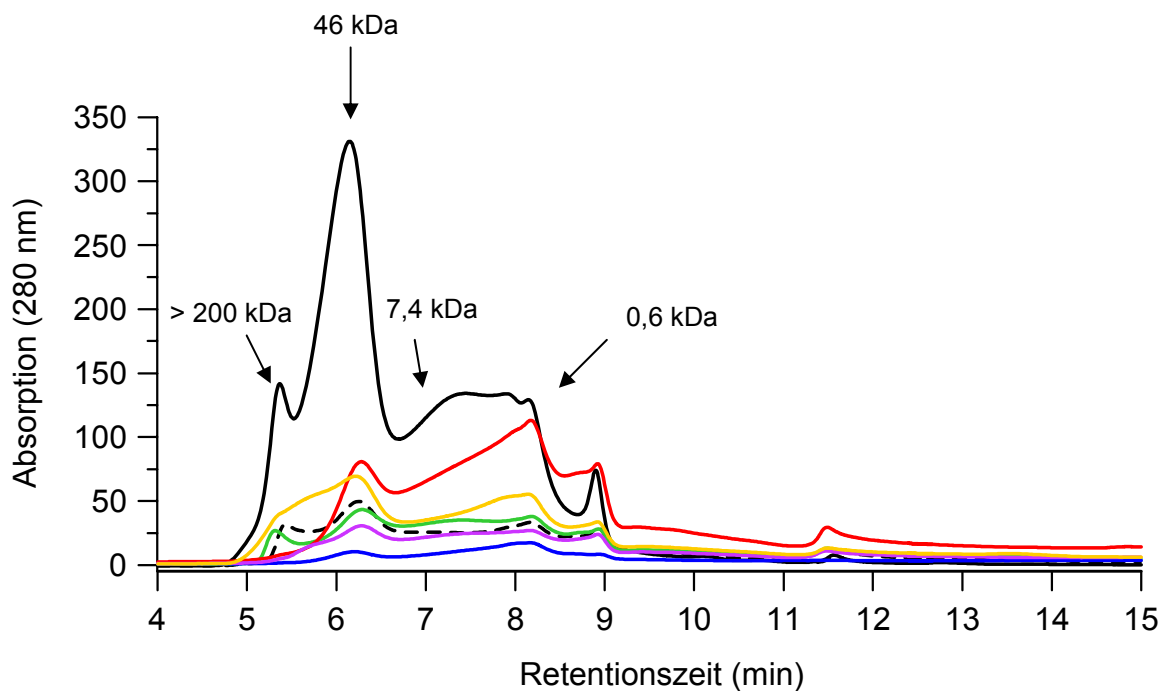


Abb. 21: HPSEC-Elutionsprofil (Molekulargewichtsverteilung) alkalilöslicher Lignocellulose-Fragmente, die aus Rapsstroh nach der *In-vitro*-Umsetzung mit kommerziell erhältlichen Pilzenzymen (schwarz – Kombination aller Enzyme, rot – Mangan-Peroxidase, blau – Laccase, violett – Xylanase, gelb – Cellulase, grün – Esterase) im Vergleich zur Kontrolle freigesetzt wurden (gestrichelte schwarze Linie).

Damit wurde deutlich gezeigt, dass ein effektiver enzymatischer Angriff auf den Lignocellulose-Komplex möglich ist und dass die Freisetzung von aromatischen Lignocellulose-Bruchstücken durch das synergistische Zusammenwirken verschiedener pilzlicher Biokatalysatoren bewirkt wird.

Der mengenmäßig bedeutendste Teil der gebildeten Bruchstücke hatte ein Molekulargewicht von 40-50 kDa, was aus 200-400 Aromateneinheiten bestehenden Ligninfragmenten entspricht. Im Unterschied dazu bewirkten die einzeln eingesetzten

Enzyme nur geringe Erhöhung der alkalischen Extrahierbarkeit aromatischer Lignocellulose-Fragmente aus dem Rapsstroh.

Die gravimetrische Auswertung des nach der Umsetzung verbliebenen festen Rapsstrohs bestätigte den effektiven Aufschluss durch den pilzlichen Enzymcocktail aus kommerziellen und eigenen Präparaten. Durch die eingesetzte Enzymmischung konnte ca. 56% ($\pm 2\%$) des Rapsstrohs biokatalytisch in wasser- bzw. alkalilösliche Bruchstücke überführt werden. Im Unterschied hierzu ergab sich für die Kontrolle lediglich ein Gewichtsverlust von ca. 14% ($\pm 4\%$), der vermutlich auf die Tensidwirkung von Tween 80, das zur besseren Suspendierung der Strohpartikel eingesetzt wurde, und dem kontinuierliche Rühren des Reaktionsansatzes zurückzuführen ist.

4.6. Emerskultivierung von *Pleurotus sapidus*

Zusätzlich zur Enzymproduktion in Submers-Kulturen wurden Emers-Kulturen auf Rapsstroh als C-Quelle untersucht. Die Gesamtkulturdauer betrug hier acht Wochen, wobei die Enzymaktivitäten kinetisch erfasst wurden (alle zwei Wochen) (Abb. 22). Die maximale Aktivität eines Enzyms wurde mit 100% gleichgesetzt und die weiteren Aktivitäten des entsprechenden Enzyms hierauf bezogen.

Relative Aktivität [%]

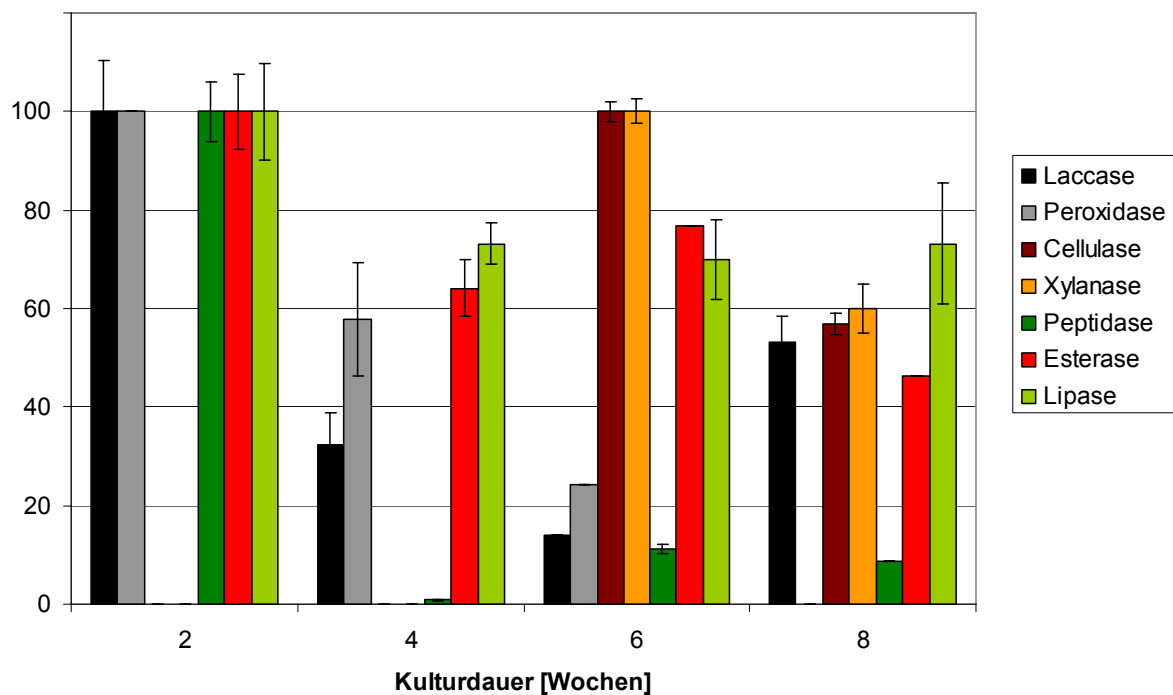


Abb. 22: Relativer Vergleich der Enzymaktivitäten in Emerskultur von *P. sapidus*

Analog zur Submers-Kultivierung war der Lignocellulose-Aufschluss in Emers-Kultur ebenfalls durch alternierend sekretierte oxidative und hydrolytische Enzymaktivitäten nach einer festgelegten, reproduzierbaren Strategie charakterisiert. Aufgrund der höheren Wachstumsrate wurden die für den *In-vitro* Verdau benötigten Enzyme aber routinemäßig in Submers-Kultur produziert.

Ferner wurden von den Erntetagen (2, 4, 6 und 8 Wochen Kulturdauer) Protein-Präparationen für die 2D-Elektrophorese hergestellt, welche an der TU Dortmund durchgeführt wurden (Abb. 23).

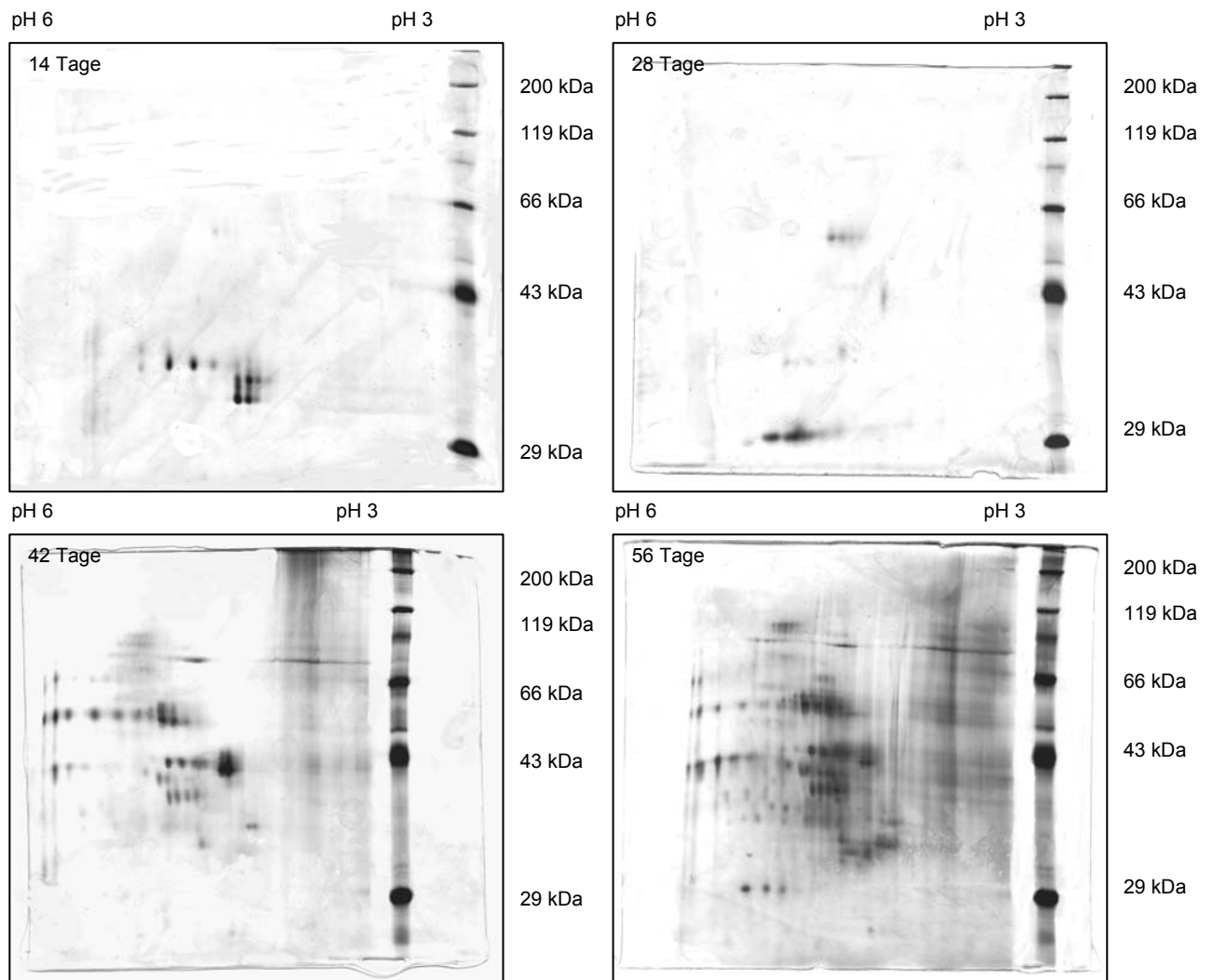


Abb. 23: 2D-Elektrophorese sekretierter Proteine aus Emers-Kulturen von *P. sapidus* nach 2, 4, 6 und 8 Wochen Kulturdauer

5. Diskussion und Zusammenfassung

Die bisherigen Arbeiten haben zur Etablierung einheitlicher Kultur- und Aufarbeitungsmethoden geführt, die Voraussetzung für die vergleichende Sekretom-Analyse sind. Beide zu unterschiedlichen Klassen gehörenden Pilzstämme sind in der Lage, in Submers-Kultur mit Rapsstroh als einziger Kohlenstoffquelle, Biomasse zu bilden. Es wurden relevante, mit dem Lignocelluloseabbau in Verbindung stehende, enzymatische Aktivitäten nachgewiesen und deren Bildung kinetisch verfolgt. Dabei ist es offensichtlich, dass eine bestimmte, von alternierenden Aktivitäten (oxidativ und hydrolytisch) gekennzeichnete Strategie von den Pilzen genutzt wird.

An den Erntetagen mit charakteristischen Enzymaktivitäten wurden Proteinpräparationen für die 2D-elektrophoretische und massenspektrometrische Analyse hergestellt. Durch den Projektpartner Protagen erfolgte eine hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese der Sekretome beider Pilze. Anschließend wurden einzelne Proteinspots in Absprache mit der TU Dortmund und dem IHI Zittau ausgewählt und aus diesen mittels massenspektrometrischer Methoden (MALDI-TOF-, Nano-LC ESI-MS/MS-Analysen) Peptidsequenzen generiert. Anhand von entsprechenden Datenbankrecherchen sowie auf Grundlage spezifischer Aktivitätsmessungen wurden die Schlüsselenzyme des Lignocelluloseabbaus aus beiden Pilzen identifiziert. *P. sapidus*: Laccase, Peroxidase, Polysaccharid-Hydrolasen und Lipase bzw. *X. polymorpha*: Laccase, Polysaccharid-Hydrolasen und Esterase.

Relevante Enzyme (Laccasen, Peroxidasen, Polysaccharid-Hydrolasen) beider Pilze wurden in entsprechenden Submers- und Emers-Kulturen durch die TU Dortmund und das IHI Zittau produziert. Als Enzym-Rohextrakte wurden diese in zellfreien Reaktionsansätzen (*in vitro*) erfolgreich zur direkten Umsetzung von fein gemahlenem Rapsstroh eingesetzt, die Vorgehensweise optimiert und die entstandenen Produkte analytisch erfasst (Glucose-Freisetzung, HPSEC und HPLC-DAD).

Schließlich ist auch der Nachweis einer substantiellen enzymatischen Zerlegung von Rapsstroh mit Hilfe einer Kombination eigener und kommerzieller Pilzenzyme gelungen. Das HPSEC-Elutionsprofil der gebildeten alkalilöslichen Fragmente unterscheidet sich vor allem im hoch- bis mittelmolekularen Größenbereich (>200 – 7 kDa) deutlich von den Fragmentmustern der einzelnen nicht miteinander kombinierten Enzympräparate.

Der gravimetrische Vergleich des nach der Umsetzung zurückgebliebenen festen Rapsstrohrestes mit einer entsprechenden Kontrolle (ohne enzymatische Einwirkung)

belegt ebenfalls, dass durch eine kombinierte enzymatische Behandlung über 50 % der Lignocellulose in eine alkalilösliche Form überführt werden kann. Wenn man bedenkt, dass dieser Prozess noch nicht weiter optimiert ist, wird deutlich, welches enorme Potential in diesem Enzym-kombinatorischen Ansatz vorhanden ist.

Eine Isolierung, partielle Reinigung und Charakterisierung von drei Hydrolasen (β -Glucosidase, Esterase, Xylanase) und einer Laccase des Ascomyceten *X. polymorpha* wurde mittels FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) erreicht und verlief bezüglich der gewonnenen Enzymmengen erfolgreich. Die Reinigung einer Esterase und einer Xylanase gestaltete sich jedoch schwierig (Instabilität der Proteine, Vorhandensein schwer trennbarer Isoformen). Da beide aber Schlüsselenzyme des Lignocelluloseabbaus durch *X. polymorpha* sind, wird die Optimierung der Proteinreinigung Gegenstand zukünftiger Untersuchungen am IHI Zittau sein (Einsatz zusätzlicher Methoden: präparative isoelektrische Fokussierung, „*Chromatofocussing*“).

Die konzentrierten Enzym-Rohextrakte der Versuchsorganismen, sowie die Kulturüberstände von *P. sapidus* und *X. polymorpha*, setzten aus dem Rapsstroh eine aromatisch geprägte, alkalilösliche Fraktion frei, die einen weiten Molekülgrößenbereich umfasste (0,6 bis 30 kDa). Dabei erwies sich der Weißfäulepilz *P. sapidus* im Vergleich zum Moderfäuleerreger *X. polymorpha* als etwas effektiver. Dies beruht auf unterschiedlichen Enzymmustern, die sich bei den Pilzen während des Wachstums auf natürlichen Lignocellulosen einstellen. So haben bereits frühere Untersuchungen am IHI Zittau gezeigt, dass die Fähigkeit holzbewohnender Ascomyceten zur Lignin-Mineralisierung geringer ausgebildet ist als bei Weißfäulepilzen (Liers *et al.* 2006; Liers *et al.* 2007). Die Sekretion ligninolytischer Peroxidasen erleichtert den Weißfäulepilzen den Zugang und die Mineralisierung des Lignocellulose-Komplexes (Hatakka 2001, Zorn *et al.* 2005).

Trotz der insgesamt als sehr positiv zu bewertenden Ergebnisse besteht noch ein erheblicher Forschungsbedarf, vor allem was die Optimierung der Enzymproduktion und die Zusammensetzung der Enzym-Cocktails angeht. Im Rahmen des Projektes wurde die prinzipielle Machbarkeit des enzymatischen Aufschlusses von Lignocellulosen am Beispiel von Rapsstroh eindeutig nachgewiesen und die ursprüngliche Hypothese einer synergistischen und zeitlich regulierten Wirkung von Enzymen bestätigt. Somit ist der wissenschaftliche Grundstein gelegt, um die gewonnenen Erkenntnisse in zukünftigen Vorhaben für umweltschonende Verfahren zur stofflichen Biomasse-Verwertung nutzbar zu machen.

6. Fazit

Die im Rahmen des Projektes gewonnenen Erkenntnisse sind von grundlegender Bedeutung und richtungweisend für zukünftige Forschungsvorhaben. Durch eine sich gegenseitig ergänzende Kombination von Enzympräparaten verschiedener Pilze sowie kommerzieller Enzyme wurden erste effektive „Enzymcocktails“ generiert, mit deren Hilfe die partielle Zerlegung von Rapsstroh unter schonenden und umweltfreundlichen Bedingungen gelungen ist. Die Schlüsselenzyme des Substrat-Aufschlusses von *P. sapidus* und *X. polymorpha* wurden massenspektrometrisch identifiziert und können nun aus cDNA-Banken kloniert werden. Im Fall von *X. polymorpha* besteht noch weiterer Forschungsbedarf; zwar ist es gelungen enzymatische Schlüssel-Aktivitäten anhand photometrischer Tests zu identifizieren, doch konnte aufgrund fehlender Sequenzinformationen in den verfügbaren Datenbanken keine eindeutige Zuordnung der gefundenen Protein-Fragmente erfolgen. Alles in allem wurde jedoch durch die Untersuchungen im vorliegenden Projekt die Grundlage für eine zukünftige heterologe Expression und Überexpression der gewünschten Schlüssel-Enzyme gelegt. Diese wiederum bildet die Voraussetzung für den Einsatz von „maßgeschneiderten Enzymcocktails“ im größeren Maßstab. Durch einen gezielten und gerichteten enzymatischen Aufschluss des Lignocellulose-Polymers unter Einsatz dieser „Enzymcocktails“ wird eine stoffliche Verwertung der entstehenden aromatischen Lignin-Fragmente möglich werden. Zur strukturellen Charakterisierung dieser Lignin-Abbauprodukte sollen zukünftig spezielle massenspektrometrische und chromatographische Methoden sowie moderne NMR-spektroskopische Verfahren zum Einsatz kommen.

7. Öffentlichkeitsarbeit

Bouws H, Wattenberg A, Zorn H (2008) Fungal Secretomes – Nature's toolbox for white biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol; in press

Bouws H, Schüttmann I, Szweda R, Zorn H (2008) Sekretome von Basidiomyceten zum enzymatischen Aufschluss von Rapsstroh. Posterpräsentation Deutscher Lebensmittelchemikertag

Hofrichter M (2008) Physiologie und Enzymologie lignozellulytischer Pilze. Kurzvortrag auf dem 3. Treffen der „Länderübergreifenden Zukunftsinitiative Biomasse-basierte Stoffproduktion Deutschland Ost (BioMasse Ost)“. 04.02.2008, FH Lausitz, Senftenberg

Hofrichter M (2007) Pilze: Geheimnisvolle Wesen aus dem Untergrund mit erstaunlichem biotechnologischen Potential. Herbstsitzung der Thüringer Akademie für Gemeinnützige Wissenschaften, 26.10.2007, Erfurt

Pecyna M, Liers C, Ullrich R, Hofrichter M (2008) Expression and regulation of laccase genes in the wood-colonizing ascomycete *Xylaria polymorpha*. Biospektrum, Sonderausgabe, VAAM-Jahrestagung 2008, Frankfurt a. M.

Zorn H, Schüttmann I, Bouws H (2008) Fungal secretomes – versatile toolbox for white biotechnology. European Bioperspectives

8. Literatur

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

Bailey MJ, Biely P, Poutanen K (1991) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol* 23:257-270

Bailey MJ, Nevalainen KMH (1981) A note on the use of dinitrosalicylic acid for determining the products of enzymatic reactions. *Enzyme Microb Technol* 3:153-157

Bourbonnais R, Paice MG (1990) Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* 267:99-102

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

Eggert C, Temp U, Dean JF, Eriksson KE (1996) A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett* 391: 144-148

Hatakka A (2001) Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbüchel A (Eds.) *Biopolymers: Lignin, humic substances and coal*, pp. 129-180, Weinheim: Wiley-VCH

Herr D (1979) Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC-1433 in submerged culture on different substrates. *Biotechnol Bioeng* 21:1361-71

Heukeshoven J, Dernick R (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28-32

Hofrichter M, Vares T, Kalsi M, Galkin S, Scheibner K, Fritsche W, Hatakka A (1999) Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl Environ Microbiol* 65:1864-1870

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

Kilcawley KN, Wilkinson MG, Fox PF (2002) Determination of key enzyme activities on commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. *Enzyme Microb Technol* 31:310-320

Klose J (1999) Large-gel 2-D electrophoresis. *Methods Mol Biol* 112:147-172

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

Liers C, Ullrich R, Steffen KT, Hatakka A, Hofrichter M. (2006) Mineralization of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:573-579

Liers C, Ullrich R, Pecyna M, Schlosser D, Hofrichter M (2007) Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. *Enzyme Microb Technol* 41:785-793

Linke D, Zorn H, Gerken B, Parlar H, Berger RG (2005) Foam Fractionation of Exo-lipases from a growing Fungus (*Pleurotus sapidus*). *Lipids* 40:323-327

Moritz F (2007) Reinigung und partielle Charakterisierung einer extrazellulären Esterase des Ascomyceten *Xylaria polymorpha*. Bakkalaureus-Arbeit, Hochschule Zittau/Görlitz

Pan X, Sano Y (2005) Fractionation of wheat straw by atmospheric acetic acid process. *Bioresour Technol* 96:1256-1263

Popov N, Schmitt M, Schulzeck S, Matthies H (1975) Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. *Acta Biol Med Ger* 34:1441-1446

Purdy RE, Kolattukudy PE (1973) Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. pisi: isolation and some properties of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 159:61-69

Shevchenko A, Sunyaev S, Loboda A, Shevchenko A, Bork P, Ens W, Standing KG (2001) Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. *Anal Chem* 73:1917-1926

Slein MW (1963) D-glucose: Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (Ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 117-73, New York: Academic Press

Valmaseda M, Martínez MJ, Martínez AT (1991) Kinetic of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* – lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:817-823

Weingarten P, Lutter P, Wattenberg A, Blueggel M, Bailey S, Klose J, Meyer HE, Huels C (2005) Application of proteomics and protein analysis for biomarker and target finding for immunotherapy. *Methods Mol Med* 109:155-74

Wessel D, Fluegge VJ (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solutions in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141-143

Zor T, Selinger Z (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* 236:302-308

Zorn H, Peters T, Nimtz M, Berger RG (2005) The Secretome of *Pleurotus sapidus*.
Proteomics 5:4832-4838

9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Lignocellulose-Netzwerk
- Abbildung 2: Basidiomycet *Pleurotus sapidus* und Ascomycet *Xylaria polymorpha*
- Abbildung 3: Kultivierung von *P. sapidus* und *X. polymorpha* auf Rapsstroh
- Abbildung 4: Vorgehensweise zur Gewinnung und Anreicherung extrazellulärer Proteine aus Submers-Kultur
- Abbildung 5: Laccase- und Peroxidase-Aktivitäten im Kulturüberstand von *P. sapidus*
- Abbildung 6: Lipase- und Esterase-Aktivitäten im Kulturüberstand von *P. sapidus*
- Abbildung 7: Xylanase- und Glucanase-Aktivitäten im Kulturüberstand von *P. sapidus*
- Abbildung 8: Peptidase-Aktivität und Proteingehalt im Überstand von *P. sapidus*
- Abbildung 9: Relativer Vergleich der Enzymaktivitäten der Kulturüberstände von *P. sapidus*
- Abbildung 10: Produktion lignocellulolytischer Enzyme aus *X. polymorpha* im 10-Liter-Rührkesselreaktor und in Festsubstrat
- Abbildung 11: Beispiel der Proteinreinigung einer extrazellulären β -Glucosidase des Ascomyceten *X. polymorpha* mittels FPLC
- Abbildung 12: Elektrophoretische Protein-Charakterisierung
- Abbildung 13: 2D-elektrophoretische Darstellung sekretierter Proteine von *P. sapidus* vers. Kulturtage
- Abbildung 14: 2D-elektrophoretische Trennung der extrazellulären Enzyme von *P. sapidus*
- Abbildung 15: 2D-elektrophoretische Darstellung sekretierter Proteine von *X. polymorpha*
- Abbildung 16: 2D-elektrophoretische Trennung der extrazellulären Enzyme von *X. polymorpha* - Auswahl von Proteinspots zur massenspektrometrischen Analyse
- Abbildung 17: Vergleich verschiedener statischer Abbaustrategien unter Einsatz der Kulturüberstände von *P. sapidus*
- Abbildung 18: Vergleich verschiedener dynamischer Abbaustrategien unter Einsatz der Kulturüberstände von *P. sapidus*

- Abbildung 19: Kombination der Kulturüberstände von *X. polymorpha* und *P. sapidus* im Verhältnis 1:1 und gleichzeitige Temperaturoptimierung
- Abbildung 20: HPSEC-Elutionsprofil alkalilöslicher Lignocellulose-Fragmente nach der sukzessiver *In-vitro*-Umsetzung mit enzymhaltigen Kulturüberständen von *X. polymorpha* und *P. sapidus*
- Abbildung 21: HPSEC-Elutionsprofil alkalilöslicher Lignocellulose-Fragmente nach *In-vitro*-Umsetzung mit kommerziell erhältlichen Pilzenzymen
- Abbildung 22: Relativer Vergleich der Enzymaktivitäten in Emerskultur von *P. sapidus*
- Abbildung 23: 2D-Elektrophorese sekretierter Proteine aus Emers-Kulturen von *P. sapidus*

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammenfassung der verwendeten Enzymassays
Tabelle 2:	Charakterisierung des Rapsstrohs und Vergleich mit Literaturangaben
Tabelle 3:	Gebildete maximale Enzymaktivitäten, die am Abbau von Rapsstroh beteiligt sind
Tabelle 4:	Parameter zur Reinigung extrazellulärer Enzyme von <i>X. polymorpha</i> .
Tabelle 5:	Eigenschaften isolierter bzw. partiell gereinigter Enzyme von <i>X. polymorpha</i>
Tabelle 6:	Proteinidentifizierung anhand von Peptidsequenz-Datenbankrecherchen

11. Abkürzungen

AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoridehydrochloride
2D	Zweidimensional
cDNA	copy-DNA
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-64	<i>trans</i> -Epoxy succinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butane
ESI-MS/MS	Elektronenspray-Ionisation/Tandem-Massenspektrometrie
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung : 9,81 m s ⁻²
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection
HPSEC	High Performance Size Exclusion Chromatography
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kDa	Kilodalton
LC	Liquid Chromatography
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight
M _w	Molekülgewicht
n.b.	nicht bestimmt
NEPHGE	Nonequilibrium pH Gel Electrophoresis
NMR	Kernresonanzspektroskopie
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
U	Unit
Ü	Überstand
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichts
XPO	<i>Xylaria polymorpha</i>

12. Anhang

12.1. Peptiddaten (*P. sapidus*)

126-01

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-01	1511,7812	1	1511,7812	TSNSDVVNLVNPPR
126-01	1667,8824	1	1667,8824	TSNSDVVNLVNPPRR

126-02

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-02	1446,77	1	1446,77	LVNSGTTNGLPAFR
126-02	1898,8151	1	1898,8151	DSSEFNADLDQWTNTR
126-02	2355,0789	1	2355,0789	YAAVTGDDGWNWDNIQQFVR
126-02	1232,6593	1	1231,65198	TKGPLYLGMPR
126-02	1664,80151	1	1663,79419	LSDPTNDAALPAGGPLR
126-02	1936,09314	1	1935,08582	KGLVSAGGKGVPA(CamC)NGGPGPR
126-02	2290,19531	1	2289,18799	(OxH)GTWFDYLVVGAGNAGNVVAAR
126-41	359,024536	2	716,034546	CAMHKK
126-41	500,748596	2	999,482666	DPSVCTGPPK
126-41	634,67688	2	1267,33923	CCTST(OxH)MVSKR
126-41	715,268188	2	1428,52185	(OxH)KCA(CamC)VEEAGPGR
126-41	765,920471	2	1529,82642	LYPTGAGNAHMTAAR
126-41	1456,55774	2	2911,10083	M(OxM)GPMENDNHCCGPGCGTPYEFMGCSK

126-03

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-03	1511,7812	1	1511,7812	TSNSDVVNLVNPPR
126-03	1667,8824	1	1667,8824	TSNSDVVNLVNPPRR
126-03	2037,1379	1	2037,1379	KPQDFLPSEQVILPANK
126-03	2720,442	1	2720,442	LIEVSIPGAGAHPPFHLHGHTFDIVR
126-03	2055,98389	1	2054,97656	APEVNDGEQAQLVTQDSVR

126-04

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-04	1332,6543	1	1332,6543	ADGVFLTDNPQR
126-04	1439,7893	1	1439,7893	LPEPIPPYTGTVR
126-04	1531,7904	1	1531,7904	FLGIPYAQPPTGDR
126-04	1342,65698	1	1341,64966	DAGVGGGLGLQDQR

126-05

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-05	1105,55811	1	1104,55078	SALFPTDAQR
126-05	1293,64514	1	1292,63782	FPSPLAGTGAGYR
126-05	1783,87646	1	1782,86914	LVLDGVVDSENYFASR
126-05	3171,64697	1	3170,63965	VGVA AAAVFPKANKHEHL(OxM)EHLSAGEGGTAR

126-06

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-06	1126,6579	1	1126,6579	TLPNSINLVR
126-06	1933,9751	1	1932,96777	TPSNTNPALYQALSTCPR
126-06	2120,13184	1	2119,12451	VLMLDAKQFLTQAMVC(OxH)R
126-06	2136,14844	1	2135,14111	EDDLDAQQLTKAGLTAGSR
126-06	2152,1272	1	2151,11987	(OxM)SSGGAPAQQ(OxM)LTGAAAVDNSR

126-07

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-07	982,511353	1	981,504089	A(OxH)QLGGMPR
126-07	1016,46301	1	1015,45575	GSGGKLAACPR

126-08

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-08	1281,65515	1	1280,64783	TPPASGSPTTPLR
126-08	1459,68079	1	1458,67346	NDLVWSPVAN(CamC)GK

126-09

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-09	1288,72559	1	1287,71826	ASKTSTVLTGVPK
126-09	2311,17383	1	2310,1665	TGGGGASNFELTPEG(OxH)LVETHGK

126-10

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-10	1418,59302	1	1417,58569	ASH(OxM)NFADHNCR

126-11

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-11	2559,1383	1	2559,1383	SNPAQAIDNADSHEYFAENNPALA
126-11	1465,711	1	1465,711	YTTWFGTFVTSR
126-11	1441,7183	1	1441,7183	GGTLIHESHFTR
126-11	1083,5252	1	1083,5252	ATFVGCPAmSATR
126-11	1448,69275	1	1447,68542	YTALHESSNSPSR
126-11	1946,90637	1	1945,89905	NGGTDDHVYGQTGAQPCAR
126-37	341,011169	2	680,007813	VVHGAAK
126-37	688,301025	1	687,293762	(CamC)CLHR
126-37	573,735657	2	1145,45679	CAAKVH(CamC)(OxW)R
126-37	555,273438	2	1108,53235	CCPLVGCSSLK
126-37	620,459167	2	1238,90381	GPNLVCPTSHSK
126-37	498,69455	2	995,374573	WDPVN(OxH)GR
126-37	688,831665	2	1375,6488	DRAVTPPWLHGK
126-37	355,070374	2	708,126221	GGHDAPR
126-37	643,629028	2	1285,24353	THSPDCTTAEPK
126-37	1136,1803	2	2270,34595	ALLNFKHAEGTSMVLEQLAAK
126-37	337,165009	2	672,315491	AAPPSCK
126-37	491,258911	2	980,503296	TYLLCLQK
126-37	729,300293	2	1456,58606	KPHHEPAACGVRR
126-37	561,240906	2	1120,46729	GFAAPLCLMAK

126-12

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-12	928,5363	1	928,5363	KLDFHIR
126-12	1234,5699	1	1234,5699	NDVVSPDGFER
126-12	1478,7526	1	1478,7526	GTFIVYDPNDPLK
126-12	1577,7972	1	1577,7972	STSIHWHGLFQHK
126-12	1768,0367	1	1768,0367	AITVNGIFPGTPVILQK
126-39	807,791931	2	1613,56934	YWSCCQNS(OxH)GEER
126-39	705,391602	1	704,384338	NRPYR
126-39	654,753723	2	1307,49292	FGNSEMVVSPNK
126-39	593,359741	2	1184,70496	MDTAPSNNGGAHK
126-39	507,295044	2	1012,57556	DAVLNGVGLR
126-39	429,089233	2	856,16394	NG(OxW)ATHR
126-39	1064,59839	2	2127,18213	TL(CamC)CCLSANPPKALL(CamC)HVK

126-13

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-43	1234,5699	1	1234,5699	NDVVSPDGFER
126-43	2006,0665	1	2006,0665	APLTGGNPTGNPNLDVSLIR
126-43	558,787781	2	1115,56104	TPAYPPVDTR
126-43	564,780762	2	1127,547	SDA(CamC)KTPHGR
126-43	589,289734	2	1176,56494	CPEHLFEFR
126-43	514,374451	1	513,367188	TTHR
126-43	655,385925	2	1308,75732	MNVHNGPENAVK
126-43	527,275513	2	1052,5365	VLLGP(OxH)VFR
126-43	746,345093	1	745,33783	E(OxH)ASMR
126-43	643,585144	1	642,577881	VHPYK

126-14

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-14	1101,58765	1	1100,58032	GGGNPAFVVQR
126-14	1140,54224	1	1139,53491	GEDFTSAGGATK

126-15

SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-15	922,549622	1	921,542358	LNLGPPGVR
126-15	1315,65002	1	1314,6427	AASVSAELDLSPR
126-15	1347,67566	1	1346,66833	(OxM)SSDGLPAMGLPR
126-15	1370,78992	1	1369,78259	LGGGGGSALVAGGGGAGR
126-15	1442,81641	1	1441,80908	AGVLLQATLSADQR
126-15	1932,90442	1	1931,89709	AAAGGGGGNSSQTPASSGKSGAR

126-44	785,533691	1	784,526428	CCWCDR
126-44	274,905884	2	547,797241	(CamC)VDR
126-44	510,870972	1	509,863708	ARHK
126-44	486,763153	2	971,51178	DPALSGGGNGK
126-44	414,221313	2	826,428101	GAMTEYR
126-44	954,560913	1	953,55365	AYCCEHTK
126-44	435,331268	2	868,64801	VGVMAHGAK
126-44	486,713226	2	971,411926	HHADGGGPPK
126-44	1316,46399	2	2630,91333	THTSHCHSRHPVVV(OxH)GTLS(OxW)GHK
126-44	1105,24585	2	2208,47705	DAA(OxH)QAPCCGSNS(OxH)APALVSNK
126-44	489,39621	2	976,777893	DLSAVPGYR
126-44	988,529724	2	1975,04492	NGT(OxH)LAMHAGTNGTGNHNR
126-16				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-16	1768,0367	1	1768,0367	AITVNGIFPGTPVILQK
126-16	928,5363	1	928,5363	KLDFHIR
126-16	1234,5699	1	1234,5699	NDVVSPDGFER
126-16	1248,57764	1	1247,57031	GGDVVSPDG(OxH)HR
126-16	1449,69653	1	1448,68921	STSLHWHGL(OxM)HK
126-17				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-17	1478,7526	1	1478,7526	GTFIVYDPNDPLK
126-17	1797,0017	1	1797,0017	GGPLVPYAVINVEQGKR
126-17	2006,0665	1	2006,0665	APLTGGNPTGNPNLDVSLIR
126-18				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-18	1013,57123	1	1012,56396	VGGPGTTLVGR
126-18	1127,67102	1	1126,6637	LVMGVNSV(OxH)R
126-18	1433,80078	1	1432,79346	KPLYSTTGGLAVAR
126-18	1876,92065	1	1875,91333	DVVTYAMGYGGGCNLSNR
126-19				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-19	1797,0017	1	1797,0017	GGPLVPYAVINVEQGKR
126-19	2006,0665	1	2006,0665	APLTGGNPTGNPNLDVSLIR
126-19	2020,08667	1	2019,07935	QAPTLNPTGNNCPTGGGGAHR
126-20				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-20	924,466858	1	923,459595	GNTADAGYR
126-20	1022,59711	1	1021,58984	ATLVPLVGPR
126-20	1573,76074	1	1572,75342	SLKVPGPGFSETQAR
126-20	1659,84033	1	1658,83301	VGGGHGHHHPNGEV(OxH)PR
126-40	529,757935	2	1057,50134	(OxH)FKTPDAAR
126-40	590,317017	1	589,309753	GNLMR
126-40	422,878693	2	843,742859	WSVS(OxH)GR
126-40	1003,11139	2	2004,20825	ECSNPAAGNTTKGLVYV(OxH)K
126-40	518,284363	1	517,2771	EVDR
126-21				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-21	1478,7526	1	1478,7526	GTFIVYDPNDPLK
126-21	2516,31348	1	2515,30615	DTPGAF(OxM)QTGSVPLPDTGLLNGVGR
126-21	2530,32959	1	2529,32227	QAGGGAFFKTGTVPLPDTGEPNGVGR
126-36	461,921356	1	460,914093	CPDK
126-36	744,838989	2	1487,66345	(CamC)PTCLETATPHCR
126-36	840,792358	2	1679,57019	MMGKAVPRLPASN(OxH)R
126-36	1178,12549	2	2354,23633	DPCNHSGVCAA(OxM)DAYACNNGPTK
126-36	1267,81519	2	2533,61572	AAPHMTPGQNQY(OxM)G(OxH)DHDDGAPR
126-36	897,209595	2	1792,40466	DA(OxH)MVSSG(OxH)GDA(OxM)DGCR
126-36	1447,6825	1	1446,67517	VTV(OxM)WNAAPA(OxM)PK
126-36	497,262146	2	992,509766	SECCAD(OxH)GR
126-36	1096,5968	2	2191,17896	NSCQCDDVV(OxH)LKGNCHLDYK
126-36	552,292786	2	1102,57104	VYGLNLTLPK
126-36	593,361633	2	1184,70874	DMTAPSSLHVK
126-36	537,280823	1	536,27356	VPHGK
126-36	982,142395	2	1962,27026	AL(OxH)ASGGQAMACCANEPGCR

126-36	222,151718	2	442,288879	GAAPK
126-36	672,953369	2	1343,89221	H(OxM)GPVMNVKTSK
126-36	557,291199	2	1112,56787	TLG(OxH)VKTDVK
126-36	355,068237	2	708,121948	AESFKK
126-22				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-22	1123,54321	1	1122,53589	SFGPGFTGTPR
126-22	1139,53821	1	1138,53088	YSGPG(OxM)TGTPR
126-22	1174,54858	1	1173,54126	TGKQWGDGAVR
126-22	1189,55005	1	1188,54272	ACVGAASGATT(OxH)K
126-22	1299,61914	1	1298,61182	YALAGGYGVDASR
126-23				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-23	2065,99097	1	2064,98364	VANVVAEKTYDK(OxM)PGSNAR
126-23	2615,28955	1	2614,28223	VVCCDPNPTAEKTYDGA(OxM)LQNAR
126-23	2631,29224	1	2630,28491	(OxH)R(OxH)YAVHDAEQTYDQ(OxM)LQNAR
126-24				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-24	1068,54346	1	1067,53613	VGGAVFFTDR
126-24	1102,59619	1	1101,58887	VNMPNAVQVR
126-24	1846,93323	1	1845,9259	ACLGPVTHVGQV(OxM)CYPR
126-24	2103,05811	1	2102,05078	NAASLGSPVTHVG(CamC)GSGGCTDR
126-25				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-25	1101,56726	1	1100,55994	GGGNPAFVVQR
126-26				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-26	1130,50049	1	1129,49316	YLYQDDASR
126-26	1490,67773	1	1489,67041	TKYNKASGNPSPAR
126-26	1599,86792	1	1598,8606	DLPFLKLSM(OxH)VR
126-26	1778,89404	1	1777,88672	WPSWSTNLLDKYLR
126-41	505,082855	2	1008,15118	WTKVAACCK
126-41	492,036407	1	491,029144	DDSR
126-41	503,104218	1	502,096954	WAAR
126-41	597,155151	1	596,147888	LEHAK
126-41	784,919434	2	1567,82434	N(OxW)CGTLVSNASTDGK
126-41	412,753662	2	823,492798	EYGLGGTK
126-41	619,52124	2	1237,02795	SKGPAEN(OxW)CCK
126-41	746,356567	2	1490,69861	VMYNQALPCGGGPGK
126-41	561,787598	2	1121,56067	HMYQETDAK
126-41	550,781494	2	1099,54846	L(OxH)FPTDAQR
126-41	771,786011	2	1541,5575	TPMHP(CamC)AT(OxH)RYR
126-41	576,989929	2	1151,96533	AHAATVRMAPK
126-41	1149,36292	1	1148,35559	DEYECCPYK
126-41	343,20816	2	684,401794	LEPAAGK
126-41	589,232117	1	588,224854	GLANSK
126-41	359,024261	2	716,033997	ANHTFK
126-41	878,32074	2	1754,62695	NNG(OxH)EMLGFAAPDAPAK
126-41	435,769287	2	869,524048	HGV(CamC)VNGK
126-27				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-27	1748,03381	1	1747,02649	AGVMVPLGGLPLAGAPTAR
126-28				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-28	1033,5459	1	1032,53857	AGTAAETATLK
126-28	1071,51001	1	1070,50269	CL(OxH)VFAG(OxH)R
126-28	1093,49146	1	1092,48413	(OxM)PTEGAVASSK
126-28	1826,96472	1	1825,9574	KLPAAGLESSALNLSVTR
126-28	1830,96094	1	1829,95361	SPGAPAGNESSANSGGGGASAK
126-28	1931,96716	1	1930,95984	VGNGNDFLLLYSDGCCNK
126-29				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-29	1126,65125	1	1125,64392	TLPNSLNLVR
126-29	1933,97571	1	1932,96838	TPSNTNPALYQALSTCPR

126-29	1949,9696	1	1948,96228	SQSNTPLALYQALSTLSR
126-29	2120,12964	1	2119,12231	FPDPDAQQ(OxM)LTQAGCPDNR
126-29	2122,90479	1	2121,89746	SSNNLGAQKFLTEAGLFVVK
126-29	2136,14746	1	2135,14014	MNNLDAKQFLTKAGLTAGSR
126-29	2152,13062	1	2151,12329	GRYLNAQQ(OxM)LTQAAVTQSR
126-30				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-30	1101,57507	1	1100,56775	GNNPAFVVGAR

12.2. Sequenzhomologien

Spotnummer 126-01:

laccase2 [*Pleurotus sapidus*]
Length=521

Score = 50.3 bits (111), Expect = 1e-06
Identities = 15/15 (100%), Positives = 15/15 (100%), Gaps = 0/15 (0%)

Query 1 TSNSDVVNLVNPPRR 15
TSNSDVVNLVNPPRR
Sbjct 432 TSNSDVVNLVNPPRR 446

Spotnummer 126-02:

sptrembl|O94219|O94219 Aryl-alcohol oxidase precursor (EC
1.1.3.7).//:sptrembl|O94219|O94219_9AGAR Aryl-alcohol oxidase
precursor (EC 1.1.3.7).//:trembl|AF064069|AF064069_1 gene: "aao";
product: "aryl-alcohol oxidase precursor"; *Pleurotus eryngii*
aryl-alcohol oxidase precursor (aao) gene, complete cds.
//:gp|AF064069|3851524 aryl-alcohol oxidase precursor [*Pleurotus*
eryngii]
Length = 593

Score = 121 (63.8 bits)
Identities = 17/18 (94%), Positives = 17/18 (94%)

Query: 43 FDYLVVGAGNAGNVVAAR 60
FDY -VVGAGNAGNVVAAR
Sbjct: 30 FDYVVVGAGNAGNVVAAR 47

Spotnummer 126-03:

emb|CAJ00406.1| laccase2 [*Pleurotus sapidus*]
Length=521

Score = 43.9 bits (96), Expect = 1e-04
Identities = 13/14 (92%), Positives = 14/14 (100%), Gaps = 0/14 (0%)

Query 3 EVNDGEQAQLVTQD 16
EVNDGEQAQ+VTQD
Sbjct 492 EVNDGEQAQIVTQD 505

Spotnummer 126-04:

sptrembl|Q5W281|Q5W281_9AGAR Carotenoid ester lipase
precursor.//:trembl|AJ810032|AJ810032_1 gene: "lip2"; product:
"carotenoid ester lipase precursor"; *Pleurotus sapidus* mRNA for
carotenoid ester lipase precursor (lip2 gene)
Length = 546

Score = 105 (53.9 bits)
Identities = 14/14 (100%), Positives = 14/14 (100%)

Query: 14 FLGIPYAQPPTGDR 27
FLGIPYAQPPTGDR
Sbjct: 45 FLGIPYAQPPTGDR 58

Score = 98 (50.4 bits)
Identities = 13/13 (100%), Positives = 13/13 (100%)

Query: 1 LPEPIPPYTGTVR 13
LPEPIPPYTGTVR
Sbjct: 62 LPEPIPPYTGTVR 74

Score = 51 (27.1 bits)
Identities = 8/9 (88%), Positives = 8/9 (88%)

Query: 33 GGLGLQDQR 41
G LGLQDQR
Sbjct: 196 GNLGLQDQR 204

Spotnummer 126-05:

Sptrembl|Q8PB28|Q8PB28 Serine protease.//:sptrembl|Q8PB28|Q8PB28_XANCP
Serine protease.//:trembl|AE012229|AE012229_4 gene: "XCC1298";
product: "serine protease"; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*
str. ATCC 33913, section 137 of 460 of the complete genome.
//:gp|AE012229|21112351 serine protease [*Xanthomonas campestris* pv.
campestris str. ATCC 33913]

Score = 48 (26.0 bits)
Identities = 6/7 (85%), Positives = 7/7 (100%)

Query: 8 TGAGYRL 14
TGAGYR+
Sbjct: 106 TGAGYRI 112

Score = 38 (21.0 bits)
Identities = 6/8 (75%), Positives = 6/8 (75%)

Query: 29 RVGVAAAA 36
RVGVA A
Sbjct: 472 RVGVASGA 479

Score = 34 (18.9 bits)
Identities = 5/5 (100%), Positives = 5/5 (100%)

Query: 18 GVVDS 22
GVVDS
Sbjct: 113 GVVDS 117

Spotnummer 126-06:

Peptid 1:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 33.3 bits (71), Expect = 0.16
Identities = 10/12 (83%), Positives = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)

Query 3 SNTNPALYQALS 14
SNTNPA+YQA+S
Sbjct 29 SNTNPAIYQAIS 40

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 33.3 bits (71), Expect = 0.16
Identities = 10/12 (83%), Positives = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)

Query 3 SNTNPALYQALS 14
SNTNPA+YQA+S
Sbjct 29 SNTNPAIYQAIS 40

Peptid 2:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 38.0 bits (82), Expect = 0.007
Identities = 11/13 (84%), Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

Query 1 VLMLDAKQFLTQA 13
V+MLDA+QFLTQA
Sbjct 162 VMMLDAQQFLTQA 174

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 38.0 bits (82), Expect = 0.007
Identities = 11/13 (84%), Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

Query 1 VLMLDAKQFLTQA 13
V+MLDA+QFLTQA
Sbjct 162 VMMLDAQQFLTQA 174

Peptid 3:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 38.4 bits (83), Expect = 0.005
Identities = 12/13 (92%), Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

Query 4 LDAQQFLTKAGLT 16
LDAQQFLT+AGLT
Sbjct 165 LDAQQFLTQAGLT 177

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 38.4 bits (83), Expect = 0.005
Identities = 12/13 (92%), Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

Query 4 LDAQQFLTKAGLT 16
LDAQQFLT+AGLT
Sbjct 165 LDAQQFLTQAGLT 177

Spotnummer 126-10:

dbj|BAF63441.1| alcohol oxidase [*Pichia glucozyma*]
Length=276

Score = 23.1 bits (47), Expect = 194
Identities = 6/8 (75%), Positives = 6/8 (75%), Gaps = 0/8 (0%)

Query 4 MNFADHNC 11
MNF DH C
Sbjct 155 MNFQDHYC 162

dbj|BAF63446.1| alcohol oxidase [*Pichia trehalophila*]
Length=276

Score = 23.1 bits (47), Expect = 194
Identities = 6/8 (75%), Positives = 6/8 (75%), Gaps = 0/8 (0%)

Query 4 MNFADHNC 11
MNF DH C
Sbjct 157 MNFQDHYC 164

gb|AAV66466.1| alcohol oxidase B [*Pichia sp.* BZ159]
Length=664

Score = 23.1 bits (47), Expect = 194
Identities = 6/8 (75%), Positives = 6/8 (75%), Gaps = 0/8 (0%)

Query 4 MNFADHNC 11
MNF DH C
Sbjct 305 MNFQDHYC 312

Spotnummer 126-11:

Swissnew|P81055|PLMP_PLEOS Peptidyl-Lys metalloendopeptidase (EC 3.4.24.20)
(MEP) (POME).//:swiss|P81055|PLMP_PLEOS Peptidyl-Lys
metalloendopeptidase (EC 3.4.24.20) (MEP) (POME) [*Pleurotus ostreatus*].
Length = 168

Score = 103 (54.9 bits)
Identities = 16/19 (84%), Positives = 16/19 (84%)

Query: 1 NGGTDDHVYGGTGAQPCAR 19
NGGTDDHVYGG GAQ AR
Sbjct: 126 NGGTDDHVYGGAGAQLAR 144

Spotnummer 126-12:

Sptrembl|Q7MCC2|Q7MCC2 Zinc metalloprotease,
vibriolysin.//:sptrembl|Q7MCC2|Q7MCC2_VIBVY Zinc metalloprotease,
vibriolysin.//:trembl|BA000038|BA000038_1465 gene: "VVA1465";
product: "Zinc metalloprotease, vibriolysin"; *Vibrio vulnificus*
YJ016 DNA, chromosome II, complete sequence.
//:gp|AP005350|37201670 Zinc metalloprotease, vibriolysin [*Vibrio*
vulnificus YJ016]
Length = 636

Score = 58 (31.3 bits)
Identities = 7/9 (77%), Positives = 8/9 (88%)

Query: 2 RPYRFGNSE 10
RPYR+GN E
Sbjct: 597 RPYRYGNNE 605

sptrembl|O06694|O06694 Metalloprotease.//:sptrembl|O06694|O06694_VIBVU
Metalloprotease.//:trembl|U50548|VVU50548_1 product:
"metalloprotease"; *Vibrio vulnificus* metalloprotease gene,
complete cds. //:gp|U50548|2114339 metalloprotease [*Vibrio*
vulnificus]
Length = 606

Score = 58 (31.3 bits)
Identities = 7/9 (77%), Positives = 8/9 (88%)

Query: 2 RPYRFGNSE 10
RPYR+GN E
Sbjct: 570 RPYRYGNNE 578

sptrembl|Q8GB52|Q8GB52 Extracellular subtilisin-like serine proteinase (EC 3.4.21.-) //:sptrembl|Q8GB52|Q8GB52_9VIBR Extracellular subtilisin-like serine proteinase (EC 3.4.21.-) //:treml|AF521587|AF521587_1 product: "extracellular subtilisin-like serine proteinase precursor"; *Vibrio sp.* PA-44 extracellular subtilisin-like serine proteinase precursor, gene, complete cds. //:gp|AF521587|27464257 extracellular subtilisin-like serine proteinase precursor [*Vibrio sp.* PA-44]
Length = 530

Score = 56 (30.3 bits)
Identities = 8/9 (88%), Positives = 8/9 (88%)

Query: 2 RPYRFGNSE 10
RPYR GNSE
Sbjct: 491 RPYRSGNSE 499

Spotnummer 126-13:

sptrembl|Q6FAB2|Q6FAB2 Putative methanol dehydrogenase regulatory protein //:sptrembl|Q6FAB2|Q6FAB2_ACIAD Putative methanol dehydrogenase regulatory protein //:tremlnew|CR543861|CR543861_2016 product: "putative methanol dehydrogenase regulatory protein"; *Acinetobacter sp.* ADP1 complete genome //:treml|CR543861|CR543861_2016 product: "putative methanol dehydrogenase regulatory protein"; *Acinetobacter sp.* ADP1 complete genome
Length = 298

Score = 49 (26.5 bits)
Identities = 6/7 (85%), Positives = 6/7 (85%)

Query: 20 TTHRMNV 26
T HRMNV
Sbjct: 277 TAHRMNV 283

Score = 37 (20.5 bits)
Identities = 4/6 (66%), Positives = 5/6 (83%)

Query: 13 EHLFEF 18
+H FEF
Sbjct: 89 DHVFEF 94

Spotnummer 126-14:

Sptrembl|Q8S1B1|Q8S1B1 Serine/threonine kinase protein-like //:sptrembl|Q8S1B1|Q8S1B1_ORYSA Serine/threonine kinase protein-like //:tremlnew|AP003334|AP003334_14 gene: "B1114B07.16"; product: "serine/threonine kinase protein-like"; *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1, BAC clone:B1114B07. //:treml|AP003334|AP003334_14 gene: "B1114B07.16"; product: "serine/threonine kinase protein-like";

Oryza sativa (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 1,
BAC clone:B1114B07. //:gp|AP003334|20161070 B1114B07.10 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]
Length = 196

Score = 35 (19.8 bits)
Identities = 6/8 (75%), Positives = 6/8 (75%)

Query: 5 TSAGGATK 12
T AGGA K
Sbjct: 162 TGAGGAAK 169

Score = 31 (17.7 bits)
Identities = 4/4 (100%), Positives = 4/4 (100%)

Query: 1 GEDF 4
GEDF
Sbjct: 140 GEDF 143

Spotnummer 126-16:

emb|CAJ00406.1| laccase2 [*Pleurotus sapidus*]
Length=521

Score = 52.4 bits (116), Expect = 3e-07
Identities = 17/20 (85%), Positives = 19/20 (95%), Gaps = 0/20 (0%)

Query 6 FMQTGSVPLPDTGLLNGVGR 25
F QTGSVP+PDTGL+NGVGR
Sbjct 181 FFQTGSVPIPDGLINGVGR 200

emb|CAJ00406.1| laccase2 [*Pleurotus sapidus*]
Length=521

Score = 40.9 bits (89), Expect = 8e-04
Identities = 15/20 (75%), Positives = 18/20 (90%), Gaps = 0/20 (0%)

Query 7 FFKTGTVPLPDTGEPNGVGR 26
FF+TG+VP+PDTG NGVGR
Sbjct 181 FFQTGSVPIPDGLINGVGR 200

Score = 14.6 bits (27), Expect = 67251
Identities = 4/5 (80%), Positives = 4/5 (80%), Gaps = 0/5 (0%)

Query 18 TGEPN 22
TG PN
Sbjct 293 TGNPN 297

Spotnummer 126-17:

sptrembl|Q96TR4|Q96TR4 Laccase precursor.//:sptrembl|Q96TR4|Q96TR4_PLEOS
Laccase precursor.//:trembl|AJ344434|POS344434_1 gene: "poxa3";
product: "laccase"; *Pleurotus ostreatus* poxa3 gene for laccase
//:gp|AJ344434|15594026 laccase [*Pleurotus ostreatus*]
Length = 521

Score = 133 (67.4 bits)
Identities = 19/21 (90%), Positives = 20/21 (95%)

Query: 17 RAPLTGGNPTGNPNLDVSLIR 37
RAPLTGGNP GNPNLD+SLIR
Sbjct: 284 RAPLTGGNPAGNPNLDSLIR 304

Score = 123 (62.5 bits)
Identities = 17/17 (100%), Positives = 17/17 (100%)

Query: 1 GGPLVPYAVINVEQGKR 17
GGPLVPYAVINVEQGKR
Sbjct: 203 GGPLVPYAVINVEQGKR 219

Spotnummer 126-20:

Sptrembl|Q88SI7|Q88SI7 Iron dependent peroxidase
(Putative).//:sptrembl|Q88SI7|Q88SI7_LACPL Iron dependent
peroxidase (Putative).//:trembl|AL935262|AL935262_40 gene:
"lp_3430"; product: "iron dependent peroxidase (putative)";
Lactobacillus plantarum strain WCFS1 complete genome; segment 11/11
//:gp|AL935262|28272600 iron dependent peroxidase (putative)
[*Lactobacillus plantarum* WCFS1]
Length = 317

Score = 55 (29.8 bits)
Identities = 8/8 (100%), Positives = 8/8 (100%)

Query: 65 SNPAAGNT 72
SNPAAGNT
Sbjct: 254 SNPAAGNT 261

Spotnummer 126-21:

Sptrembl|Q96TR4|Q96TR4 Laccase precursor.//:sptrembl|Q96TR4|Q96TR4_PLEOS
Laccase precursor.//:trembl|AJ344434|POS344434_1 gene: "poxa3";
product: "laccase"; *Pleurotus ostreatus* poxa3 gene for laccase
//:gp|AJ344434|15594026 laccase [*Pleurotus ostreatus*]
Length = 521

Score = 97 (51.2 bits)
Identities = 15/20 (75%), Positives = 16/20 (80%)

Query: 7 FFKTGTVPLPDTGEPNGVGR 26
FF TG VP+PDTG NGVGR
Sbjct: 181 FFQTGVSVIPDTGLINGVGR 200

Score = 32 (18.1 bits)
Identities = 3/4 (75%), Positives = 4/4 (100%)

Query: 157 CHLD 160
CH+D
Sbjct: 472 CHID 475

Spotnummer 126-25:

ref|XP_752501.1| aldehyde reductase II [*Aspergillus fumigatus* Af293]
emb|CAE47862.1| oxidoreductase, putative [*Aspergillus fumigatus*]
gb|EAL90463.1| aldehyde reductase II [*Aspergillus fumigatus* Af293]
gb|EDP56369.1| aldehyde reductase II [*Aspergillus fumigatus* A1163]

Length=352

GENE ID: 3510217 AFUA_1G11360 | aldehyde reductase II
[*Aspergillus fumigatus* Af293] (10 or fewer PubMed links)

Score = 22.3 bits (45), Expect = 350
Identities = 6/6 (100%), Positives = 6/6 (100%), Gaps = 0/6 (0%)

Query 4 NPAFVV 9
NPAFVV
Sbjct 196 NPAFVV 201

ref|XP_001264629.1| aldehyde reductase II [*Neosartorya fischeri* NRRL 181]
gb|EAW22732.1| aldehyde reductase II [*Neosartorya fischeri* NRRL 181]
Length=352

GENE ID: 4592113 NFIA_014220 | aldehyde reductase II
[*Neosartorya fischeri* NRRL 181]

Score = 22.3 bits (45), Expect = 350
Identities = 6/6 (100%), Positives = 6/6 (100%), Gaps = 0/6 (0%)

Query 4 NPAFVV 9
NPAFVV
Sbjct 196 NPAFVV 201

Spotnummer 126-27:

ref|XP_001874193.1| carotenoid ester lipase precursor [*Laccaria bicolor* S238N-H82]
gb|EDR15985.1| carotenoid ester lipase precursor [*Laccaria bicolor* S238N-H82]
Length=556

Score = 25.7 bits (53), Expect = 33
Identities = 8/11 (72%), Positives = 10/11 (90%), Gaps = 0/11 (0%)

Query 9 GLPLAGAPTAR 19
G+PLAG+PT R
Sbjct 18 GIPLAGSPTVR 28

Spotnummer 126-29:

Peptid 1:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 30.8 bits (65), Expect = 0.98
Identities = 9/10 (90%), Positives = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)

Query 1 TLPNSLNLVR 10
TLPNS+NLVR
Sbjct 152 TLPNSINLVR 161

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 30.8 bits (65), Expect = 0.98
Identities = 9/10 (90%), Positives = 10/10 (100%), Gaps = 0/10 (0%)

Query 1 TLPNSLNLVR 10
TLPNS+NLVR
Sbjct 152 TLPNSINLVR 161

Peptid 2:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 33.3 bits (71), Expect = 0.16
Identities = 10/12 (83%), Positives = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)

Query 3 SNTNPALYQALS 14
SNTNPA+YQA+S
Sbjct 29 SNTNPAIYQAIS 40

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 33.3 bits (71), Expect = 0.16
Identities = 10/12 (83%), Positives = 12/12 (100%), Gaps = 0/12 (0%)

Query 3 SNTNPALYQALS 14
SNTNPA+YQA+S
Sbjct 29 SNTNPAIYQAIS 40

Peptid 3:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 29.1 bits (61), Expect = 3.1
Identities = 12/17 (70%), Positives = 14/17 (82%), Gaps = 2/17 (11%)

Query 3 SNT-PLALYQALSTLSR 18
SNT P A+YQA+S LSR
Sbjct 29 SNTNP-AIYQAISVLSR 44

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 29.1 bits (61), Expect = 3.1
Identities = 12/17 (70%), Positives = 14/17 (82%), Gaps = 2/17 (11%)

Query 3 SNT-PLALYQALSTLSR 18
SNT P A+YQA+S LSR
Sbjct 29 SNTNP-AIYQAISVLSR 44

Peptid 4:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 28.6 bits (60), Expect = 4.2
Identities = 9/10 (90%), Positives = 9/10 (90%), Gaps = 0/10 (0%)

Query 5 DAQQMLTQAG 14
DAQQ LTQAG
Sbjct 166 DAQQFLTQAG 175

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 28.6 bits (60), Expect = 4.2
Identities = 9/10 (90%), Positives = 9/10 (90%), Gaps = 0/10 (0%)

Query 5 DAQQMLTQAG 14
DAQQ LTQAG
Sbjct 166 DAQQFLTQAG 175

Peptid 5:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 27.8 bits (58), Expect = 7.5
Identities = 9/12 (75%), Positives = 11/12 (91%), Gaps = 0/12 (0%)

Query 5 LGAQKFLTEAGL 16
L AQ+ FLT+AGL
Sbjct 165 LDAQQFLTQAGL 176

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 27.8 bits (58), Expect = 7.5
Identities = 9/12 (75%), Positives = 11/12 (91%), Gaps = 0/12 (0%)

Query 5 LGAQKFLTEAGL 16
L AQ+ FLT+AGL
Sbjct 165 LDAQQFLTQAGL 176

Peptid 6:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 33.7 bits (72), Expect = 0.12
Identities = 11/13 (84%), Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

Query 4 LDAQQFLTKAGLT 16
LDA+QFLT+AGLT
Sbjct 165 LDAQQFLTQAGLT 177

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 33.7 bits (72), Expect = 0.12
Identities = 11/13 (84%), Positives = 13/13 (100%), Gaps = 0/13 (0%)

Query 4 LDAQQFLTKAGLT 16
LDA+QFLT+AGLT
Sbjct 165 LDAQQFLTQAGLT 177

Peptid 7:

emb|CAL64898.1| POXA3b laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 37.1 bits (80), Expect = 0.012
Identities = 12/16 (75%), Positives = 14/16 (87%), Gaps = 0/16 (0%)

Query 4 LNAQQMLTQAAVTQSR 19
L+AQQ LTQA + TQSR
Sbjct 165 LDAQQFLTQAGLTQSR 180

emb|CAL64897.1| POXA3a laccase small subunit [*Pleurotus ostreatus*]
Length=186

Score = 37.1 bits (80), Expect = 0.012

Identities = 12/16 (75%), Positives = 14/16 (87%), Gaps = 0/16 (0%)

Query 4 LNAQQMLTQAAVTQSR 19
L+AQQ LTQA + TQSR
Sbjct 165 LDAQQFLTQAGLTQSR 180

Spotnummer 126-30:

ref|XP_001264629.1| aldehyde reductase II [*Neosartorya fischeri* NRRL 181]
gb|EAW22732.1| aldehyde reductase II [*Neosartorya fischeri* NRRL 181]
Length=352

GENE ID: 4592113 NFIA_014220 | aldehyde reductase II
[*Neosartorya fischeri* NRRL 181]

Score = 26.9 bits (56), Expect = 14
Identities = 8/9 (88%), Positives = 8/9 (88%), Gaps = 0/9 (0%)

Query 2 NNPAFVGA 10
NNPAFVV A
Sbjct 195 NNPAFVVNA 203

ref|XP_752501.1| aldehyde reductase II [*Aspergillus fumigatus* Af293]
emb|CAE47862.1| oxidoreductase, putative [*Aspergillus fumigatus*]
gb|EAL90463.1| aldehyde reductase II [*Aspergillus fumigatus* Af293]
gb|EDP56369.1| aldehyde reductase II [*Aspergillus fumigatus* A1163]
Length=352

GENE ID: 3510217 AFUA_1G11360 | aldehyde reductase II
[*Aspergillus fumigatus* Af293] (10 or fewer PubMed links)

Score = 26.9 bits (56), Expect = 14
Identities = 8/9 (88%), Positives = 8/9 (88%), Gaps = 0/9 (0%)

Query 2 NNPAFVGA 10
NNPAFVV A
Sbjct 195 NNPAFVVNA 203