

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt

„Erstmaliger technischer Einsatz von Pilzsekretomen zur effizienten stofflichen Verwertung von Stroh- und Holzresten“

gefördert durch die



Deutsche Bundesstiftung Umwelt

Aktenzeichen: 13211-32

Verfasser: Prof. Dr. H. Zorn, I. Schüttmann (Justus-Liebig Universität Gießen); Prof. Dr. M. Hofrichter, Prof. Dr. C. Liers (IHI Zittau); Dr. M. Suckow, Dr. M. Piontek, Dr. M. Piontek (ARTES Biotechnology, Langenfeld); Prof. Dr. G. König, Dr. S. Lott, Dr. S. Kehraus (Universität Bonn); Dr. S. Müllner, Dr. A. Wattenberg (Protagen AG, Dortmund); Dr. P. Lorenz, Dr. K. Langfelder, Dr. K. Nguyen (AB Enzymes, Darmstadt)

Projektbeginn: 01.05.2009

Laufzeit : 31.08.2011

Gießen/Zittau/Bonn/Dortmund/Langenfeld 2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Anlass und Zielsetzung.....	5
2 Ergebnisse.....	9
2.1 Charakterisierung des verwendeten Rapsstrohs	9
2.2 Sekretomanalysen	9
2.2.1 Sekretomanalyse von <i>P. sapidus</i> in Sub- und Emerskulturen.....	9
2.2.2 Sekretomanalyse von <i>X. polymorpha</i> in Sub- und Emerskulturen	23
2.3 Isolierung extrazellulärer Enzyme	29
2.3.1 Isolierung einer polyvalenten Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>	29
2.3.2 Isolierung der Feruloyl-Esterase aus <i>X. polymorpha</i>	32
2.3.3 Isolierung weiterer Enzyme aus Emerskulturen von <i>X. polymorpha</i> auf Rapsstroh.....	35
2.4 Charakterisierung der isolierten extrazellulären Enzyme.....	37
2.4.1 Charakterisierung einer isolierten polyvalenten Peroxidase aus <i>P. sapidus</i> ..	37
2.4.2 Charakterisierung einer isolierten Feruloyl-Esterase aus <i>X. polymorpha</i>	40
2.5 Umsetzungen von Modellsubstraten.....	44
2.5.1 Umsetzungen von Modellsubstraten mittels polyvalenter Peroxidase und durch Kulturüberstände von <i>P. sapidus</i>	44
2.6 Klonierung lignolytischer Enzyme und heterologe Expression in <i>E. coli</i>	52
2.6.1 Klonierung und heterologe Expression einer Arylalkoholoxidase (AAO) aus <i>P.</i> <i>sapidus</i>	52
2.6.2 Klonierung einer GDS(L)-Lipase aus <i>P. sapidus</i>	59
2.6.3 Klonierung einer DyP-Typ Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>	63
2.6.4 Auswahl weiterer Enzyme aus <i>P. sapidus</i>	66
2.7 Heterologe Expression in <i>H. polymorpha</i>	67
2.7.1 Identifikation Peroxidase-positiver rekombinanter <i>H. polymorpha</i> -Stämme durch Aktivitätsmessungen in Kulturüberständen	67
2.7.2 SDS-PAGE/Western Blot-Analysen von Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen rekombinanter <i>H. polymorpha</i> -Stämme	68
2.7.3 Identifikation Esterase-positiver rekombinanter <i>H. polymorpha</i> Stämme mittels elektrophoretischer Methoden.....	72
2.8 Heterologe Expressionen in <i>Trichoderma reesei</i>	75
2.8.1 Heterologe Expression einer Dyp-Typ Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>	75

2.8.2	Heterologe Expression einer GDS(L)-Lipase aus <i>P. sapidus</i>	78
2.9	Charakterisierung einer heterolog in <i>T. reesei</i> exprimierten Dyp-Typ Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>	82
2.10	<i>In-vitro</i> Umsetzungen mit isolierten Enzymen.....	86
2.10.1	<i>In-vitro</i> Umsetzungen von Lignocellulose durch <i>P. sapidus</i> Enzyme	86
2.10.2	<i>In-vitro</i> Umsetzungen von Lignocellulose durch <i>X. polymorpha</i> Enzyme	95
3	Ökologische und ökonomische Bewertung	102
4	Zusammenfassung	109
5	Geplante Veröffentlichungen	114
6	Material und Methoden	115
6.1	Vorbehandlung des Substrats (Rapsstroh).....	115
6.2	Kulturführung	115
6.3	Gewinnung und Anreicherung extrazellulärer Proteine.....	117
6.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	118
6.4.1	Bestimmung der Enzymaktivitäten: <i>P. sapidus</i>	118
6.4.2	Bestimmung der Enzymaktivität: <i>X. polymorpha</i>	118
6.5	Proteinbiochemische und massenspektrometrische/kinetische Untersuchungen.....	119
6.5.1	2D Gelelektrophorese	119
6.5.2	Proteinidentifizierung.....	119
6.6	Reinigung Extrazellulärer Enzyme	120
6.6.1	Reinigung der polyvalenten Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>	120
6.6.2	Reinigung der Feruloyl-Esterase aus <i>Xylaria polymorpha</i>	121
6.7	Enzymatische Umsetzungen	122
6.7.1	Zellfreie Umsetzung von Modellsubstraten mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>	122
6.7.2	Zellfreie Umsetzungen von Substraten mit gereinigter Esterase aus <i>X. polymorpha</i>	122
6.7.3	Umsetzungen von Lignin organosolv durch eine Dyp-Typ Peroxidase	122
6.7.4	<i>In-vitro</i> Umsetzungen von Rapsstroh und Pappelholz mit isolierten Enzymen	123
6.7.5	Upscaling der <i>in-vitro</i> Umsetzungen	123
6.7.6	Reduzierende Zucker.....	124
6.7.7	Gesamtphenolgehalt	124

6.7.8	Glucosegehalt	125
6.7.9	HPLC Analytik der Umsetzungen	126
6.7.10	HPSEC.....	126
6.7.11	LC/MS-Messungen	126
6.7.12	GC/MS-Messungen.....	127
6.7.13	NMR/ MALDI-TOF Messungen	127
6.8	Synthese von Adlerol.....	128
6.9	Klonierung verschiedener Enzyme aus <i>P. sapidus</i>	130
6.9.1	Isolierung der Gesamt-RNA	130
6.9.2	Primerableitung	130
6.9.3	Herstellung der Klonierungsvektoren	131
6.9.4	Ligation mittels TA-TOPO-Cloning	132
6.9.5	Heterologe Expression einer AAO aus <i>P. sapidus</i>	133
6.10	Heterologe Expression der polyvalenten Peroxidase aus <i>P. sapidus</i> in <i>H. polymorpha</i> (Artes Biotechnology)	134
6.10.1	Fusionsgendesign	134
6.10.2	Gensynthesen	135
6.10.3	Konstruktion von <i>H. polymorpha</i> -Expressionsplasmiden	135
6.10.4	Generierung von rekombinanten <i>H. polymorpha</i> -Stämmen	138
6.10.5	Induktion und Screening rekombinanter Stämme	139
6.10.6	Peroxidaseaktivitätstest	141
6.10.7	SDS-PAGE/Western Blot	141
6.11	Heterologe Expression einer Peroxidase und einer Lipase aus <i>P. sapidus</i> in <i>T. reesei</i>	141
6.11.1	Gensynthese	141
6.11.2	Plasmidkonstruktion	142
6.11.3	Protoplasten Transformation	142
6.11.4	Enzymatische Plattenassay und Schüttelkolben-Kultivierung	142
6.11.5	Optimierung der Expression im Fermenter.....	143
7	Literatur	144
8	Anhang	150
10	Abkürzungsverzeichnis	157

1 Anlass und Zielsetzung

Lignocellulosen (Stroh, Holz) sind im Unterschied zu den begrenzten fossilen Rohstoffen Erdöl und Kohle aufgrund der Primärproduktion höherer Pflanzen in nahezu unerschöpflicher Menge vorhanden. Die Hauptbestandteile der pflanzlichen Zellwand bilden ein komplexes, widerstandsfähiges Netzwerk verschiedener Polymere, das chemisch nur schwer angreifbar ist. Um an die verschiedenen, ökonomisch interessanten Grundbestandteile zu gelangen, muss das Lignocellulosegerüst zunächst aufgeschlossen werden. Vor dem Hintergrund des Nachhaltigkeitsprinzips erscheint es vielversprechend, sich des natürlichen Abbaupotentials von Mikroorganismen zu bedienen, die es im Laufe der Evolution gelernt haben, die einzelnen Bestandteile der Lignocellulose als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Die effektivsten Lignocellulose zersetzenden Organismen finden sich unter den filamentösen Pilzen. Die Grundlage für einen effektiven Ligninabbau bilden verschiedenen Oxidoreduktasen, v.a. Hämperoxidasen wie die Lignin-Peroxidase (LiP), die Mangan-Peroxidase (MnP), die polyvalent Peroxidase (VP) aber auch die erst kürzlich beschriebenen aromatischen Peroxygenasen (APOs). „Klassische“ Peroxidasen, wie die LiP, besitzen ein hohes Redoxpotential, das ihnen u.a. die Oxidation nicht-phenolischer, aromatischer Ligninanteile (β -O-4-Strukturen) bei niedrigem pH (~ 3) erlaubt. Nicht-phenolische Aromaten kommen z.B. in Form von Arylglycerol- β -arylethern im Holz und Stroh vor und sind eines der häufigsten Strukturelemente im Ligninpolymer. Durch die LiP-katalysierte primäre Oxidation entsteht aus einer entsprechenden Modellverbindung (Abbildung 1) ein instabiles Arylradikalkation-, das unter Spaltung der C_{α} - C_{β} -Bindung in Veratraldehyd, Guaiakol und Glykolaldehyd zerfällt (Adler 1977; Hammel *et al.* 1985; Kirk *et al.* 1986).

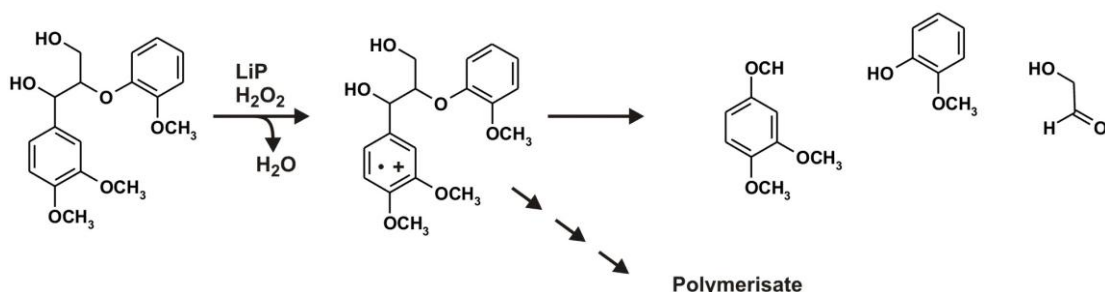


Abbildung 1: Reaktionsmechanismus der Oxidation eines Arylglycerol- β -arylethers durch LiP (modifiziert nach Hammel *et al.* 1985; Kirk *et al.* 1986, Kirk und Farrell 1987).

Ein zweiter Mechanismus der Spaltung von Arylglycerol- β -arylethern durch neuartige aromatische Peroxygenasen (APOs) wurde erst kürzlich am IHI Zittau beschrieben und mechanistisch aufgeklärt (Ullrich 2005, Kinne *et al.* 2009; Ullrich *et al.* 2009). Unter neutralen oder leicht alkalischen Bedingungen (pH 7 - 8) hydroxyliert die APO zunächst eine Methoxy- oder Ethoxygruppe des Moleküls (vorzugsweise die in *para*-Position am unteren Ring; Abbildung 2). Es entsteht ein instabiles Hemiacetal, das spontan zum entsprechenden Phenol hydrolysiert und durch einen wiederholten enzymatischen Angriff unter intermediärer Bildung eines Phenoxy-Radikals zu entsprechenden Hydrochinon-Derivaten und Carbonyl-Verbindungen gespalten wird (Kinne *et al.* 2009; Ullrich *et al.* 2009).

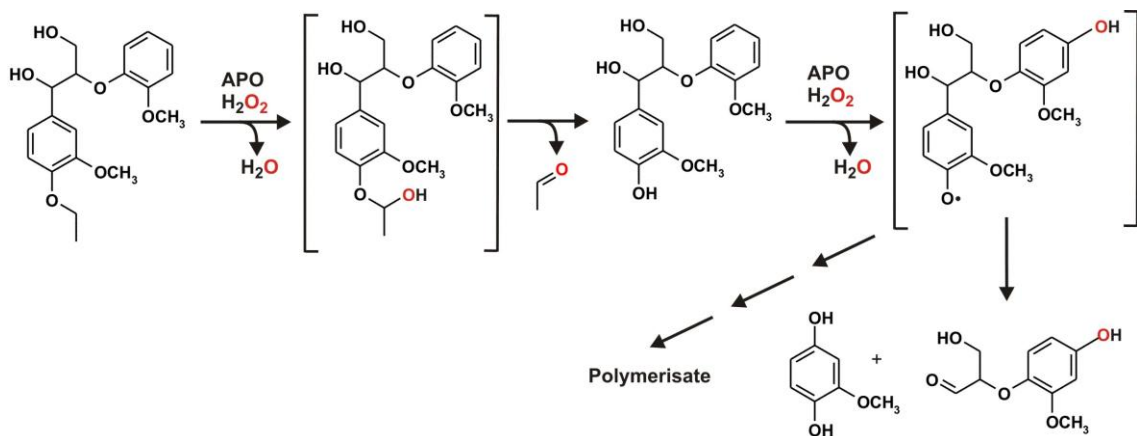


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der Oxidation eines Arylglycerol- β -arylethers durch die aromatische Peroxygenase des Pilzes *Agrocybe aegerita* (AaeAPO; Ullrich *et al.* 2009).

Es gibt inzwischen eindeutige Hinweise, dass die Oxidation und Spaltung derartiger Ligninmodell-Verbindungen noch durch eine weitere, erst kürzlich entdeckte Gruppe von Peroxidasen katalysiert wird. Diese sogenannten DyP-Typ Peroxidasen (*dye decolorizing peroxidases*) sind offensichtlich im Pilzreich weit verbreitet (Sugano 2009), katalytisch außerordentlich vielseitig und stabil (Pühse *et al.* 2009, Liers *et al.* 2010) und sie scheinen Ligninstrukturen analog der Lignin-Peroxidase (LiP) anzugreifen (Liers *et al.* 2010). Diese Annahme sollte im Projektverlauf verifiziert und anhand weiterer Ligninmodell-Substanzen und polymerer Ligninpräparate getestet werden. Dabei bietet sich methodisch besonders die Größenausschluss-Chromatographie (HPSEC) an, um die durch den enzymatischen Angriff von Peroxidasen und Hydrolasen (z.B. gereinigte Feruloyl-Esterase von *X. polymorpha*) freigesetzten aromatischen Lignocellulose-Fragmente aus natürlichen

Hölzern und Strohmaterialien nachzuweisen (Abbildung 3, Hofrichter *et al.* 2001; Liers *et al.* 2006; Liers *et al.* 2010; bisher unveröffentlichte Ergebnisse).

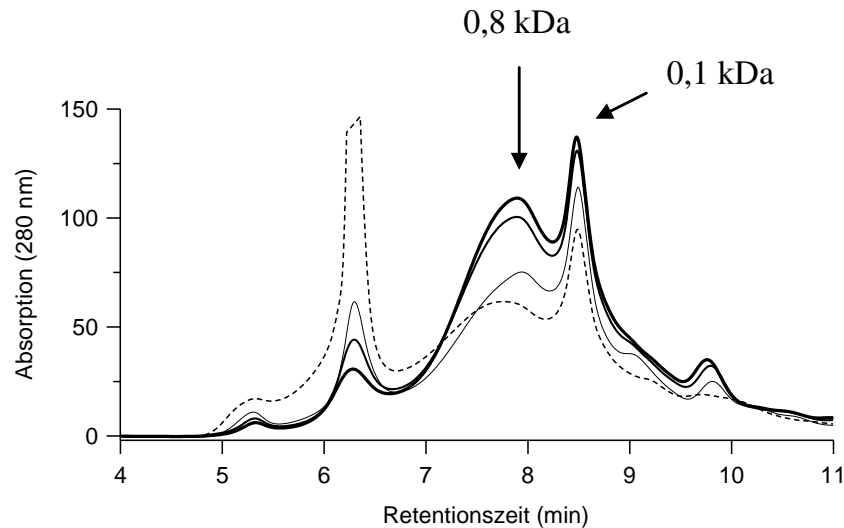


Abbildung 3: Kinetik der Freisetzung wasserlöslicher aromatisch geprägter Lignocellulose-Fragmente (HPSEC-Elutionsprofil), die aus Stroh nach *In-vitro*-Behandlung mit einer Mangan-Peroxidase (MnP) entstanden sind; dünne Linie - nach 12 h, mittlere Linie – nach 24 h, dicke Linie – nach 36 h; gestrichelte Linie – Kontrolle ohne Enzym (Liers *et al.* 2010, bisher unveröffentlicht).

Extrazelluläre hydrolytische Pilzenzyme als weitere wesentliche Bestandteile des lignolytischen Systems haben in erster Linie die Aufgabe, Zucker aus pflanzlichen Polymeren (Hemizellulosen, Zellulose) als Kohlenstoff- und Energiequelle für den Pilz verfügbar zu machen. Darüber hinaus gibt es Indizien dafür, dass Hydrolasen auch aktiv am Abbau des Lignocellulose-Komplexes (LCK), d. h. an der Zerstörung des Holzgefüges, beteiligt sind. Spezielle Esterasen (EC 3.1.1.-) katalysieren die Hydrolyse von Esterbindungen zwischen den Hemicellulosen und den aromatischen Säurederivaten der Monolignole. So sind Feruloyl-Esterasen (EC 3.1.1.73) an der Spaltung von Esterbindungen (Diferulat-Brücken) zwischen dem Arabinoxylan und dem Lignin beteiligt (Mac Kenzie und Bilous 1988, Iiyama *et al.* 1994, Li und Helm 1995, Kroon *et al.* 2000, Rumbold *et al.* 2003). Bisher wurden jedoch nur wenige Enzyme, die Esterbindungen von Hydroxyzimtsäure-Derivaten hydrolysieren können, beschrieben und ihre Rolle bei der Zerlegung des LCK ist noch unklar (Williamson *et al.* 1998a, Williamson *et al.* 1998b). Um die enorme Syntheseleistung der Natur künftig besser stofflich nutzen zu können, sollte das hocheffiziente extrazelluläre Enzymsystem, das „Sekretom“, welches höhere Pilze (Basidiomyceten und Ascomyceten; Abbildung 4) zum Aufschluss von Lignocellulosen einsetzen, qualitativ, quantitativ und zeitaufgelöst erfasst werden.

Erste zeitabhängige Sekretomstudien haben gezeigt, welche Enzyme von *P. sapidus* und *X. polymorpha* am Ligninabbau beteiligt sind. In einer einjährigen Vorphase des Projektes wurden die Arbeiten zunächst auf eine „polyvalente Peroxidase“ aus *P. sapidus* sowie eine von *X. polymorpha* sekretierte Esterase fokussiert. Anhand von niedermolekularen Modells substraten wurden die jeweiligen Transformationsprodukte analytisch charakterisiert und quantitative Daten erarbeitet.

Der Projektansatz kombiniert die moderne Bioverfahrenstechnik mit der Proteomanalytik und der DNA-Rekombinationstechnik, um den in der Natur ablaufenden Kohlenstoffkreislauf effizient nachzubilden und gezielt für die Verwertung von nachwachsenden Rohstoffen einzusetzen. Neuartig ist die vergleichende Untersuchung und verfahrenstechnische Kombination biochemisch unterschiedlicher extrazellulärer Enzymbestecke aus Holz bewohnenden Asco- und Basidiomyceten sowie deren gezielte Nutzung für biotechnologische Applikationen.



Abbildung 4: Basidiomycet *Pleurotus sapidus* (links) und Ascomycet *Xylaria polymorpha* (rechts).

Damit wird die Grundlage für die Entwicklung nachhaltiger und ressourcenschonender Technologien zur stofflichen und energetischen Verwertung nachwachsender Roh- und Reststoffe geschaffen.

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung des verwendeten Rapsstrohs

Das als Substrat eingesetzte Rapsstroh besaß bezüglich der organolöslichen Inhaltsstoffe (7,4%) und des säureunlöslichen Gehaltes an polymeren Bestandteilen (11,8%) eine für Süßgräser (*Poaceae*) typische Zusammensetzung (Tabelle 1). Allerdings können diese Parameter in Abhängigkeit von Herkunft oder Alter der Pflanze variieren.

Tabelle 1: Charakterisierung des Rapsstrohs und Vergleich mit Literaturangaben (* Valmaseda *et al.* 1991; ** Pan und Sano 2005); n. b.: nicht bestimmt.

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)**	n. b.
organolösliche flüchtige Inhaltsstoffe			5,7
organolösliche nicht- flüchtige Inhaltsstoffe	5,3 – 9,3*	3,1 (± 0,1)**	1,7
Trockenmasse	n. b.	n. b.	92,5
Fettgehalt	n. b.	n. b.	2,7

2.2 Sekretomanalysen

2.2.1 Sekretomanalyse von *P. sapidus* in Sub- und Emerskulturen

Während eines Kultivierungszeitraumes von 18 Tagen (Submerskulturen) beziehungsweise 14 Wochen (Emerskulturen) wurde der Gesamtproteingehalt im Überstand bzw. Extrakt mittels Bradford-Test ermittelt. Die Proteinkonzentrationen im Überstand/Extrakt erreichten Maximalwerte nach elf Tagen (120 mg L^{-1}) bzw. 14 Wochen (110 mg L^{-1}) (Abbildung 5).

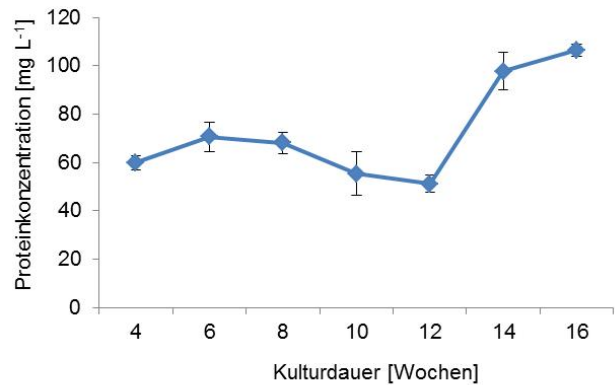
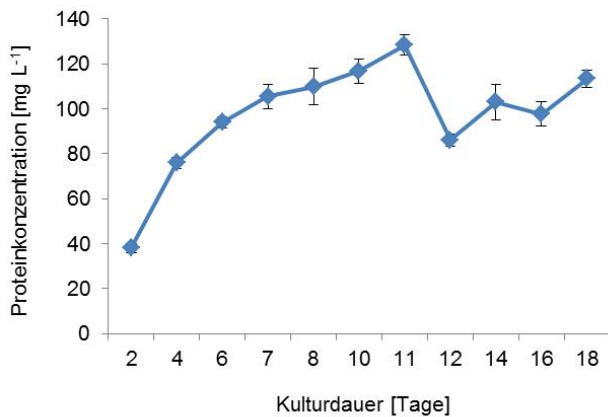


Abbildung 5: Proteingehalt in Kulturüberständen bzw. Extrakten von *P. sapidus*; Submers- (links) und Emerskulturen (rechts).

Die sekretierten Enzymaktivitäten wurden in beiden Kultursystemen quantitativ erfasst (experimentelle Durchführung s. 6.4.1). Alle Aktivitätsmessungen wurden als Mehrfachbestimmungen von mindestens zwei unabhängigen biologischen Proben vorgenommen.

In den Submerskulturen waren bereits nach einem Kulturtag hohe Laccase- ($\sim 1.200 \text{ U L}^{-1}$) und Peroxidaseaktivitäten ($\sim 230 \text{ U L}^{-1}$) zu detektieren. Die Esteraseaktivität stieg während der ersten Kulturtag kontinuierlich an und erreichte ihr Maximum an Tag 7 ($\sim 160 \text{ U L}^{-1}$) (Abbildung 6).

Zur detaillierteren Erfassung und Charakterisierung der sekretierten Peroxidaseaktivitäten wurden unterschiedliche Assays eingesetzt. Als Summenparameter diente die Aktivität gegenüber ABTS in Anwesenheit von H_2O_2 . Manganperoxidaseaktivität wurde über die Oxidation von Syringol durch Mn^{3+} und polyvalente Peroxidaseaktivität über den oxidativen Abbau von β -Carotin erfasst (6.4.1). Die höchste Manganperoxidaseaktivität ($\sim 3 \text{ U L}^{-1}$) wurde an den ersten beiden Kulturtagen, die maximale polyvalente Peroxidaseaktivität ($\sim 8 \text{ U L}^{-1}$) am neunten Kulturtag sekretiert (Abbildung 7).

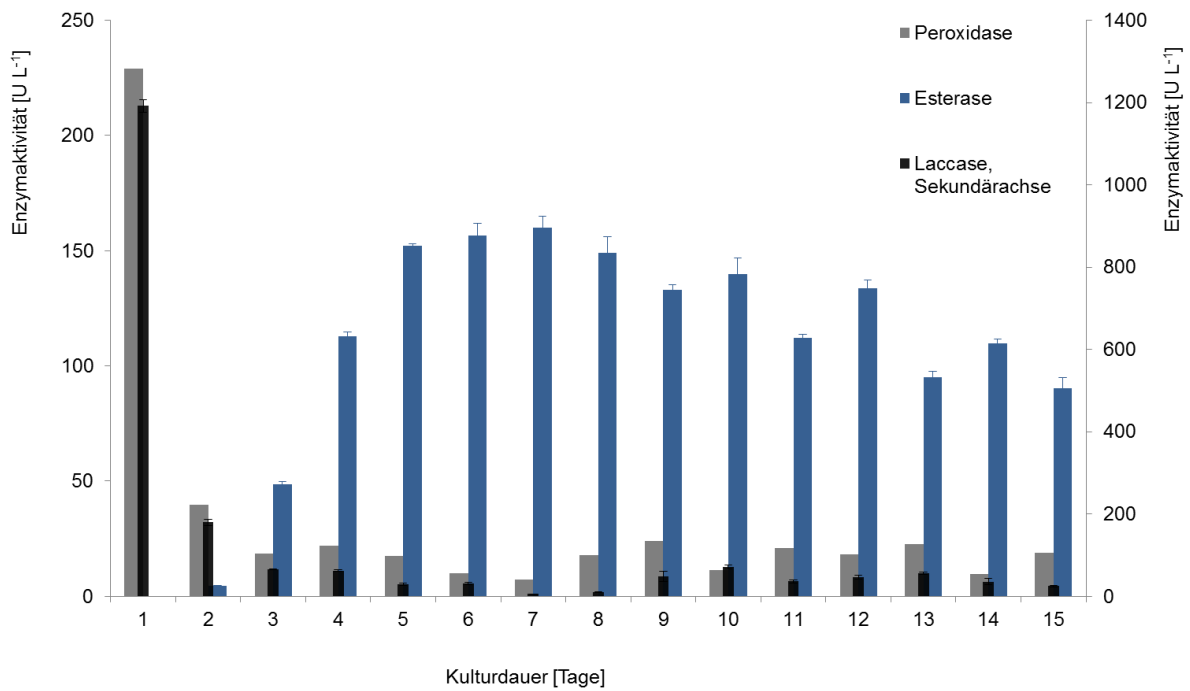


Abbildung 6: Laccase- (schwarz), Peroxidase- (grau) und Esteraseaktivität (blau) in Submerskulturen von *P. sapidus*.

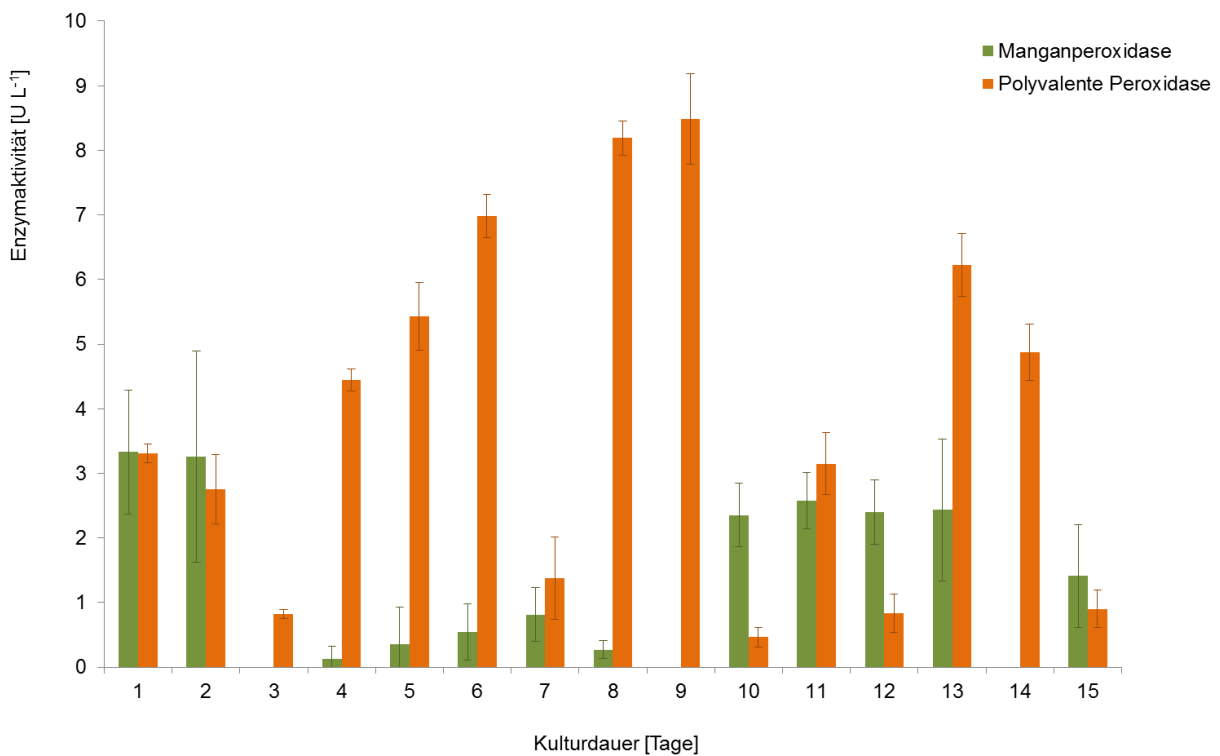


Abbildung 7: Manganperoxidaseaktivität (grün) und Aktivität der polyvalenten Peroxidase (orange) in Submerskulturen von *P. sapidus*.

Die Arylalkoholoxidaseaktivität stieg im Kulturverlauf an und erreichte ab dem 10. Kulturtag ein Plateau bei $\sim 200 \text{ U L}^{-1}$ (Abbildung 8).

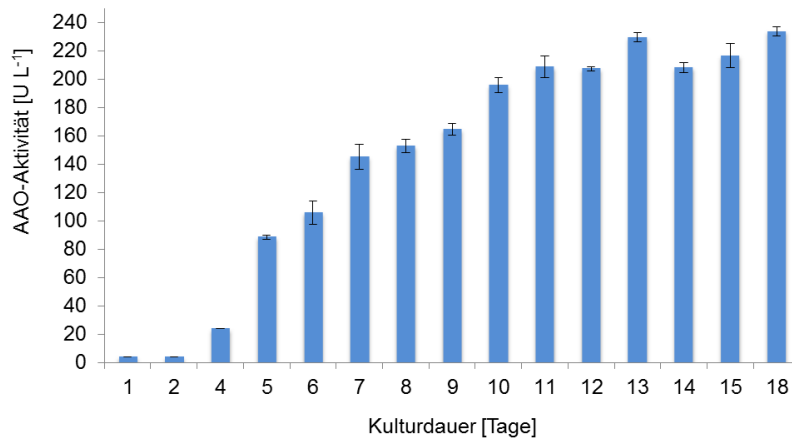


Abbildung 8: AAO-Aktivität in Submerskulturen von *P. sapidus* (in SNL-Medium).

Insgesamt signifikant geringere Gesamtaktivitäten wurden in den Extrakten der Emerskulturen gemessen. Maximale Esteraseaktivitäten ($\sim 17 \text{ U L}^{-1}$) wurden nach 4 und 8 Kulturwochen detektiert. Zusätzlich wurde eine gleichbleibende Lipaseaktivität von $\sim 3 \text{ U L}^{-1}$ gemessen. Die Manganperoxidaseaktivität blieb während der gesamten Emerskultivierung nahezu konstant ($5 - 7 \text{ U L}^{-1}$) (Abbildung 9).

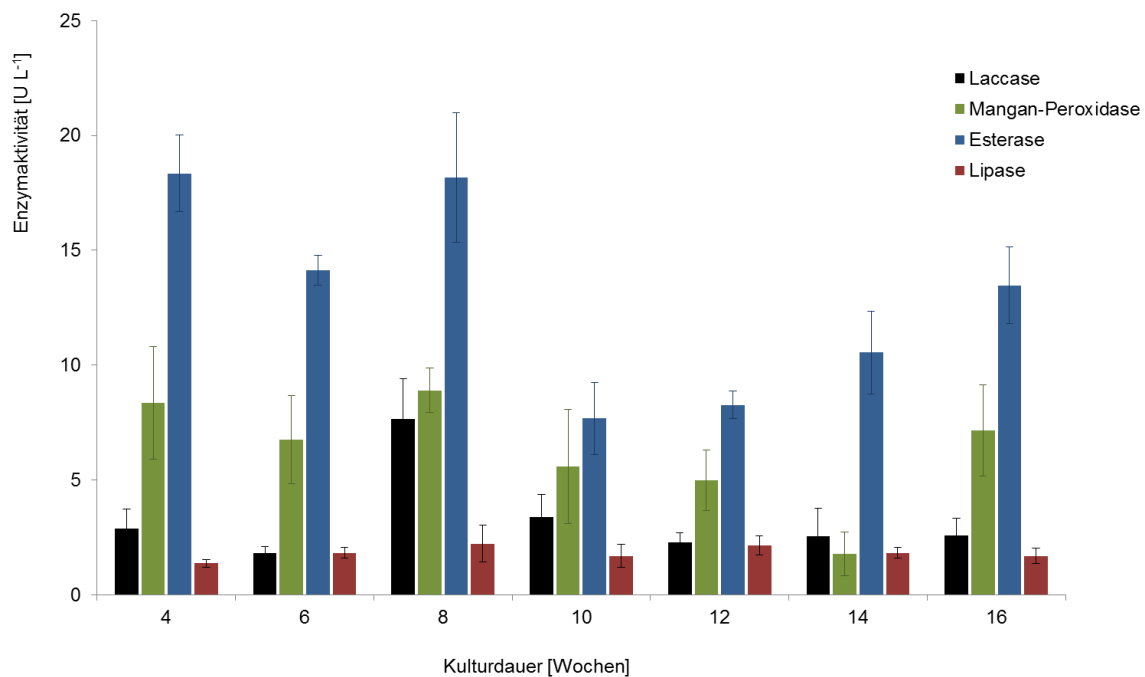


Abbildung 9: Laccase- (schwarz), Mangan-Peroxidase- (grün), Esterase- (blau) und Lipaseaktivität (rot) in Emerskulturen von *P. sapidus*.

Die Aktivität der polyvalenten Peroxidase stieg erst gegen Ende der Kultivierung auf $0,8 \text{ U L}^{-1}$ an, während das Maximum der Peroxidaseaktivität ($\sim 1,1 \text{ U L}^{-1}$) nach acht Wochen ermittelt wurde (Abbildung 10).

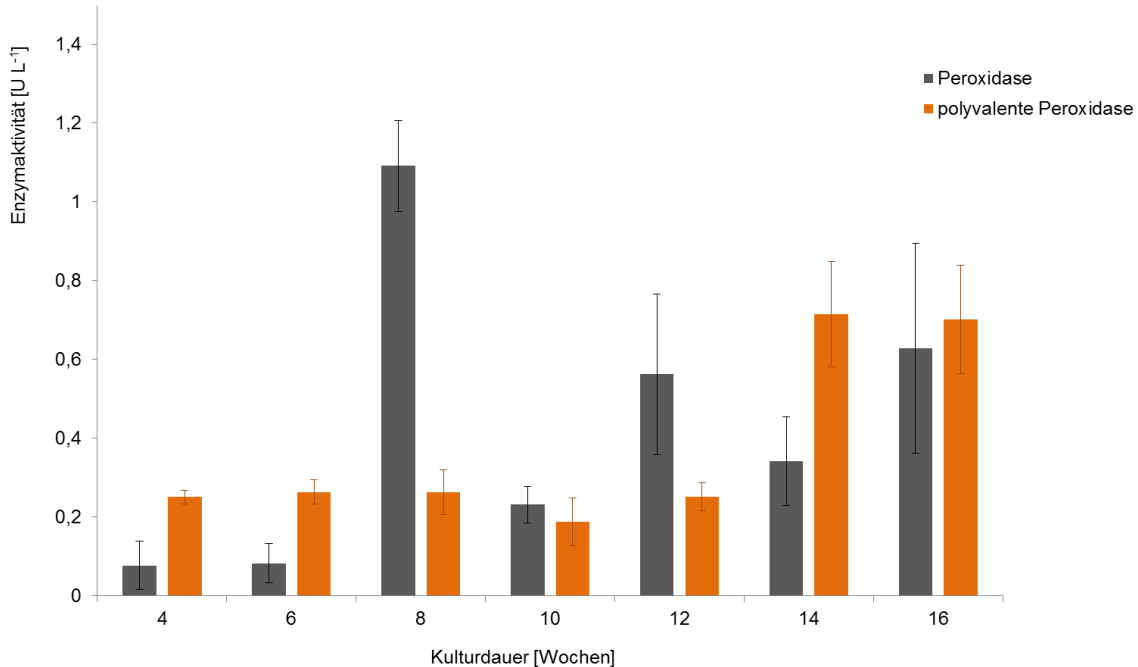


Abbildung 10: Peroxidaseaktivität (grau) und Aktivität der polyvalenten Peroxidase (orange) in Emerskulturen von *P. sapidus*.

Die o.g. Enzymaktivitäten wurden in den Kulturen 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 Abbildung 11 zusammengefasst, wobei die maximale Aktivität eines Enzyms gleich 100% gesetzt wurde.

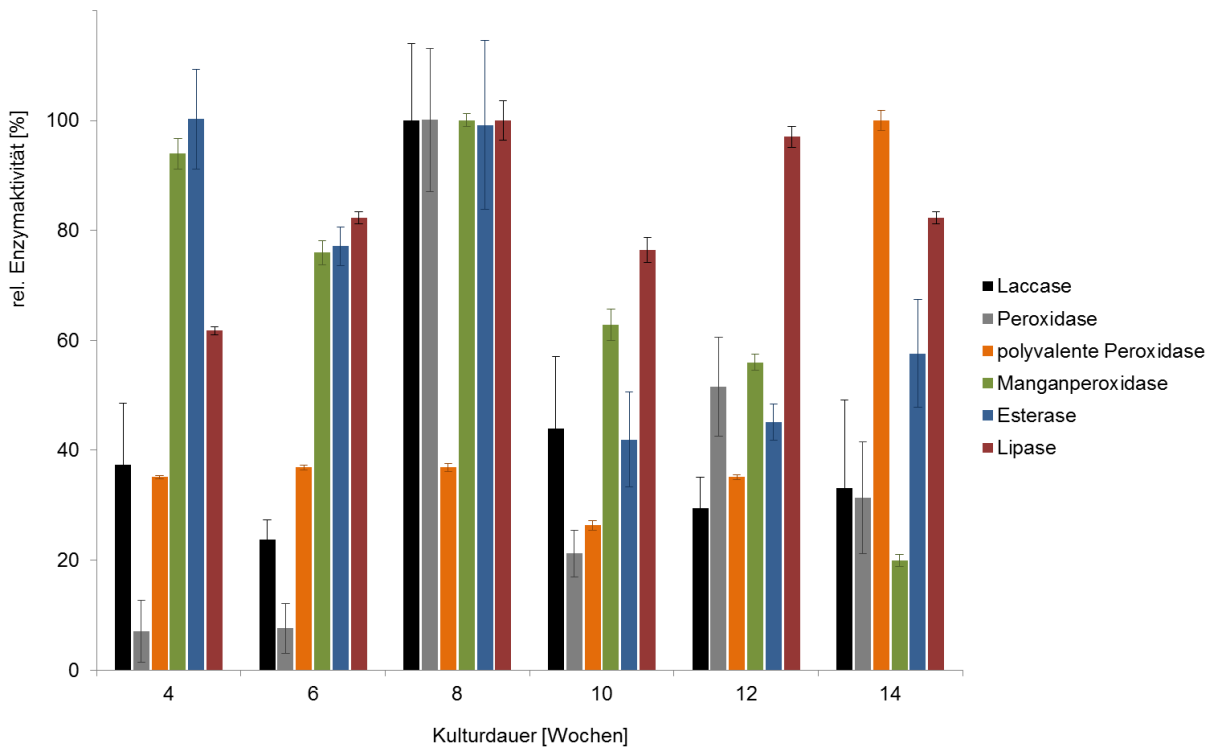
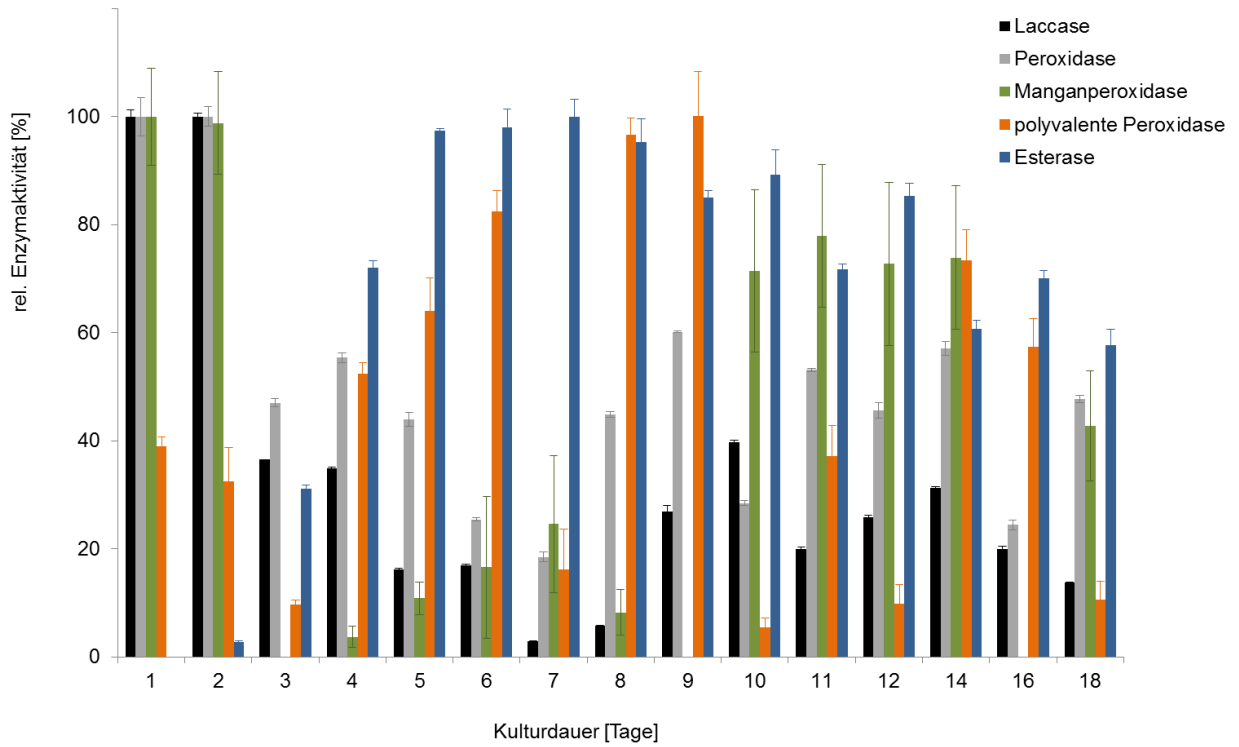


Abbildung 11: Vergleich der Enzymaktivitäten in Submers- (oben) und Emerskulturen (unten) von *P. sapidus*.

Für die massenspektrometrische Untersuchung des Sekretoms wurden Zellpellets wie in 6.5.1 beschrieben vorbereitet und dem Projektpartner Protagen zur Verfügung gestellt. Die Zellpellets wurden dann wie unter 6.5 dargestellt vorbereitet und per Massenspektrometrie (MALDI-MS/MS) analysiert. Die einzelnen Proteinspots wurden –wo möglich– über Datenbanksuchen identifiziert. Eine relative Quantifizierung der Spots erlaubte es, für jedes Protein der Probe eine eigene Kinetik zu erstellen.

Die Enzymproben aus Kulturüberständen von *P. sapidus* ergaben 2D Gele mit guter Auflösung und wohldefinierten Spots (Abbildung 12).

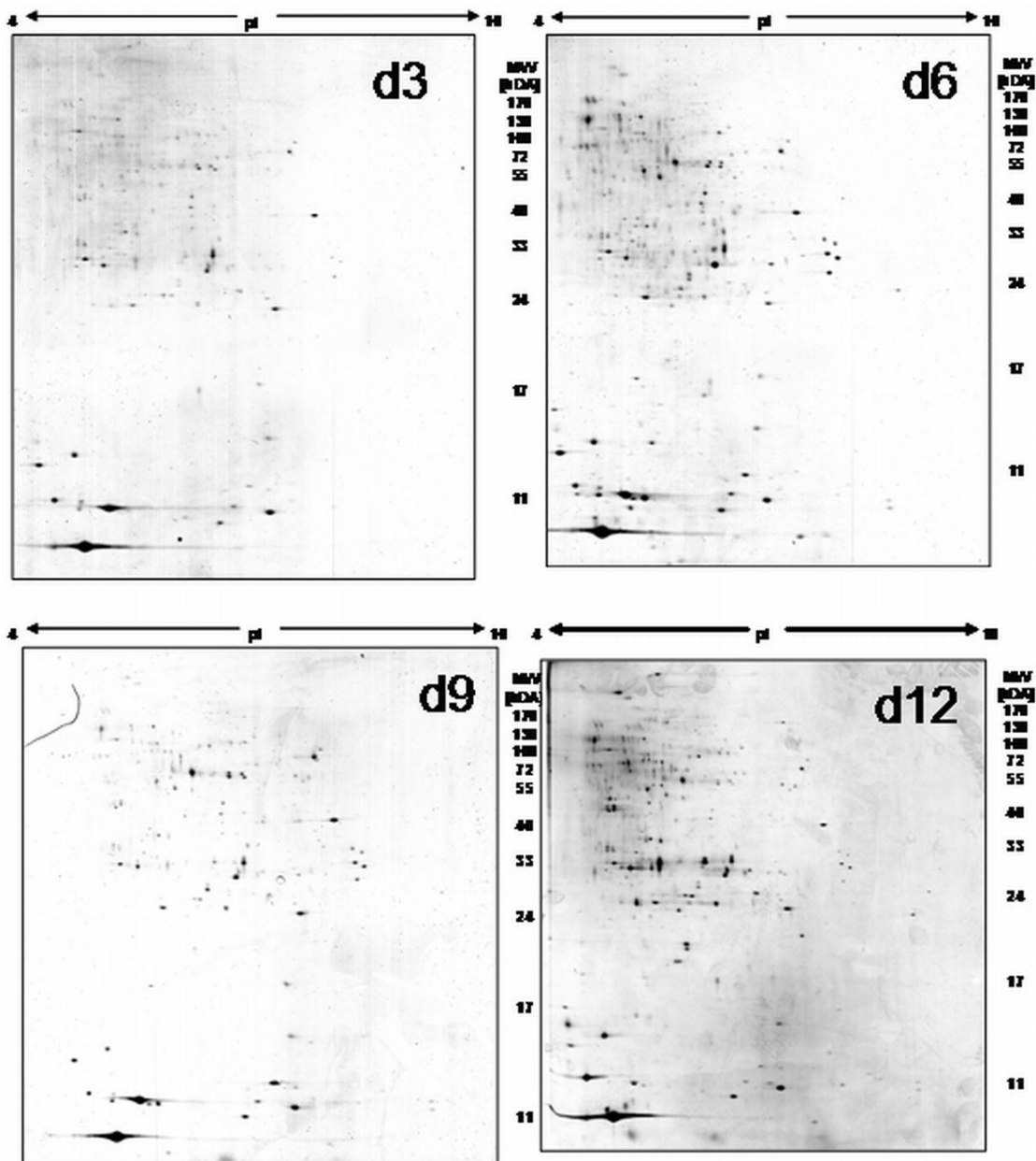


Abbildung 12: 2D Gele von Kulturüberständen (Submerskulturen) von *P. sapidus* nach 3, 6, 9 und 12 Kulturtagen.

Die sekretierten Proteine verteilen sich über den gesamten Molekulargewichtsbereich und decken einen größeren pI Bereich ab als die Proben aus dem Ascomyceten *X. polymorpha* (vgl. Abbildung 17: 2D Gele des Sekretoms von *X. polymorpha* (Kulturüberstände nach 6, 12, 15 und 18 Kulturtagen)).

Um den Konzentrationsverlauf der einzelnen Proteinspots zu messen, wurde für jeden Spot eine Kinetik (Spotvolumen vs. Zeit) erstellt. Da viele Spots gleiche oder ähnliche Kinetiken aufwiesen, wurden Spots mit einer ähnlich verlaufenden Kinetik über eine Clusteranalyse zusammengefasst. Mittels Software wurden hierbei 7 verschiedene Cluster erstellt (Abbildung 13).

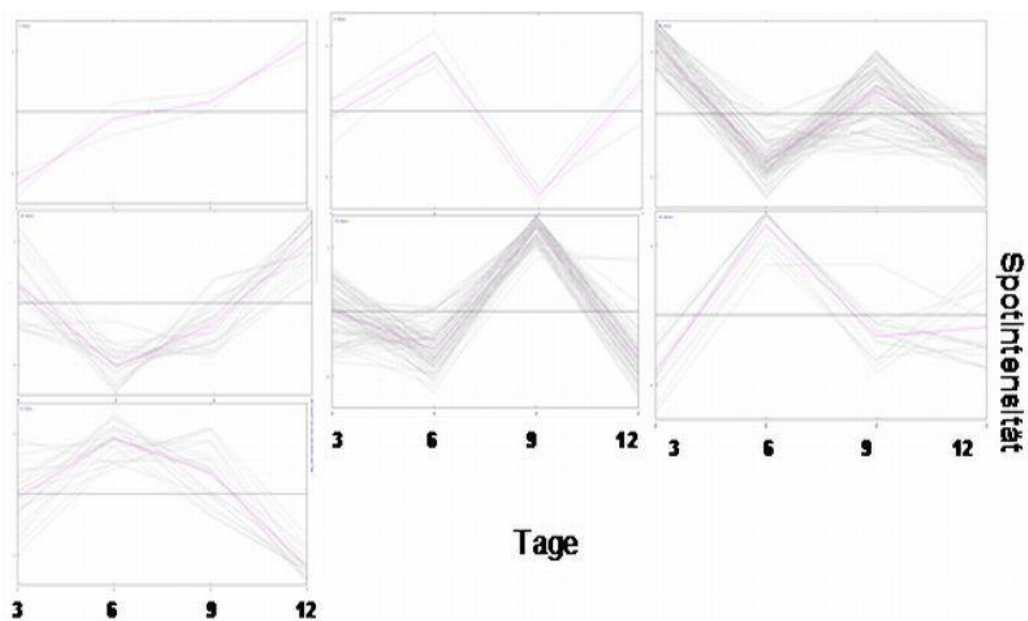


Abbildung 13: Zusammenfassung der verschiedenen Spotkinetiken während der Submerskultur von *P. sapidus* auf Rapsstroh.

Für die Identifizierung mittels Massenspektrometrie wurde eine Mischprobe der Einzelzeitpunkte hergestellt, um alle vorkommenden Spots in einem Gel aufzutrennen (Abbildung 14). Die Mehrzahl der Proteine konnte per Datenbanksuche identifiziert werden, da das Genom des nahe verwandten Pilzes *P. ostreatus* hinreichende Homologie aufweist (Tabelle 2).

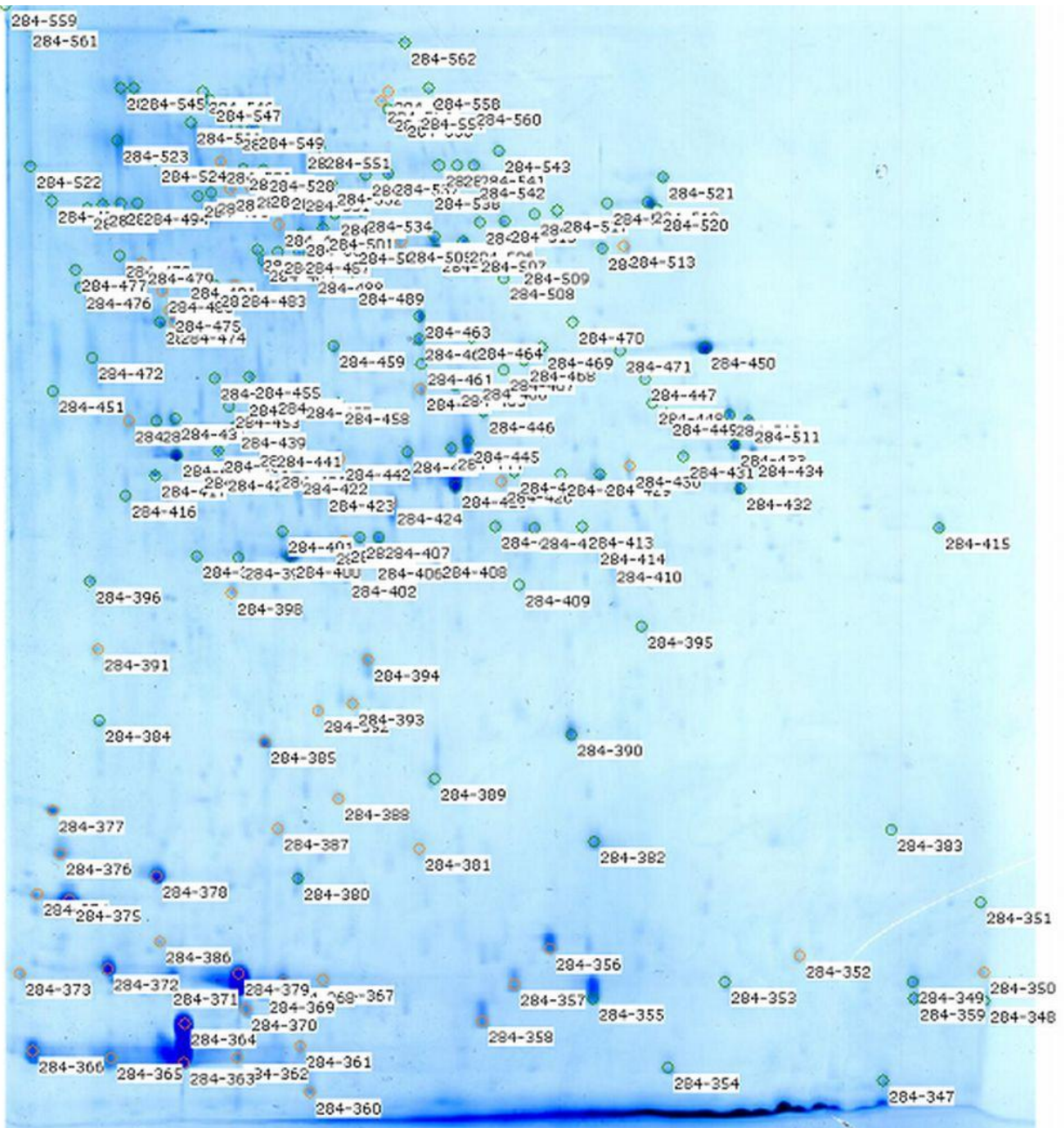
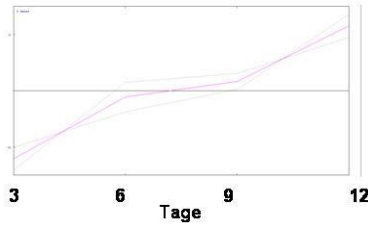
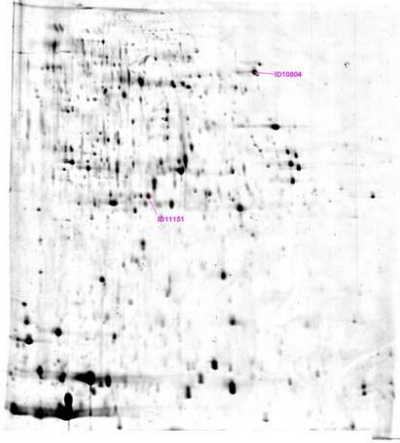
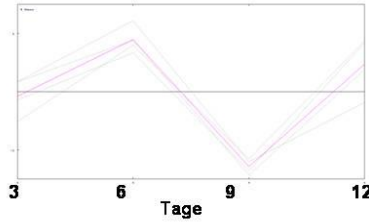
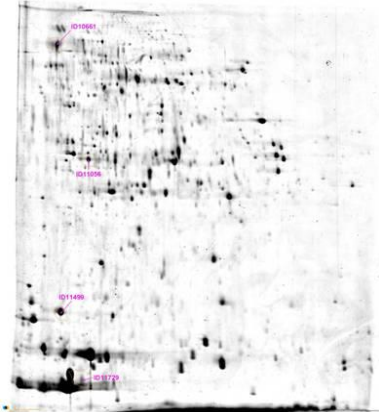


Abbildung 14: 2D Gel mit allen mittels MALDI-MS/MS analysierten Proteinspots. Insgesamt wurden aus diesem Gel 214 Proteinspots vermessen.

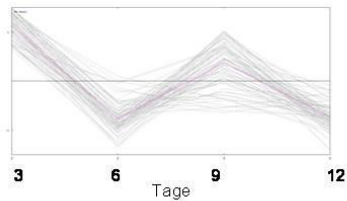
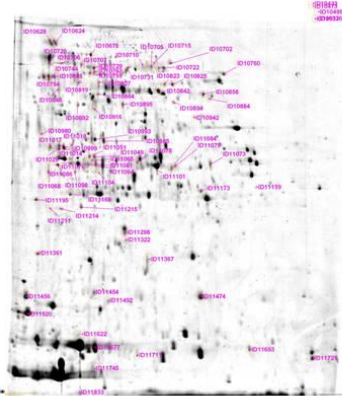
Die identifizierten Proteinspots wurden im nächsten Schritt wieder den einzelnen Clustern zugeordnet (Abbildung 15).



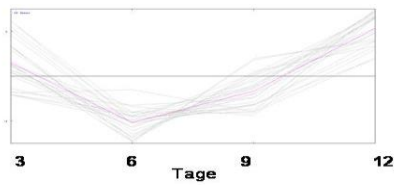
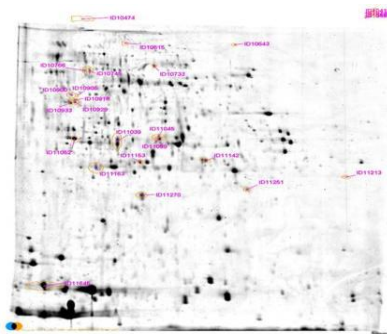
Rhamnogalacturonase B, N-terminal; pfam09284
endocellulase [Polyporus arcularius]



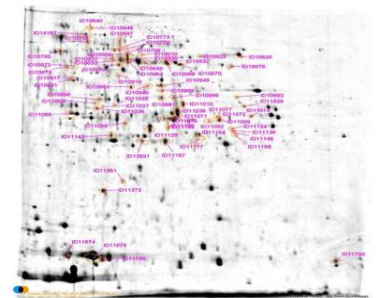
cellulose 1,4-beta-cellobiosidase precursor [Pleurotus sp. 'Florida']



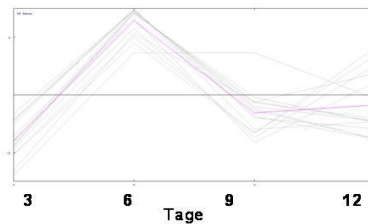
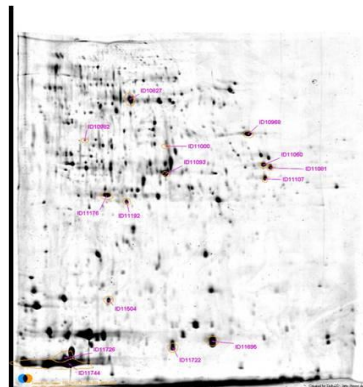
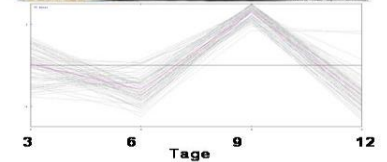
- AF143814_1 aryl-alcohol oxidase precursor [Pleurotus pulmonarius]
- carotenoid ester lipase precursor [Pleurotus sapidus]
- cellobiohydrolase II [Lentinus sajor-caju]
- copper radical oxidase [Phanerochaete chrysosporium]
- eliciting plant response-like protein [Hypocrea atroviridis]
- endoglucanase [Volvariella volvacea]
- exported esterase [Xanthomonas campestris pv. campestris str. B100]
- glycoside hydrolase family 15 protein [Laccaria bicolor S238N-H82]
- glycoside hydrolase family 16 protein [Laccaria bicolor S238N-H82]
- glycoside hydrolase family 5 protein [Laccaria bicolor S238N-H82]
- glycoside hydrolase family 72 protein [Laccaria bicolor S238N-H82]
- hypothetical FAD dependent oxidoreductase [Postia placenta Mad-698-R]
- Alpha-L-arabinofuranosidase C-terminus; c101412
- Pectate lyase; c101593
- Aldose 1-epimerase; c100476
- Serine carboxypeptidase S26; pfam05577
- hypothetical protein MPER_09655 [Moniliophthora perniciosa FA553];
- laccase [Pleurotus ostreatus]
- laccase precursor [Pleurotus sapidus]
- mannanase [Armillariella tabescens]
- peptidase 1 [Pleurotus ostreatus]
- POXA3a laccase small subunit [Pleurotus ostreatus]
- predicted protein [Laccaria bicolor S238N-H82];
- 3-carboxymuconate cyclase [Carbohydrate transport and metabolism]; COG2706
- RecName: Full=Rhamnogalacturonase B;
- thaumatin-like protein [Laccaria bicolor S238N-H82]



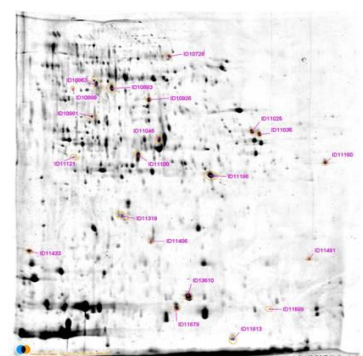
arabinosidase [Armillariella tabescens]
 carotenoid ester lipase precursor [Pleurotus sapidus]
 Glycosyl hydrolases family 43; cl09152
 Pectate lyase; cl01593
 Serine carboxypeptidase; pfam00450
 RecName: Full=Exoglucanase 3;



acetyl xylan esterase [Volvariella volvacea]
 aryl-alcohol oxidase precursor [Pleurotus eryngii]
 cellobiohydrolase II [Lentinus sajor-caju]
 cellobiohydrolase II-I [Volvariella volvacea]
 endo-1,6-alpha-mannosidase [Laccaria bicolor S238N-H82]
 endoglucanase [Volvariella volvacea]
 galactan 1,3-beta-galactosidase [Phanerochaete chrysosporium]
 glyoxal oxidase [Laccaria bicolor S238N-H82]
 hypothetical FAD dependent oxidoreductase [Postia placenta Mad-698-R]
 hypothetical protein [Pleurotus ostreatus]
 Rhamnogalacturonase B, N-terminal; pfam09284
 Pectate lyase; pfam03211
 Glycosyl hydrolase family 61; pfam03443
 Pectate lyase; cl01593
 Aldose 1-epimerase; cl00476
 peptidase M28 [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]
 polygalacturonase precursor [Pyrenophora tritici-repentis Pt-1C-BFP]



acetyl xylan esterase [Volvariella volvacea]
 carbohydrate esterase family 8 protein [Laccaria bicolor S238N-H82]
 cellobiohydrolase II [Lentinus sajor-caju]
 glycoside hydrolase family 12 protein [Laccaria bicolor S238N-H82]
 Pectate lyase; cl01593
 Glycosyl hydrolase family 61; pfam03443
 peptidase 1 [Pleurotus ostreatus]



carbohydrate esterase family 8 protein [Laccaria bicolor S238N-H82]
 cellobiohydrolase II [Lentinus sajor-caju]
 Cip2 [Hypocrea jecorina]
 endoglucanase [Phanerochaete chrysosporium]
 endoglucanase [Volvariella volvacea]
 Pectate lyase; cl01593
 Aminopeptidase
 hypothetical protein MPER_09655 [Monilophthora pemiciosa FA553];
 Fungalsin metallopeptidase (M36); pfam02128
 putative cyclophilin [Pleurotus sp. 'Florida']
 ubiquitin [Clavisporea lusitanae ATCC 42720]

Abbildung 15: Zusammenfassung von 2D Gelspots, Kinetik und Proteinidentifizierung.

Die Analyse der Daten wird dadurch erschwert, dass einzelne Enzymklassen nicht nur in einem, sondern in mehreren Proteinspots identifiziert wurden. Daher kann eine Enzymklasse in mehreren Spots unterschiedliche Kinetiken aufweisen (Abbildung 16). Verantwortlich dafür können die Sekretion von Isoenzymen sowie unterschiedliche posttranslationale Modifikationen (insbesondere bzgl. der Glycosidierung) sein.

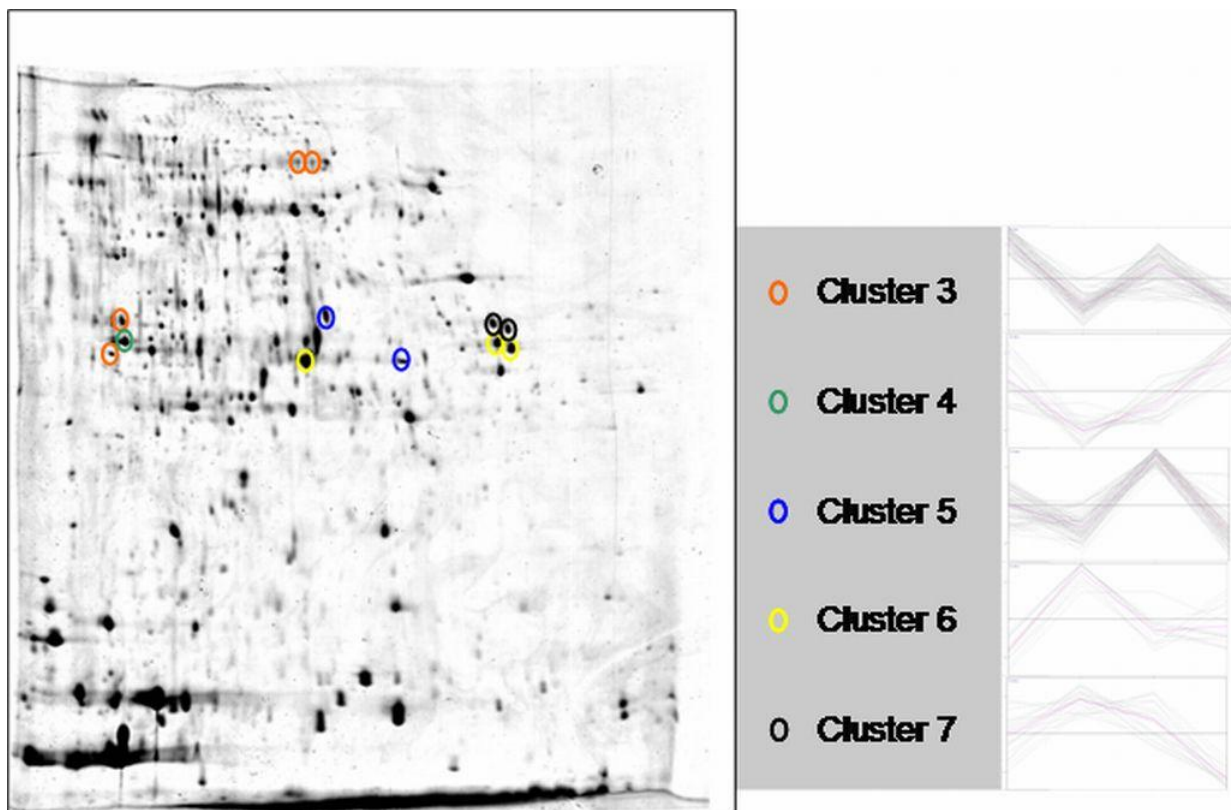


Abbildung 16: Pectat-Lyasen wurden in mehreren Proteinspots identifiziert. Diese Spots weisen 5 verschiedene Kinetiken auf.

Die über Homologievergleiche (BLAST) zugeordneten Proteine sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Nicht für alle identifizierten Proteinspots wurde ein homologes Protein in den Datenbanken gefunden. Eine detaillierte bioinformatische Auswertung der Daten wird aktuell durchgeführt.

Tabelle 2: Mittels BLAST gefundene homologe Proteine.

Gelspot	BLAST Result
284-351	carotenoid ester lipase precursor [<i>Pleurotus sapidus</i>]
284-384	POXA3a laccase small subunit [<i>Pleurotus ostreatus</i>]
284-390	RecName: Full=Peptidyl-Lys metalloendopeptidase; Short=MEP; AltName: Full=PoMEP

284-396	laccase [<i>Pleurotus ostreatus</i>]
284-400	glycoside hydrolase family 12 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-407	endocellulase [<i>Polyporus arcularius</i>]
284-409	laccase2 [<i>Pleurotus sapidus</i>]
284-412	arabinosidase [<i>Armillariella tabescens</i>]
284-415	carbohydrate esterase family 8 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-423	endoglucanase [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-432	peptidase 1 [<i>Pleurotus ostreatus</i>]
284-436	glycoside hydrolase family 16 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-440	peptidase 1 [<i>Pleurotus ostreatus</i>]
284-441	peptidase 1 [<i>Pleurotus ostreatus</i>]
284-444	aminopeptidase [<i>Agaricus bisporus</i>]
284-450	carbohydrate esterase family 8 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-452	cellobiohydrolase II [<i>Lentinus sajor-caju</i>]
284-453	cellobiohydrolase II [<i>Lentinus sajor-caju</i>]
284-454	endoglucanase [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-455	cellobiohydrolase II [<i>Lentinus sajor-caju</i>]
284-456	endoglucanase [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-457	exported esterase [<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100]
284-459	cellobiohydrolase II-I [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-459	carotenoid ester lipase precursor [<i>Pleurotus sapidus</i>]
284-461	endo-1,6-alpha-mannosidase [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-462	endo-1,6-alpha-mannosidase [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-467	RHGB_ASPAC Rhamnogalacturonase B precursor (Rhamnogalacturonan lyase) (RGase B) (RHG B) [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]
284-468	xylanase [<i>Pleurotus ostreatus</i>]
284-469	xylanase [<i>Pleurotus ostreatus</i>]
284-470	RecName: Full=Rhamnogalacturonase B; AltName: Full=Rhamnogalacturonan lyase; AltName: Full=RGase B; AltName: Full=RHG B; Flags: Precursor
284-471	carbohydrate esterase family 8 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-473	RecName: Full=Exoglucanase 3; AltName: Full=Exocellobiohydrolase 3; AltName: Full=1,4-beta-cellobiohydrolase 3; Flags: Precursor
284-476	aspartic peptidase A1 [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-477	aspartic peptidase A1 [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-478	glycoside hydrolase family 72 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-481	endoglucanase [<i>Phanerochaete chrysosporium</i>]
284-485	endoglucanase [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-486	hypothetical FAD dependent oxidoreductase [<i>Postia placenta</i> Mad-698-R]
284-487	hypothetical FAD dependent oxidoreductase [<i>Postia placenta</i> Mad-698-R]

284-489	acetyl xylan esterase [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-490	cellobiohydrolase [<i>Schizophyllum commune</i>]
284-491	cellobiohydrolase II [<i>Lentinus sajor-caju</i>]
284-492	cellobiohydrolase II [<i>Lentinus sajor-caju</i>]
284-493	cellobiohydrolase II [<i>Lentinus sajor-caju</i>]
284-494	mannanase [<i>Armillariella tabescens</i>]
284-500	acetyl xylan esterase [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-501	acetyl xylan esterase [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-502	acetyl xylan esterase [<i>Volvariella volvacea</i>]
284-504	galactan 1,3-beta-galactosidase [<i>Phanerochaete chrysosporium</i>]
284-507	galactan 1,3-beta-galactosidase [<i>Phanerochaete chrysosporium</i>]
284-512	RecName: Full=Rhamnogalacturonase B; AltName: Full=Rhamnogalacturonan lyase; AltName: Full=RGase B; AltName: Full=RHG B; Flags: Precursor
284-514	carotenoid ester lipase precursor [<i>Pleurotus sapidus</i>]
284-515	glycoside hydrolase family 5 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-516	peptidase M28 [<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP]
284-517	cellobiose dehydrogenase [<i>Grifola frondosa</i>]
284-522	laccase precursor [<i>Pleurotus sapidus</i>]
284-524	laccase precursor [<i>Pleurotus sapidus</i>]
284-525	aryl-alcohol oxidase precursor [<i>Pleurotus eryngii</i>]
284-527	glycoside hydrolase family 15 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-528	glycoside hydrolase family 15 protein [<i>Laccaria bicolor</i> S238N-H82]
284-533	polygalacturonase precursor [<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP]
284-534	polygalacturonase precursor [<i>Pyrenophora tritici-repentis</i> Pt-1C-BFP]
284-536	carotenoid ester lipase precursor [<i>Pleurotus sapidus</i>]

Es wurden wichtige Erkenntnisse aus den Sekretomdaten abgeleitet. Von besonderer Bedeutung sind dabei esterolytische und peptidolytische Enzyme, die in insgesamt 11 bzw. 8 verschiedenen Spots identifiziert wurden. Über die Funktion von Esterasen/Lipasen bzw. Peptidasen aus Basidiomyceten zum Aufschluss von Lignocellulosen sind bislang praktisch keine Literaturdaten verfügbar.

2.2.2 Sekretomanalyse von *X. polymorpha* in Sub- und Emerskulturen

Enzyme die *X. polymorpha* während des Wachstums auf Rapsstroh (Emerskulturen) sekretiert, sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Während der Kultur auf Rapsstroh detektierte extrazelluläre Enzyme des Ascomyceten *X. polymorpha*.

Enzym	maximale Enzymaktivitäten (U L⁻¹)
Laccase	81
α -1,2-Mannosidase	6
Cellulase	19
Xylanase	53
β -1,4-Glucosidase	5

Für die massenspektrometrischen Untersuchung des Sekretoms wurden Zellpellets aus Submerskulturen wie in 6.5.1 beschrieben vorbereitet und dem Projektpartner Protagen zur Verfügung gestellt. Die Proteinspots wurden mittels Massenspektrometrie (MALDI-MS/MS) analysiert und -wo möglich- über Datenbanksuchen identifiziert.

Die *X. polymorpha*-Proben ergaben 2D Gele mit einer guten Auflösung und überwiegend definierten Spots (Abbildung 17).

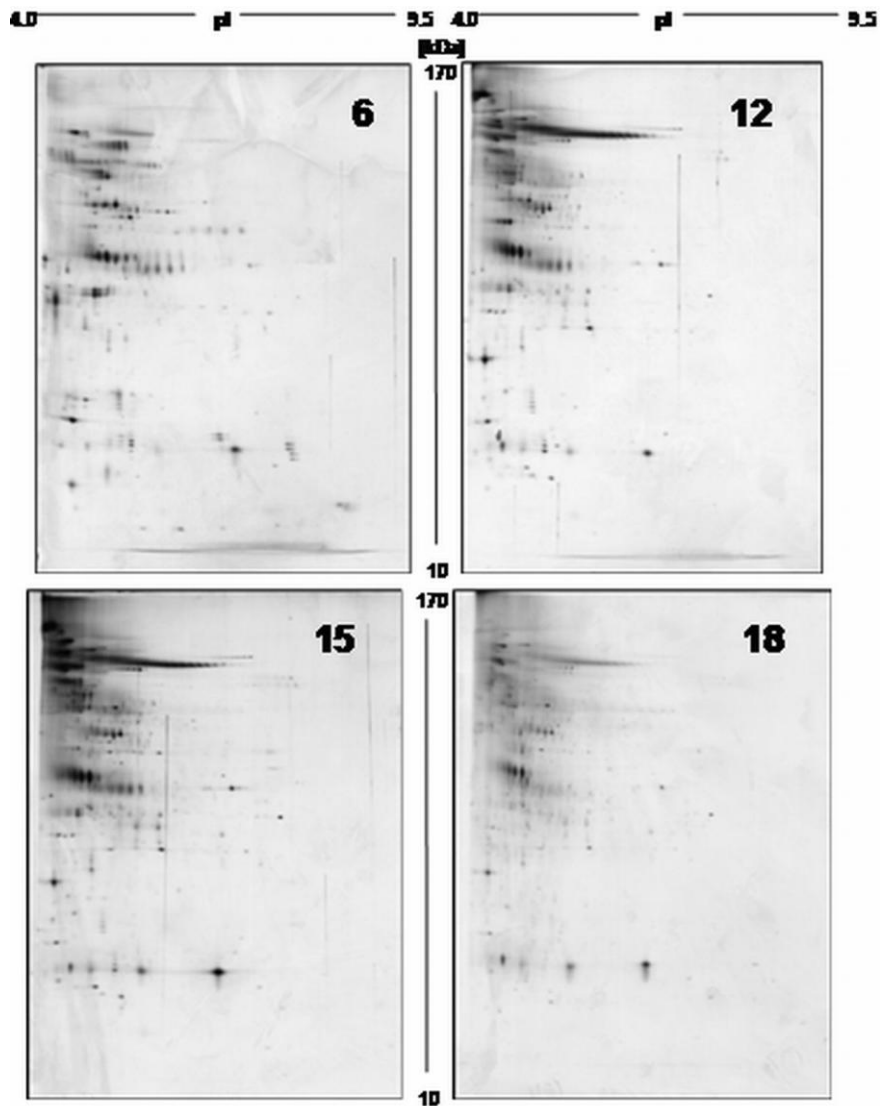


Abbildung 17: 2D Gele des Sekretoms von *X. polymorpha* (Kulturüberstände nach 6, 12, 15 und 18 Kulturtagen).

Die Coomassie-gefärbten Proteinspots befinden sich vor allem auf der sauren Hälfte der Gele und verteilen sich über den gesamten Molekulargewichtsbereich. Um die Expressions-/Sekretionskinetik der einzelnen Proteinspots zu erfassen, wurde für jeden Spot eine Kinetik (Spotvolumen vs. Zeit) erstellt. Da viele Spots gleiche oder ähnliche Kinetiken aufweisen, wurden Spots mittels Clusteranalyse zusammengefasst (Abbildung 18).

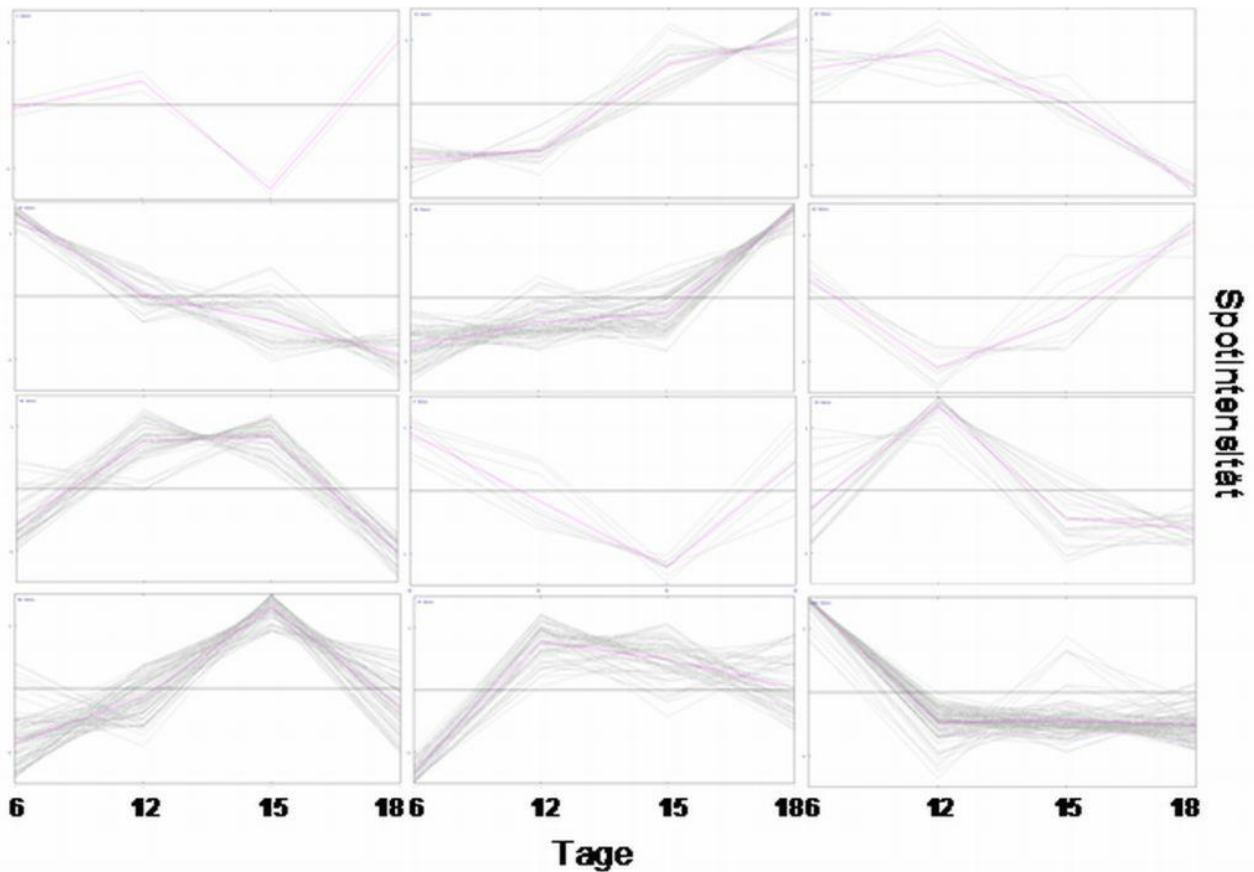


Abbildung 18: Zusammenfassung der verschiedenen Expressionskinetiken von *X. polymorpha* während des Kulturverlaufs.

Für die massenspektrometrische Identifizierung der Spots wurde eine Mischprobe der Einzelzeitpunkte hergestellt, um alle Spots in einem Gel aufzutrennen (Abbildung 19). Mittels *de-novo*-Sequenzierung von ausgewählten Spots per MS/MS-Analyse wurden in einigen Fällen Peptidsequenzen mit Homologien zu bereits bekannten Proteinen identifiziert (Tabelle 4: Peptide nach *de-novo* Sequenzierung).

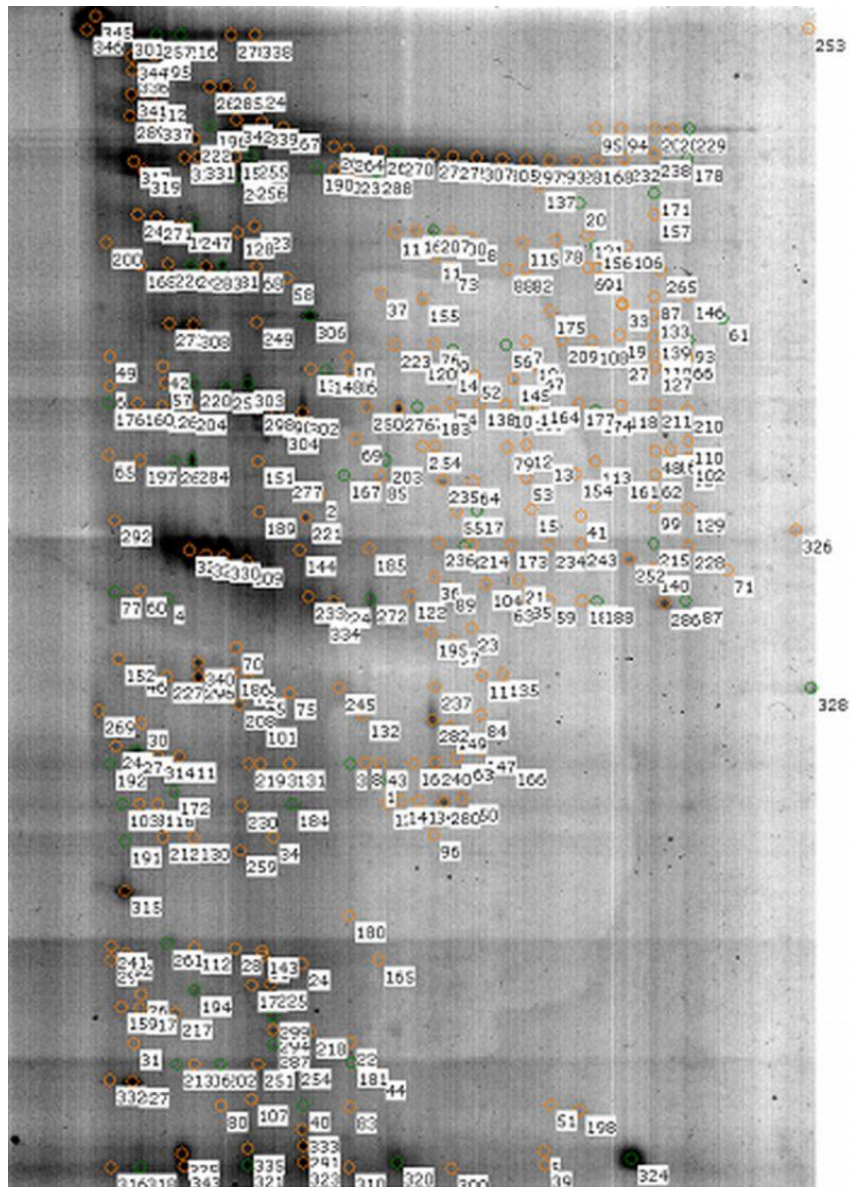


Abbildung 19: 2D Gel mit allen mittels MALDI-MS/MS analysierten Proteinspots aus dem Sekretom von *X. polymorpha*. Insgesamt wurden aus diesem Gel 346 Proteinspots vermessen.

Tabelle 4: Peptide nach *de-novo* Sequenzierung.

Spotnummer	Peptide nach <i>de-novo</i> -Sequenzierung	homologe Proteine
291	GFATFGFGADYPR ENDWYYR	ndk nucleoside diphosphate kinase
324	YGWQTQGQLPR AVTVYDQGYDDAGR WWVACSDGNPGEPT	Snodprot-FS
320	EGGYQTQGQLPR AVTVYDQGYDDAGR EATLGACSDGNPGEPT	SNP1_PHANO Protein SnodProt1 precursor
321	GYADKTQGQLPR LVSAYDQGYDDAGR TLSAVACSDGNPGEPT	wahrscheinlich SNP1_PHANO Protein SnodProt1 precursor
323	EGGDWYYR MTAQSFTEGK GLVDKGGATCCGPR TFGAFGFGADYPR VSLAYDQGYDDAGR	Protein SnodProt1 precursor
334	MATCQTQGGALPR LSVAYDQGYDDAGR LTQEACSDGNPGEPT	Protein SnodProt1 precursor
325	GLTPTWCGAMDAGR MHKDAGDWLVDFSK HDLSLYYCGFAVSR FSLANQDLLDLYDGSLR	no homology
322	LSGFEMPQPR CVGEDNSHEYR ESLTPTVLAGVEVVDTS GPVR	RAD21-N-terminal like protein; <i>Cryptosporidium parvum</i> chromosome 7 chr7_complete, whole genome shotgun sequence

329	LSGFEFPQPR NDTPMNSHEYR TPMPTTVLAGVEVVDTS GPVR	Q7NFG3 Two-component sensor histidine kinase
330	SLGFEFPQPR NDTPFNMCCYR DTLPTTVLAGVEVVDTAGLVR	Q5ZQN7_9RHIZ SoxG protein
308	KLPAAVSLPR MYVYDSER MYVYDSER GPSYVSHQDR TESPPGLSAAHGGGK CPDKEGVSLMETTLR TVDKEGLSLFETTLR	signal peptide-containing protein with transmembrane domain, transcripts identified by EST <i>Cryptosporidium parvum</i> Q61J52_CAEBR Hypothetical protein CBG09941
306	SVAVLSASVR LTNNASGLLR LPEMMTWTMR GSPVGT FNAAGLNVS WANQALQAAVGTSCSK TQASSLGSNLSLVGPSR QNLLSLQSTADLMAANAGPR KSVALDNPTNFMTACNDGAPR	Q89HZ3 BII5846 protein.//:sptrembl Q89HZ3 Q89HZ3_BRAJA BII5846 protein.

2.3 Isolierung extrazellulärer Enzyme

2.3.1 Isolierung einer polyvalenten Peroxidase aus *P. sapidus*

Die Reinigung der polyvalenten Peroxidase erfolgte mittels FPLC in 3 Schritten (Hydrophobe-Interaktions-, Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie). Im vorletzten Reinigungsschritt wurde das Zielprotein über einen schwachen Anionenaustauscher (DEAE) von Fremdproteinen getrennt (Abbildung 20). Die spezifische Aktivität wurde durch die 3-Stufen-Reinigung von 0,1 auf 1,3 U mg⁻¹ gesteigert (Tabelle 5).

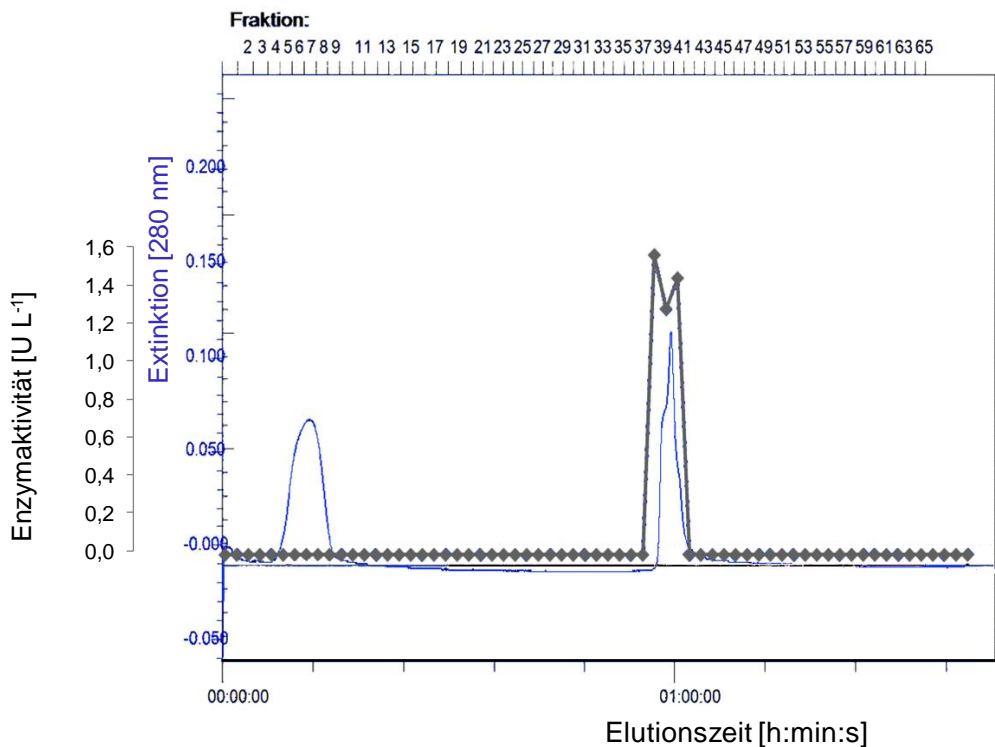


Abbildung 20: FPLC-Elutionsprofil der polyvalenten Peroxidase von *P. sapidus* an einem Anionenaustauscher (DEAE). blau: Extinktion ($\lambda = 280 \text{ nm}$); schwarz: Enzymaktivität [U L⁻¹] gemessen mittels β, β -Carotin Assay.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Isolierung einer polyvalenten Peroxidase aus *P. sapidus*.

	Aktivität [U L ⁻¹]	Spezifische Aktivität [U mg ⁻¹]	Gesamtaktivität [U]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
vor Reinigung	2,3 ± 0,06	0,01 ± 0,001	8,50 ± 0,5		
nach HIC	1,7 ± 0,01	0,04 ± 0,001	5,08 ± 0,06	60	4
nach DEAE	2,1 ± 0,05	0,27 ± 0,01	2,3 ± 0,03	28	27
nach Gelfiltration	1,0 ± 0,001	1,3 ± 0,001	1,0 ± 0,002	12	130

Mittels SDS-PAGE wurden zwei Hauptbanden mit abgeschätzten Molekulargewichten von 26 und 38 kDa detektiert, die pI-Werten lagen bei 3,6 und 3,7.

Die Proteinbanden wurden mittels ESI-MS/MS analysiert (6.5.2). Die Proteinidentifizierung wurde anhand von Peptidsequenz-Datenbankrecherchen (Protein Blast NCBI, Altschul *et al.* 1997) durchgeführt. Für die Peptide zwei bis vier der 26kDa-Bande wurden keine Homologien gefunden. Für die Peptide eins bis drei der 38 kDa-Bande und für Peptid eins der 26 kDa-Bande wurde eine Homologie von jeweils 100% zu einer polyvalenten Peroxidase aus *P. sapidus* (Zugriffsnummer CAJ01576) gefunden. Zudem ergab die Datenbankrecherche für die Peptide eine Homologie von 94% zu polyvalenten Peroxidasen aus *P. eryngii* (Zugriffsnummern Q9UR19.1 und o94753.1) und eine 80%ige Homologie zu einer polyvalenten Peroxidase aus *B. adusta* (Zugriffsnummer ABQ44529.1). In der Aminosäuresequenz des Proteins wurde die mutmaßliche Lage der Peptidsequenzen bestimmt (Abbildung 22).

Der N-Terminus des gereinigten Enzyms wurde nach einem Westernblot (6.10.7) mittels Edman-Abbau (Analytischer Service des biochemischen Institutes, Justus-Liebig-Universität Giessen) ansequenziert. Die ersten zehn Aminosäuren des reifen Proteins wurden bestimmt: NH₂ – AT(C)ADGGTTA (Abbildung 22) und anhand von Peptidsequenz-Datenbankrecherchen (Protein Blast NCBI, Altschul *et al.* 1997) identifiziert. Für das N-terminale Peptid wurden Homologien von 90% zu polyvalenten Peroxidasen aus *P. sapidus* (Zugriffsnummer CAJ01576) und *P. eryngii* (Zugriffsnummer Q9UR19.1) und zu Manganperoxidasen aus weiteren *Pleurotus* sp. gefunden.

Tabelle 6: Peptidsequenzen durch ESI-MS/MS- Sequenzierung und Edmann-Abbau; L = I oder L, K = Q oder K und F = F oder M^{ox}

38 kDa-Bande	26 kDa-Bande	Edmann-Sequenz
GEVQSPLQGEIR	LFPGTPDNKGEVQSPLQGEIR	AT(C)ADGGTTA
LFPGTPDNKGEVQSPLQGEIR	RAAQLAGFPAPR	
LQSDHLLAR	TAFPISGGFYSIR	
	PLSGGFYSLNSEHPR	

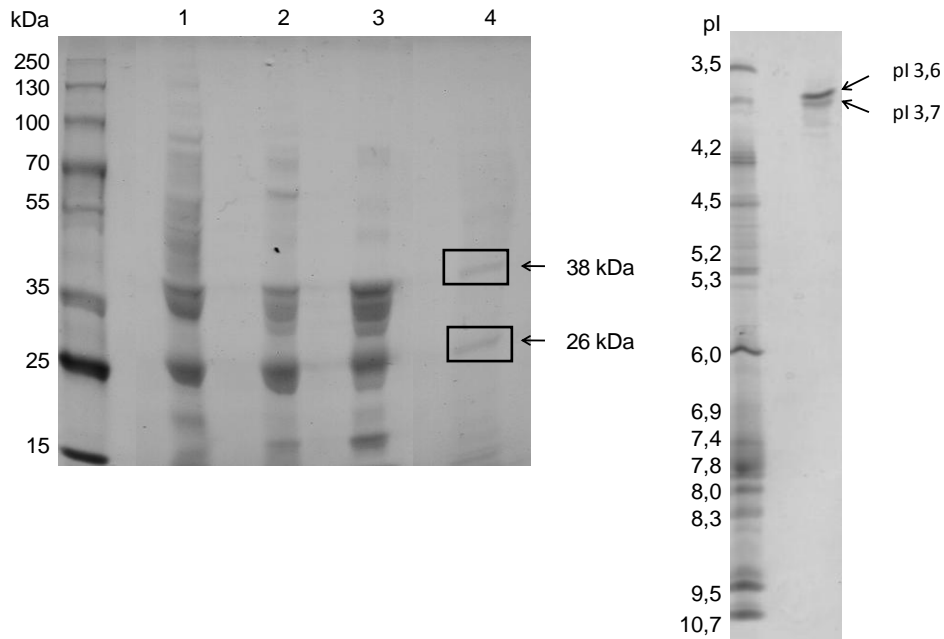


Abbildung 21: links: SDS-PAGE (Gradientengel (Serva) 8-16%ig) der einzelnen Reinigungsstufen der β,β -Carotin-abbauenden Enzyme aus *P. sapidus* 1: konz. Kulturüberstand, 30 μ L; 2: konz. HIC-Fraktionen, 30 μ L; 3: konz. DEAE-Fraktionen, 30 μ L; 4: konz. GFC-Fraktion, 30 μ L; rechts: IEF-Gel (pH 3-10) der konz. GFC-Fraktion, 10 μ L

38 kDa-Bande:

```

CAJ01576 MSFKTLSALVLAALGAAVQFTSAAVPRVQKRATCADGRITANAACCVLFPILDIQQENLFDG
Peptid 1 -----
Peptid 2 -----
Peptid 3 -----

CAJ01576 GQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSIITFDTIETVFPANAGIDEIVSAQKPFV
Peptid 1 -----
Peptid 2 -----
Peptid 3 -----

CAJ01576 AKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPGGVRI PFFLGRPDAVAASPDHLVPEPFDSVDTILARMG
Peptid 1 -----
Peptid 2 -----
Peptid 3 -----

CAJ01576 DAGFSAVEVWLLASHSIAAADLVDP S I PGTPFDSTPGVFDSQFFIETQLKGRLLFPGTPDN
Peptid 1 -----
Peptid 2 -----LFPGTPDN
Peptid 3 -----

CAJ01576 KGEVQSPLQGEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQDKSKL
Peptid 1 -GEVQSPLQGEIR-----
Peptid 2 KGEVQSPLQGEIR-----
Peptid 3 -----LQSDHLLAR-----

CAJ01576 IDCSDVIPTPPALVGA AHL P AGFSLSDVEQACAETPPALTADPGPVT SVPPVPGS
Peptid 1 -----
Peptid 2 -----
Peptid 3 -----

```

Abbildung 22: Vergleich der Aminosäuresequenz einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* (Zugriffsnummer CAJ01576) mit dem N-Terminus des reifen Proteins (grau unterlegt) und den *de novo* bestimmten Peptidsequenzen aus Tabelle 6

2.3.2 Isolierung der Feruloyl-Esterase aus *X. polymorpha*

Die Reinigung der Feruloyl-Esterase erfolgte mittels FPLC (Ionenaustausch- bzw. Größenausschluss-Chromatographie). Im letzten Reinigungsschritt erfolgte die Trennung des Zielproteins von noch vorhandenen Fremdproteinen mit Hilfe eines starken Anionenaustauschers (Q-Sepharose mit MonoBeads™) (Abbildung 23). Auf diese Weise ist es erstmalig gelungen, eine sekretierte Feruloyl-Esterase eines holzzeretzenden Ascomyceten zu isolieren. Das gereinigte Enzympräparat steht nun für physiko-chemische und katalytische Untersuchungen zur Verfügung.

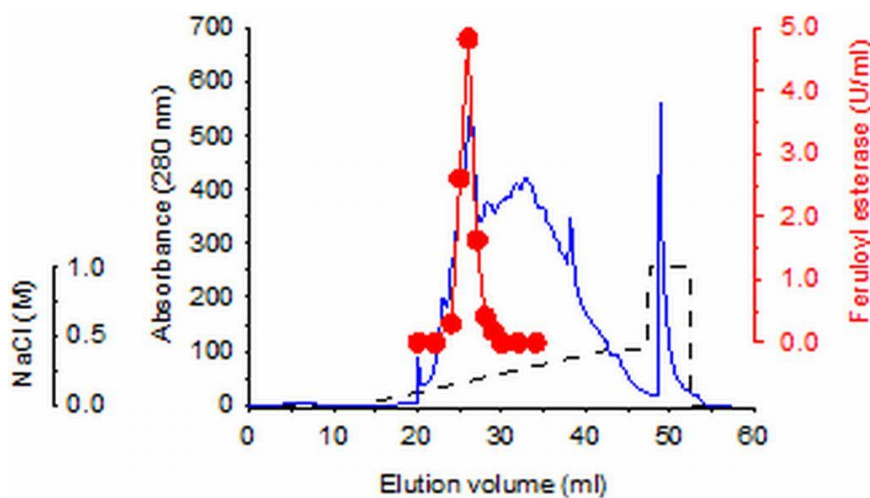


Abbildung 23: FPLC-Elutionsprofil der Feruloyl-Esterase von *X. polymorpha* an einem Anionenaustauscher (MonoQ-Sepharose). Proteinabsorption bei 280 nm (blaue Linie), NaCl-Gradient (schwarze Linie), Esterase-Aktivität (●).

Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde im Zuge der Reinigung (Fraktion F I) von $0,06 \text{ U mg}^{-1}$ auf $2,6 \text{ U mg}^{-1}$ bezogen auf das Gesamtprotein gesteigert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Reinigung der extrazellulären Feruloyl-Esterase aus *X. polymorpha*.

Reinigungsschritt	Totalaktivität (U)	Totalprotein (mg)	Spez. Aktivität (U/mg)	Wiederfindung (%)	Reinigung (-fach)
Rohextrakt	57,4	910,8	0,06	100	1
Ultrafiltration	54,5	620,5	0,09	94,9	1,5
Anionenaustausch (DEAE)	43,9	68,2	0,64	76,5	10,7
Größenausschluss	20,6	11,5	1,79	35,9	29,8
Anionenaustausch (MonoQ) F II	5,2	3,3	1,56	9,1	25,5
Anionenaustausch (MonoQ) F I	4,9	1,9	2,58	8,5	42,2

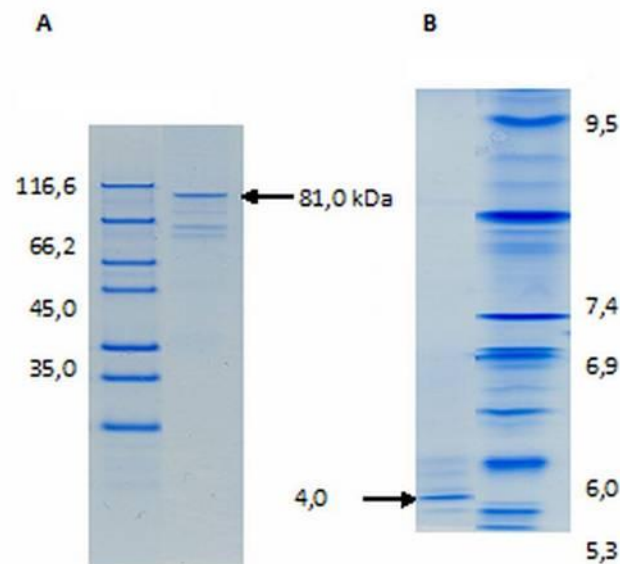


Abbildung 24: (A) SDS-Polyacrylamidgel und (B) IEF-Gel der gereinigten Esterase aus *X. polymorpha* (2 und 3); Protein-Marker (1 und 4).

Die Feruloyl-Esterase aus *X. polymorpha* besitzt ein Molekulargewicht von ca. 81 kDa und einen isoelektrischen Punkt (pI) von 4,0 (Abbildung 24).

Durch den Kooperationspartner Protagen AG wurden mittels zweier unterschiedlicher Methoden Peptid-Fragmente des gereinigten Proteins generiert (vgl. Tabelle 8 & 9), auf deren Grundlage degenerierte und spezifische Primer abgeleitet wurden. Die Primer werden derzeit am IHI Zittau auf ihre Eignung zur Amplifikation der cDNA getestet. Die massenspektrometrisch identifizierten Peptide (MALDI-MS/MS) weisen interessanterweise nur geringe Homologien zu bekannten pilzlichen Esterasen auf, zeigen jedoch große

Ähnlichkeiten zu pilzlichen α -L-Rhamnosidasen (z.B. ~ 92% Identität mit einem putativen Enzym von *Magnaporthe grisea* (Abbildung 25).

Tabelle 8: Interne Peptid-Fragmente der gereinigten Feruloyl-Esterase von *X. polymorpha*, identifiziert über LC-ESI-MS/MS (Protagen AG).

Peptid-Fragment	Homologien
LDGKEYTR	Mannosidase
NYADAVLGSDTTAACVNCGK	Glycosyl-Hydrolase
LGKEDDYEKYAK	Mannosidase
FYQQQLEQR	?
YAGSLGGLHQGHSR	?
EFPEVSAAALR	?
VDVFEGALAGHVLVK	β -Glucosidase (76% <i>Aspergillus terreus</i>)
FGKEQAFFQAVR	Dienlacton-Hydrolase (81% <i>Nectria</i> sp.)
NHLDPDDLVTGPGK	Shikimat-5-Dehydrogenase (<i>Aspergillus fumigatus</i>)
AANGYDFVNLPLWK	?
SPCANGYDFVNEPPWK	?
VTPEETDALLATGVDLYR	?
WAQVLTLCGMLQYYGK	?
VPAPDGPPVAAR	?

Tabelle 9: Peptid-Fragmente der gereinigten Feruloyl-Esterase von *X. polymorpha* identifiziert über MALDI-TOF (Protagen AG).

Peptid-Fragment	Homologien
LSAPDGPPLQR	?
VGDAVLAPGWQSYGGHR	α -L-Rhamnosidase (92% zu <i>Magnaporthe grisea</i>)
LYLTAYGLYEAFNGDR	α -L-Rhamnosidase (64% <i>Neosartorya fischeri</i>)
LVSLEFQVSFEHHR	?
TTEKNVPHQPLLLR	?

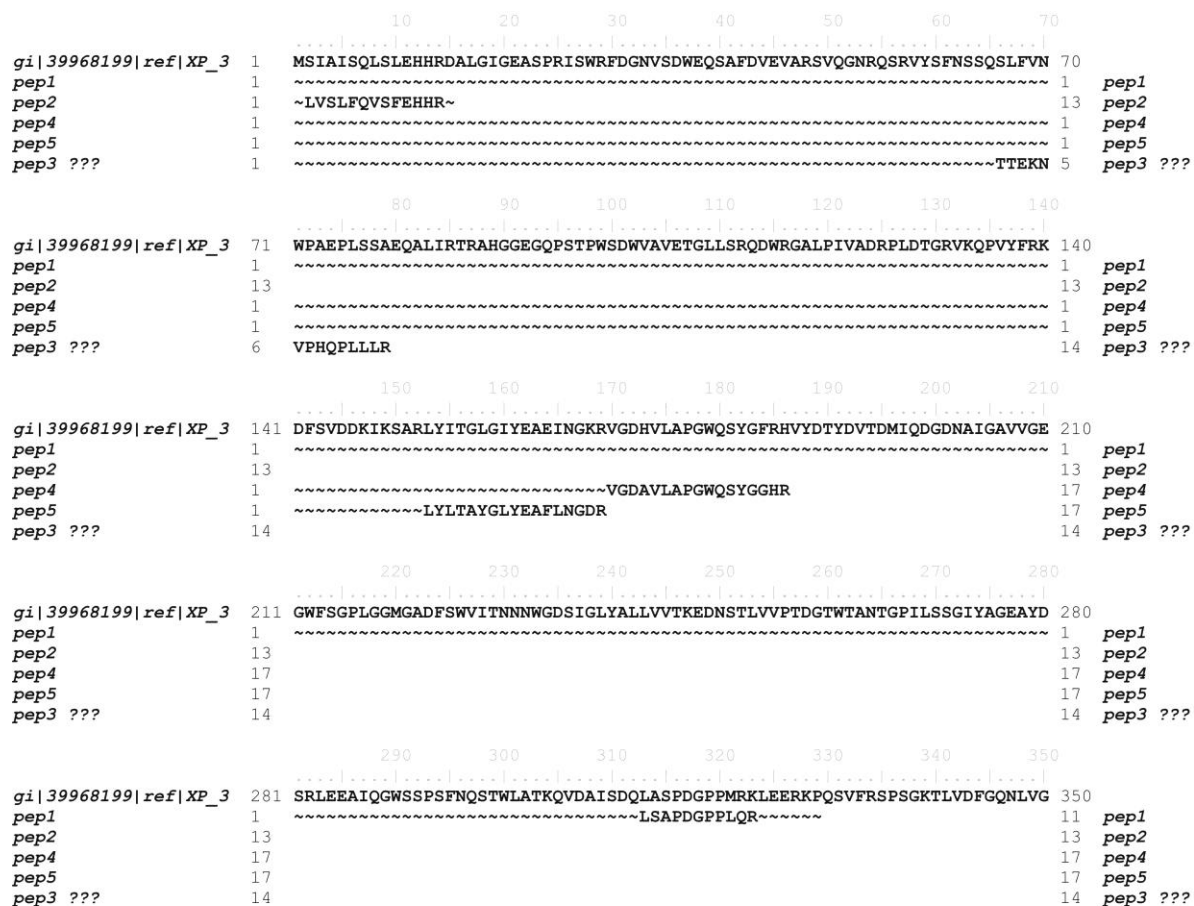


Abbildung 25: Alignment interner Peptid-Fragmente (Tab. 8) einer Feruloyl-Esterase von *X. polymorpha* mit einer α -L-Rhamnosidase von *Magnaporthe grisea* (oberste Sequenz).

2.3.3 Isolierung weiterer Enzyme aus Emerskulturen von *X. polymorpha* auf Rapsstroh

Aus den Emerskulturen von *X. polymorpha* auf Rapsstroh wurden zwei weitere sekretierte Enzyme (s. Tabelle 3) chromatographisch gereinigt (Abbildung 26). Zur kupferhaltigen Oxidoreduktase Laccase sind neben wichtigen Proteindaten (z.B. physikochemische & biokatalytische Eigenschaften, Liers *et al.*, 2007) auch bereits ca. 96% der Gen-Sequenz bekannt (Accession-No.: ABV32571). Die Laccase, die in pflanzenbasierten Komplex-Medien in großer Menge gebildet wird (Liers *et al.*, 2007) besitzt ein Molekulargewicht von ca. 67 kDa (Abbildung 23 A). Die Aminosäuresequenz des Enzyms zeigt eine gewisse Übereinstimmung mit Sequenzen anderer Ascomyceten-Laccasen wie von *Cryphonectria parasitica* (49%) und *Gaeumannomyces tritici* (47%). Neben den Esterasen stellt diese Laccase ein weiteres interessantes Enzym für die heterologe Expression dar.

Während der Reinigung der Feruloyl-Esterase aus Stroh wurde zusätzlich eine Glycosyl-Hydrolase isoliert und vom Projektpartner Protagen AG nach tryptischem Verdau

massenspektrometrisch sequenziert (Abbildung 26 B). Bei diesem ~ 50 kDa-Protein handelt es sich um eine α -1,2-Mannosidase, die Ähnlichkeiten zu Sequenzen bekannter, allerdings bislang nicht proteinbiochemisch charakterisierter α -1,2-Mannosidasen aus Ascomyceten aufweist. Bisher wurde die für ~ 50 AS kodierende cDNA des entsprechenden Enzymproteins mittels degenerierter Primer identifiziert (Abbildung 27). Das Protein wird aktuell hinsichtlich seiner biokatalytischen Eigenschaften charakterisiert.

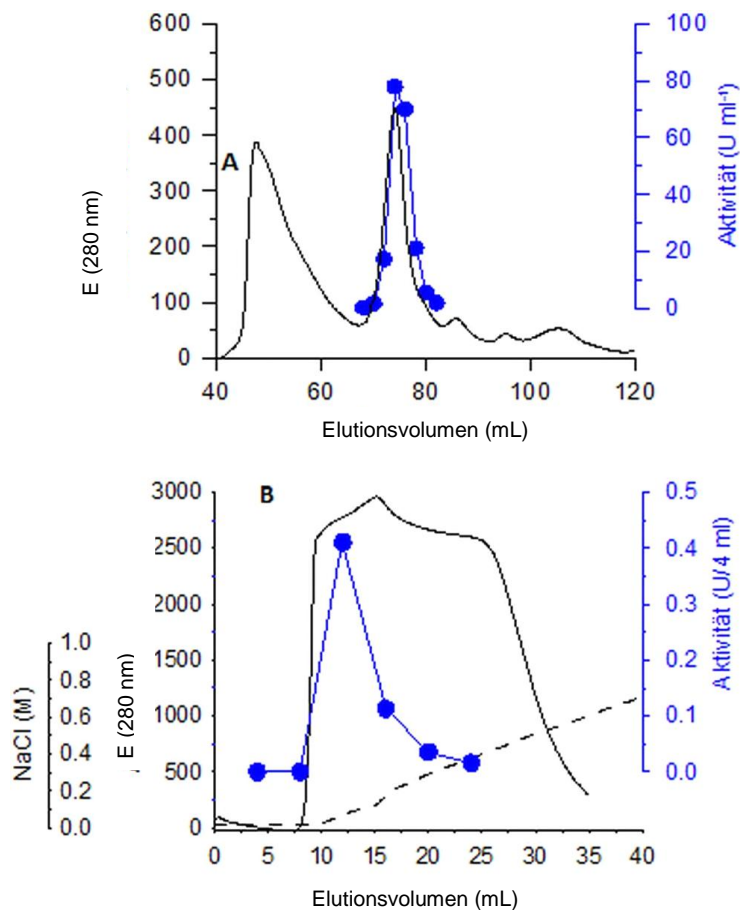


Abbildung 26: FPLC-Elutionsprofile zur Isolierung einer extrazellulären (A) Laccase (Größenausschluss-Chromatographie) und (B) einer α -1,2-Mannosidase (Anionenaustausch-Chromatographie) von *X. polymorpha*.

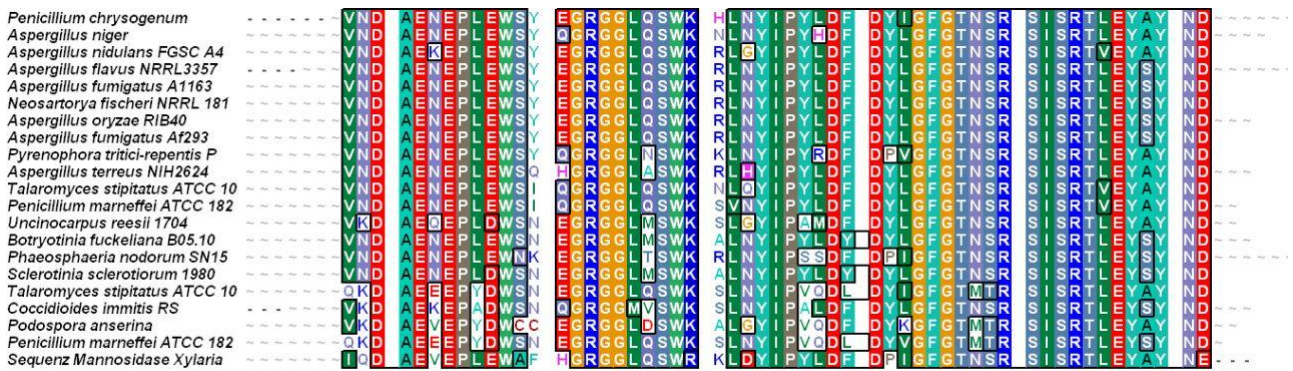


Abbildung 27: Identifiziertes Peptid-Fragment einer gereinigten α -1,2-Mannosidase aus *X. polymorpha* im Sequenzvergleich zu potentiellen Homologen aus Ascomyceten.

2.4 Charakterisierung der isolierten extrazellulären Enzyme

2.4.1 Charakterisierung einer isolierten polyvalenten Peroxidase aus *P. sapidus*

Die Enzympräparation aus der kombinierten Reinigung wurde konzentriert und biochemisch charakterisiert. Hierzu wurden die optimalen Reaktionsbedingungen und die kinetischen Konstanten für verschiedene Substrate bestimmt.

Folgende optimale Reaktionsbedingungen wurden für das gereinigte Enzym ermittelt: pH-Optimum: 4,5, Temperaturoptimum: 30 °C, H₂O₂-Konzentration: 2 mM, Mangansulfat-Konzentration: 0,2 mM und Coniferylalkohol-Konzentration: 5 µM (Abbildung 28).

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten (6.4.1) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit so eingestellt, dass sie während der ersten fünf Minuten im linearen Bereich lag. Die Proteinkonzentration der verwendeten Enzymlösung wurde mittels Bradfordassay bestimmt. Für das Substrat Syringol wurden 0,01 nM Enzym und für die restlichen Substrate wurden 0,025 nM Enzym für die Messungen verwendet. Das Cosubstrat Wasserstoffperoxid lag in allen Reaktionen mit 2 mM gegenüber Substratkonzentrationen von 0,01 bis 0,5 mM im Überschuss vor. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in Abhängigkeit der unterschiedlichen Substratkonzentrationen bestimmt und im Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen (Abbildung 29).

In Abhängigkeit vom Substrat wurden Wechselzahlen von 993 bis 54471 s⁻¹ bestimmt. Die katalytischen Konstanten betragen 0,13 bis 3,95 10⁸ M⁻¹ s⁻¹ (Tabelle 10).

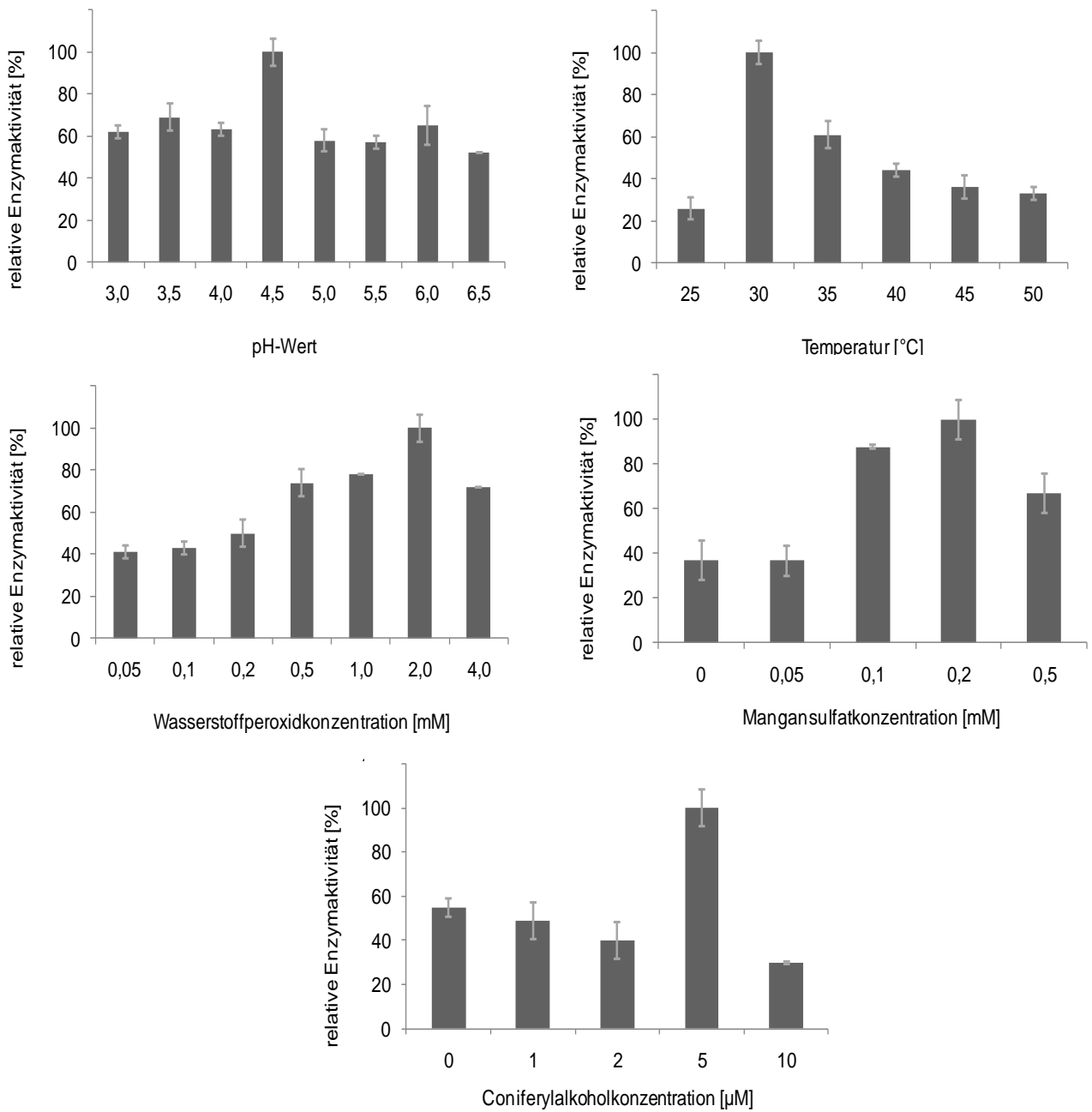


Abbildung 28: Bestimmung der optimalen Reaktionsparameter für die gereinigte polyvalente Peroxidase

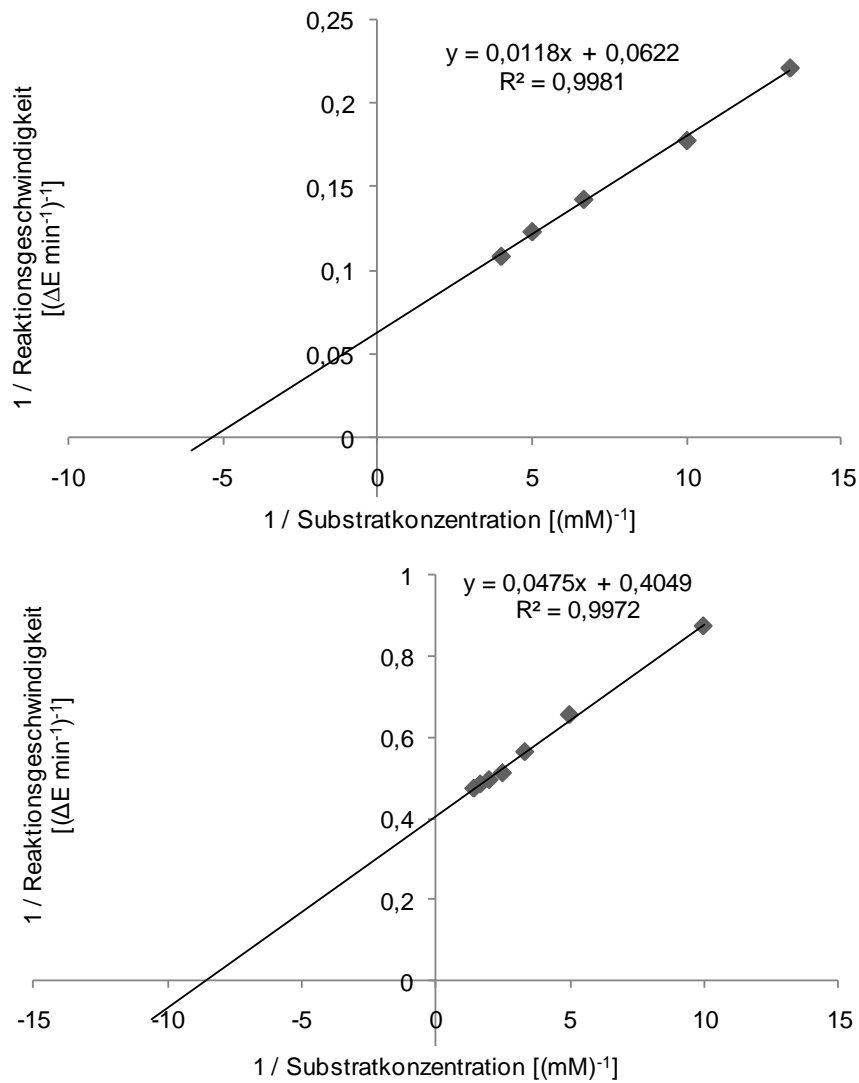


Abbildung 29: Lineweaver-Burk-Diagramm des gereinigten Enzyms aus *Pleurotus sapidus* mit verschiedenen Substratkonzentrationen an ABTS (oben) und Veratrylalkohol (unten)

Tabelle 10: Michaelis-Menten-Konstante (K_m), Wechselzahl (k_{cat}) und katalytische Konstante ($k_{cat} K_m^{-1}$) der Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus*

Substrat	K_m [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	$k_{cat} K_m^{-1}$ [$10^8 M^{-1} s^{-1}$]
Syringol	$0,138 \pm 0,02$	54471 ± 2926	$3,95 \pm 0,22$
ABTS	$0,177 \pm 0,08$	12334 ± 1330	$0,70 \pm 0,07$
β,β -Carotin	$0,050 \pm 0,00$	993 ± 90	$0,20 \pm 0,02$
Veratrylalkohol	$0,166 \pm 0,01$	1537 ± 173	$0,13 \pm 0,02$

2.4.2 Charakterisierung einer isolierten Feruloyl-Esterase aus *X. polymorpha*

Die molekularbiologische und biokatalytische Charakterisierung der Feruloyl-Esterase des Ascomyceten *X. polymorpha* (*XpoFAE*) wurde im Rahmen des Projektes in den letzten Monaten erfolgreich beendet.

In Kooperation mit dem Projektpartner Protagen AG wurden zahlreiche Peptid-Fragmente der gereinigten Esterase von *X. polymorpha* ermittelt, die anschließend Grundlage für die Synthese degenerierter und spezifischer Primer bildeten (Abbildung 30).

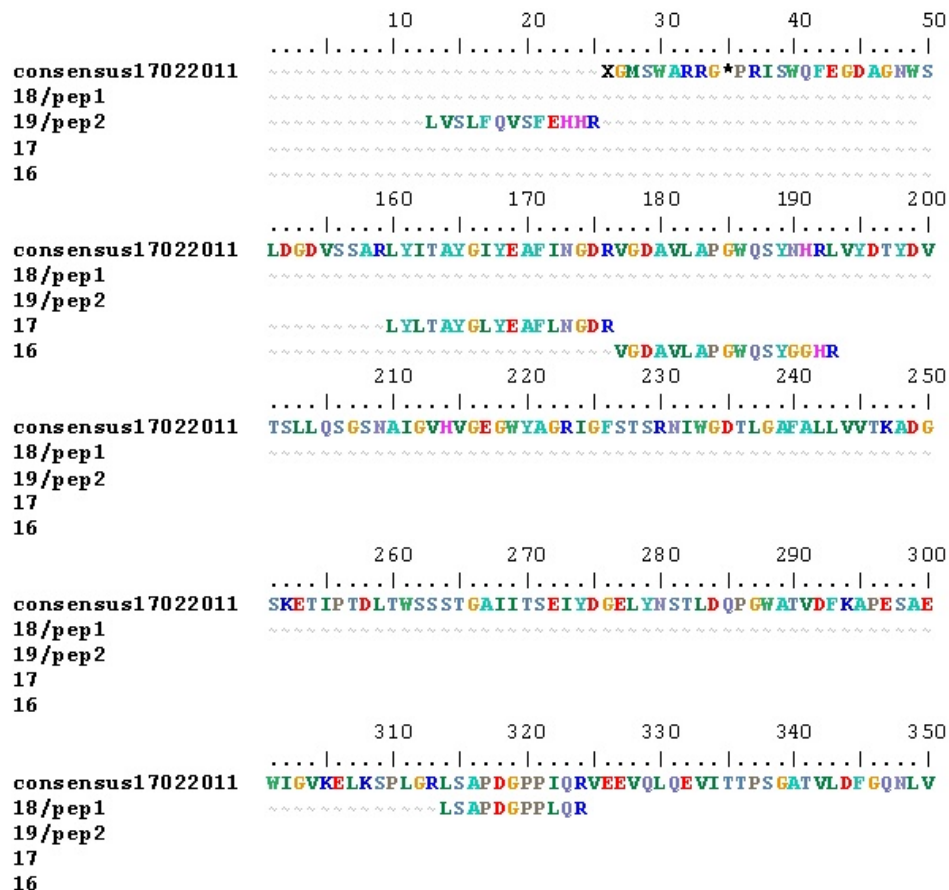


Abbildung 30: Interne *de-novo* Peptid-Fragmente und ihre Position im identifizierten Gen der Feruloyl-Esterase von *X. polymorpha*

Anhand isolierter RNA und synthetisierter cDNA wurde das Esterase-Gen (2921 bp) vollständig identifiziert. Es besteht aus 866 Aminosäuren, enthält 4 Introns und kodiert für ein Protein mit einer berechneten Größe von 93 kDa und einem berechneten pI von 4.69. 15 interne Peptid-Fragmente wurden in der Aminosäure-Sequenz des *XpoFAE* kodierenden Gens nachgewiesen, das entsprach 24 % der Gesamt-Sequenz. Die

Sequenz verfügt über 7 potentielle N-Glykosylierungsstellen und besitzt nach Berechnungen mit iPSort und SignalP kein Signalpeptid (Nghy *et al.* 2011a).

Interessanterweise zeigt das XpoFAE Protein große Übereinstimmungen zu hypothetischen ascomycetalen Sequenzen, die als α -L-Rhamnosidasen annotiert sind. Diese gehören zur Glycosyl-Hydrolase Familie 78 (Clade I), mit z. B. bis zu 58% Identität und 78% Ähnlichkeit zur α -L-Rhamnosidase von *Aspergillus terreus*, und besitzen ebenfalls kein Signalpeptid. Es sind bisher keine Ester spaltenden Enzyme innerhalb dieser Hydrolase-Familie bekannt. Diese Esterase aus *X. polymorpha* stellt somit die erste charakterisierte Ester spaltende Hydrolase mit Rhamnosidase-ähnlicher Peptid-Sequenz dar (Nghy *et al.* 2011a).

Die molekularbiologischen Ergebnisse verdeutlichen, dass die Esterase, nicht zuletzt aufgrund der phylogenetischen Einordnung in die Rhamnosidase-spezifische Glycoside-Hydrolase Familie GH 78, einen neuen Typus ascomycetaler Hydrolasen darstellt.

In Tabelle 11 sind katalytischen Konstanten für natürliche und synthetische Modellester (z.B. Chlorogensäure bzw. *p*-Nitrophenolacetat) zusammengefasst, die durch die Feruloyl-Esterase hydrolysiert wurden. Darunter befanden sich zahlreiche Substanzen die Bestandteile pflanzlicher Zellwände sind (z.B. Feruloyl-Glucopyranoside). Interessanterweise wurden auch klassische Rhamnosidase Substrate wie z.B. Naringin ($0,2 \text{ U mg}^{-1}$, Abbildung 31) und *p*-Nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside ($0,5 \text{ U mg}^{-1}$) aber auch das für β -Glukosidasen typische *p*-Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside ($0,1 \text{ U mg}^{-1}$) durch die Esterase umgesetzt.

Enzyme, die derartige katalytische Eigenschaften vereinigen, werden als Naringinasen (EC 3.2.1.40) bezeichnet und finden Anwendung in der Lebensmittelindustrie zur Beseitigung des Bitterstoffes Naringin in Fruchtsäften vor allem Grapefruitsaft. Für die XpoFAE wurde die effektive hydrolytische Spaltung dieses Bitterstoffes in die entsprechenden monomeren Bausteine Glucose und Rhamnose sowie zum Flavanon qualitativ nachgewiesen (Abbildung 32). Auch hier gilt, dass bisher noch keine mikrobielle Naringinase beschrieben ist, die eine Ester spaltende Aktivität besitzt.

Tabelle 11: Michaelis-Menten-Konstanten (K_m), Wechselzahlen (k_{cat}) und kinetische Optima (k_{cat}/K_m) der Feruloyl-Esterase von *X. polymorpha* für verschiedene aromatische Ester und Glykoside.

*... berechnet als $V_{max}/\text{Proteingehalt}$; n. d.: nicht bestimmt

Substrat	Spez. Aktivität (U mg ⁻¹)	K_m [μM]	k_{cat} [s ⁻¹]	$k_{cat} K_m^{-1}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]
Methylferulat*	8,8	75	12,0	1,6 10 ⁵
Methyl- <i>p</i> -coumarat*	4,6	18	6,2	3,5 10 ⁵
Methylsinapat*	2,8	105	3,8	3,6 10 ⁴
Ethylferulat*	2,5	100	3,3	3,3 10 ⁴
Methylcafeat*	1,1	161	1,4	8,9 10 ³
3,4-Dimethoxyethylbenzoat*	0,01	61	0,1	1,4 10 ³
3,4-Dimethoxymethylbenzoat*	0,01	52	0,1	2,7 10 ³
Methyl-6- <i>o</i> -sinapoyl-glycopyranosid	1,2	n. d.	n. d.	n. d.
Methyl-6- <i>o</i> -feruloyl-glycopyranosid	2,2	n. d.	n. d.	n. d.
Chlorogensäure	0,3	n. d.	n. d.	n. d.
<i>p</i> -Nitrophenolacetat	0,09	n. d.	n. d.	n. d.
Dibenzoyltartrat	0	n. d.	n. d.	n. d.
<i>p</i> -Nitrophenol- α -L-rhamnopyranosid	0,5	n. d.	n. d.	n. d.
Naringin	0,2	n. d.	n. d.	n. d.

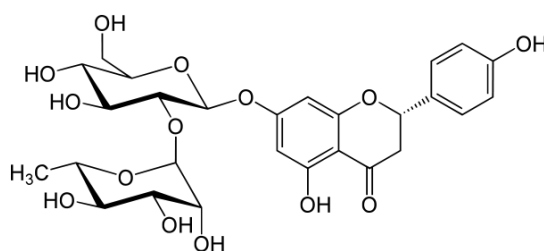


Abbildung 31: Das in vielen Pflanzen und Früchten enthaltene Glykosid Naringin (4',5,7-Trihydroxyflavanon-7-rhamnoglucosid), das durch enzymatische Umsetzung zum entsprechenden Aglykon Naringenin und dem Polyphenol Flavanon gespalten wird.

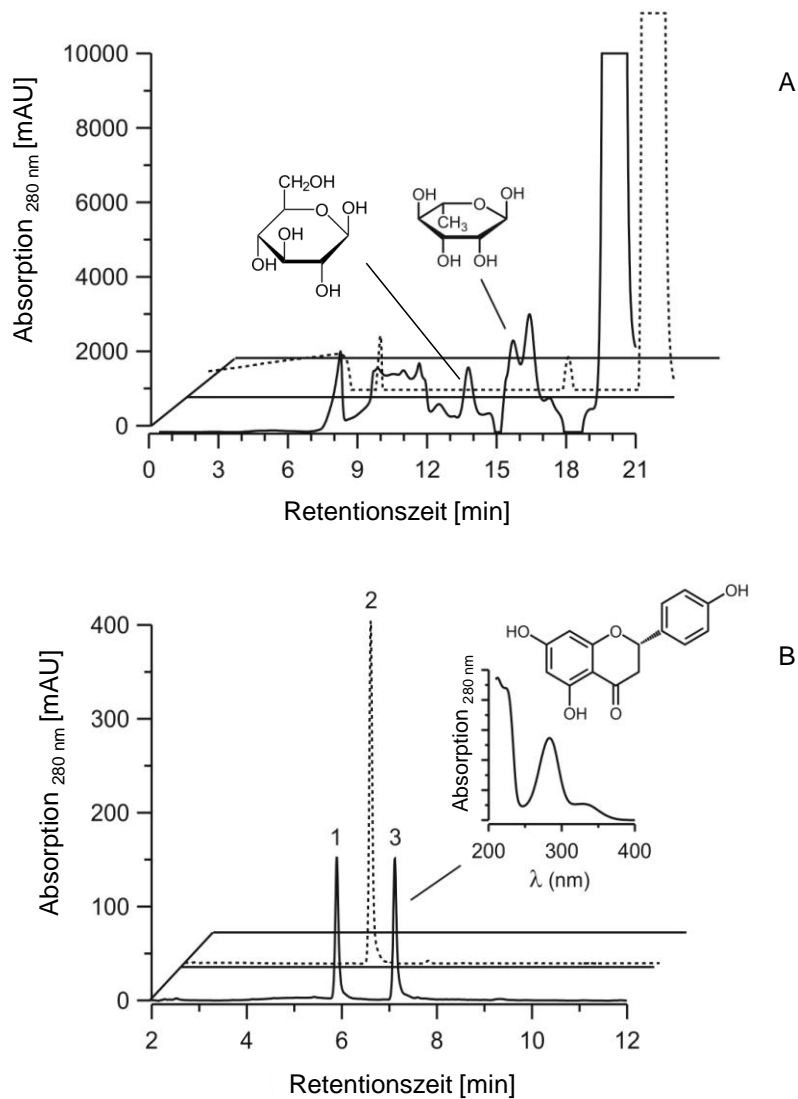


Abbildung 32: Nachweis der Reaktionsprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Naringin durch die XpoFAE. **(A)** Chromatogramm der freigesetzten Polysaccharide α -L-Rhamnose und Glucose. **(B)** Chromatogramm des freigesetzten Aglykons Naringenin (Flavanon) nach 1-stündiger Inkubation (schwarze Linie), Kontrolle ohne Enzym (gestrichelte Linie).

Die für die von der Zimtsäure abgeleiteten Methylester ($K_m = 17 - 161 \mu\text{M}$, Tabelle 11) ermittelten Werte bewegen sich im gleichen Bereich wie die Substrat-Affinitäten einer Feruloyl-Esterase aus der „Schwarzen Hefe“ *Aureobasidium pullulans* (z.B. $K_m = 11 - 137 \mu\text{M}$, Rumbold *et al.* 2003) und sind etwa zehnmal kleiner (d.h. das Enzym ist zehnmal affiner!) als die K_m -Werte einer Esterase aus dem Deuteromyceten *Aspergillus niger* (z.B. $K_m = 1.440 - 2.080 \mu\text{M}$; Faulds und Williamson 1994), die zudem keine Hydrolyse von Benzoyl-Estern (z.B. Veratrumsäure-Methylester) katalysiert.

Insgesamt werden die „Zimtsäure“-Methylester von dieser Esterase besser umgesetzt als die entsprechenden Veratrumsäure-Ester. Zimtsäurederivate sind Vorstufen der im Lignocellulose-Komplex vorkommenden Monolignole und deren Ester repräsentieren

klassische in pflanzlichen Zellwänden vorkommende Bindungstypen zwischen Lignin und Hemicellulosen (Iiyama *et al.* 1994, Li und Helm 1995, Hatfield *et al.* 1999).

Die Analyse und weitere Identifizierung der Reaktionsprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Modelleestern wurde durch den Projektpartner Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn (AG König) massenspektrometrisch begleitet (Abbildung 33).

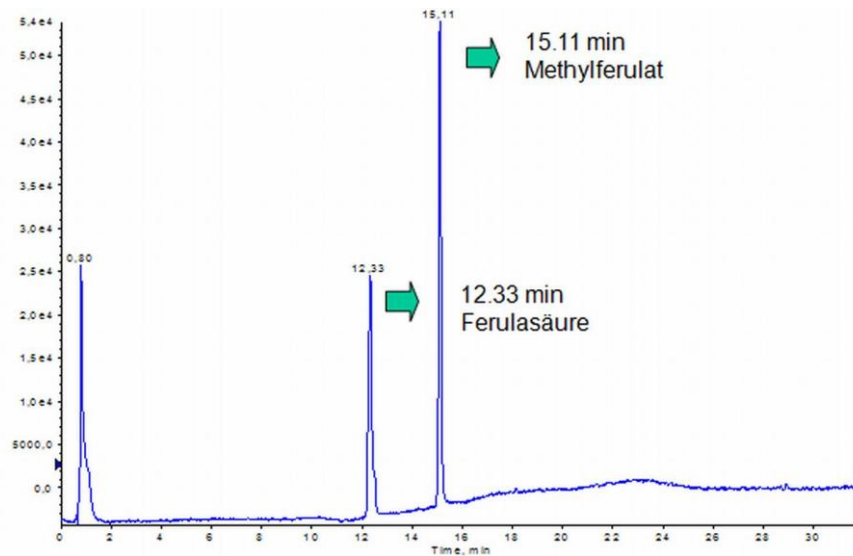


Abbildung 33: Umsetzung von Ferulasäure-Methylester zu Ferulasäure (HPLC-Chromatogramm).

Das Enzym von *X. polymorpha* zeigte die höchsten spezifischen Aktivitäten gegen eine Vielzahl verschiedener Ester ($8,8 - 0,3 \text{ U mg}^{-1}$). Somit handelt es sich bei diesem Enzym laut EC Nomenklatur eindeutig um eine Esterase. Es ist in der Lage, sowohl Esterbindungen als auch glycosidische Bindungen, enthalten in sowohl Hemicellulosen (Pektine = Polygalacturonsäurepolymere) aber auch in Cellulose (z.B. β -Glucosidase-Aktivität), zu spalten. Damit besitzt die Esterase aus *X. polymorpha* einen recht vielseitigen katalytischen Charakter, der zum enzymatischen Aufschluss natürlicher Substrate wie pflanzlicher Landwirtschaftsabfälle sehr gut geeignet ist (Nghu *et al.* 2011b).

2.5 Umsetzungen von Modellsubstraten

2.5.1 Umsetzungen von Modellsubstraten mittels polyvalenter Peroxidase und durch Kulturüberstände von *P. sapidus*

Mit Kulturüberständen von *P. sapidus* (Tag 9; Enzymaktivitäten s. 2.2.1) wurden die Modellverbindungen Ferulasäure und Ferulasäureethylester umgesetzt. Bei den Versuchen wurden jeweils Kontrollproben (ohne Enzym und inaktiviertes Enzym)

mitgeführt. Die Umsetzung von Ferulasäure lieferte mehrere Produkte mit geringen Konzentrationen. Bei der Umsetzung von Ferulasäureethylester entstand eine neue Verbindung mit einer Retentionszeit von 19,5 min (Abbildung 34). Die Konzentration dieses Produktes nahm mit längerer Reaktionszeit weiter zu.

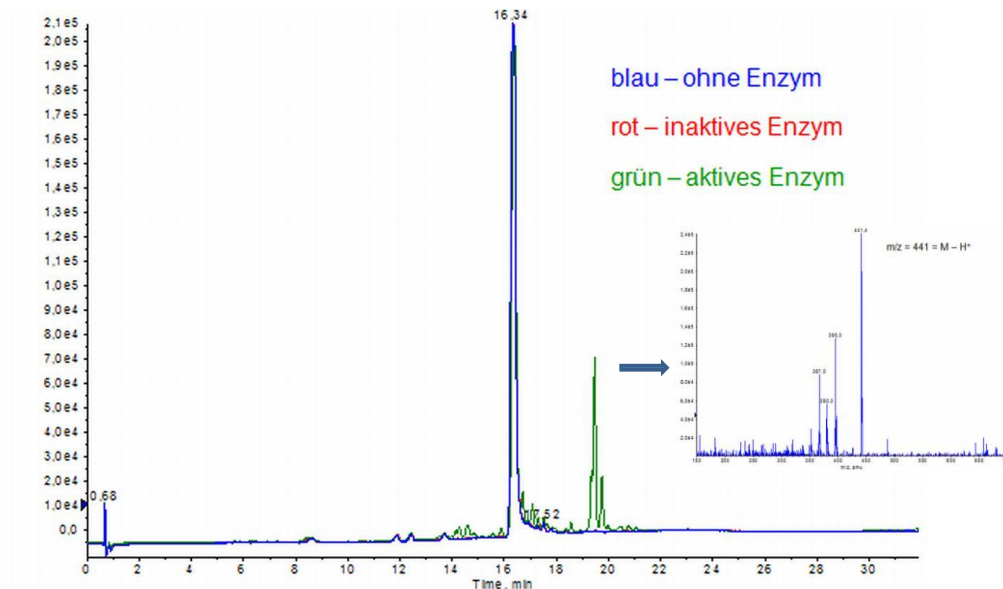


Abbildung 34: Vergleich der HPLC-DAD-Chromatogramme der beiden Blindproben – ohne Enzym (blau) und inaktives Enzym (rot) – mit dem der Umsetzung von Ferulasäureethylester mit dem aktiven Kulturüberstand *P. sapidus* (grün).

Das Massenspektrum des Peaks bei 19,5 min zeigt ein Quasimolekülion mit $m/z = 441$ im negativen und $m/z = 443$ im positiven Ionisierungsmodus. Dies weist auf eine Dimerisierung des Ferulasäureethylesters hin.

Analog dazu wurden niedermolekulare Ligninmodellsubstrate unter den zuvor optimierten Bedingungen ($\text{pH} = 4,5$, $T = 30\text{ °C}$, $2\text{ mM H}_2\text{O}_2$) mit der gereinigten polyvalenten Peroxidase aus *P. sapidus* umgesetzt.

Veratrylalkohol wurde dabei innerhalb von 48 h quantitativ zu einer neuen Verbindung umgesetzt (Abbildung 35 & 36).

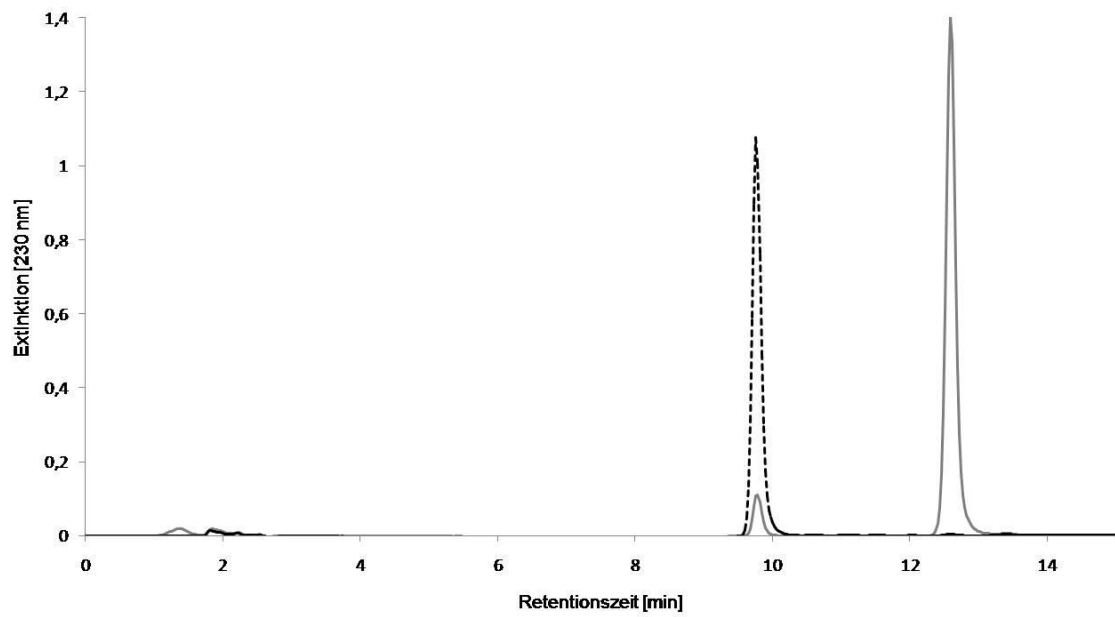


Abbildung 35: HPLC-DAD Chromatogramm, Umsetzung von Veratrylalkohol mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *P. sapidus*, gestrichelte Linie: Blindprobe, graue Linie: Umsetzung nach 24 h.

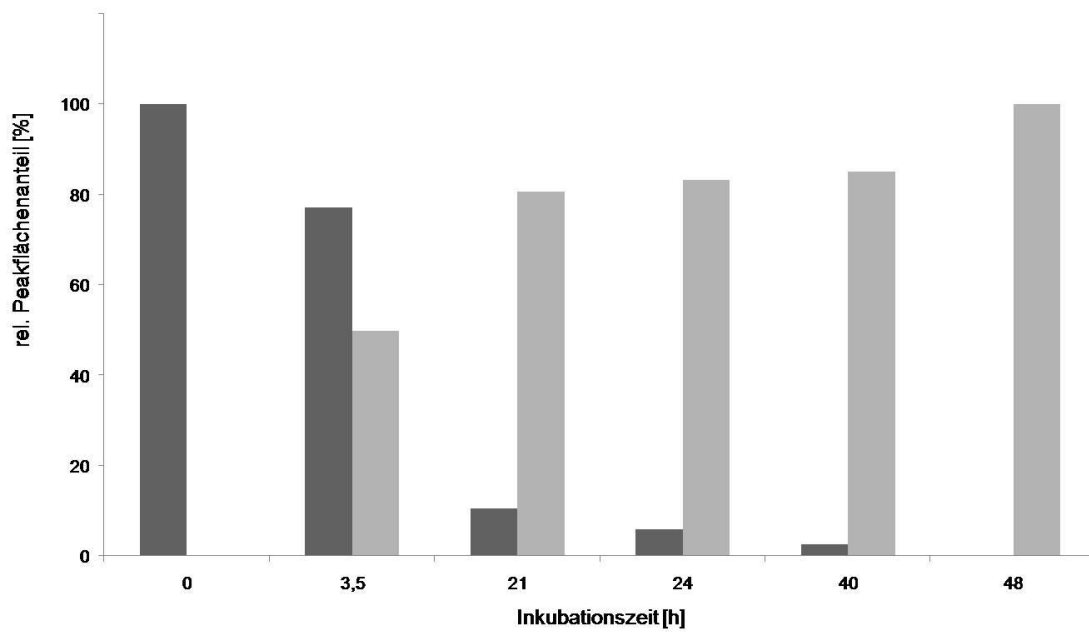


Abbildung 36: Umsetzung von Veratrylalkohol mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *P. sapidus*, dunkelgrau: Edukt, hellgrau: Produkt.

Zur Identifizierung des Reaktionsproduktes wurden die Proben einer Mikroextraktion mit Pentan/Diethylether unterworfen und der Extrakt mittels GC-MS untersucht. Dabei wurde das gebildete Produkt eindeutig als Veratraldehyd (Abbildung 37 rechts) identifiziert. Das Auftreten der Essigsäure ist durch die Verwendung eines 50 mM Natriumacetatpuffers während der Umsetzungen zu erklären.

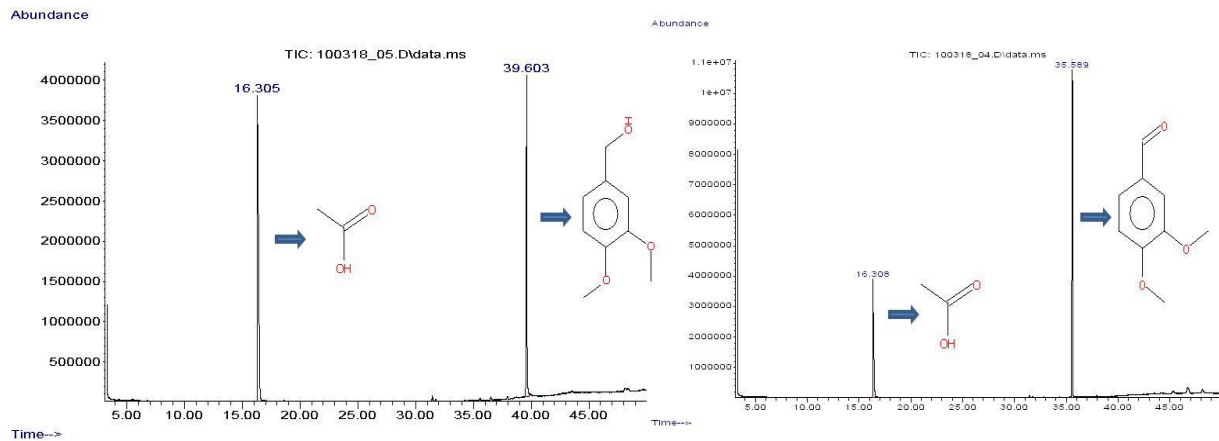


Abbildung 37: GC-MS Chromatogramme der Umsetzung von Veratrylalkohol zu Veratraldehyd; Blindprobe (links) und aktive Probe nach 48 h (rechts).

Als zweite Modellsubstanz wurde Coniferylalkkohol durch die polyvalente Peroxidase umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 1,5 h war die Entstehung von drei Produkten zu beobachten (Abbildung 38). Diese werden im Laufe der Reaktion wieder abgebaut (Abbildung 39), wobei ein wasserunlösliches Produkt entsteht. Die Identifizierung dieser Reaktionsprodukte wird zur Zeit durchgeführt.

Coniferylalkkohol war nach 6 h entsprechend einer Umsetzungsrate von $1,6 \text{ nmol min}^{-1}$ quantitativ umgesetzt.

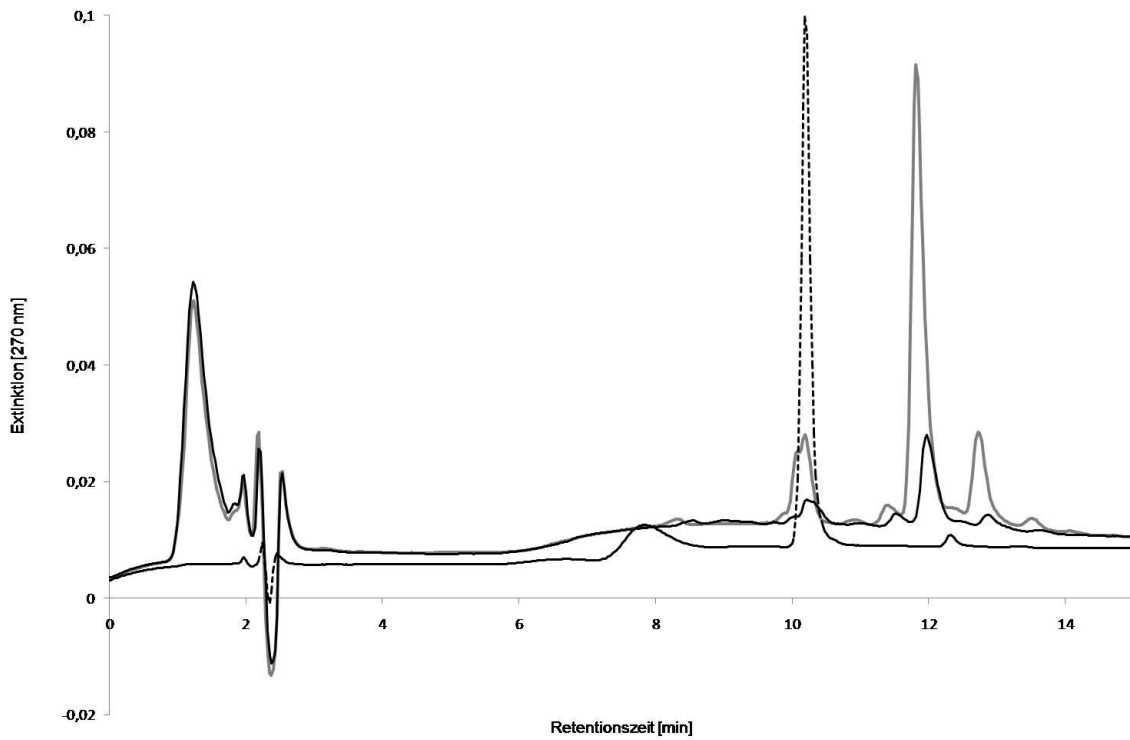


Abbildung 38: HPLC-DAD Chromatogramm, Umsetzung von Coniferylalkohol mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *P. sapidus*, gestrichelte Linie: Blindprobe, hellgraue Linie: Umsetzung nach 1,5 h, dunkelgraue Linie: Umsetzung nach 3,5 h.

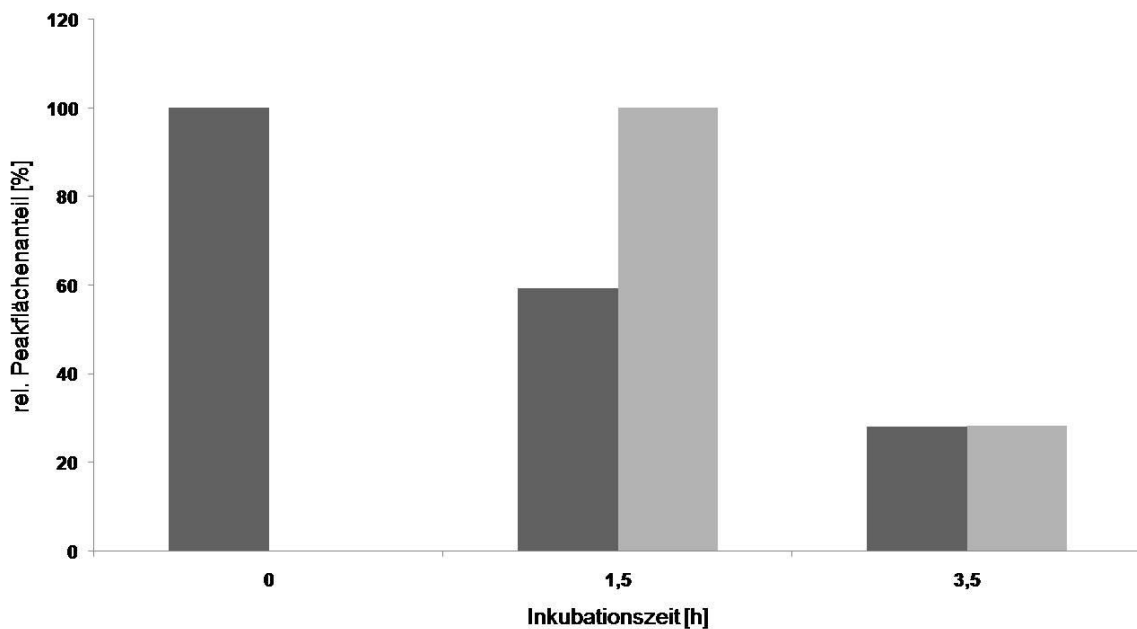


Abbildung 39: Umsetzung von Coniferylalkohol mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *P. sapidus*, dunkel grau: Edukt, hellgrau: Produkt.

Als komplexere Modellsubstrate dienten Adlerol und Lignin (organosolv, Sigma-Aldrich). Die Struktur von Adlerol (vgl. 6.8) weist im Gegensatz zu o.g. Substanzen weder eine phenolische OH-Gruppe noch eine zum Aromaten α -ständige Doppelbindung auf. Die enzymatischen Umsetzungen von Adlerol und Lignin erfolgten mit einer Peroxidase vom DyP-Typ. Zusätzlich zum Enzym wurden verschiedene Redox-Mediatoren eingesetzt. Beim Einsatz des Mediators 1-Hydroxybenzotriazol (HBT) wurden bei der Umsetzung von Adlerol zwei neue Peaks im Chromatogramm in geringer Konzentration detektiert (Abbildung 40).

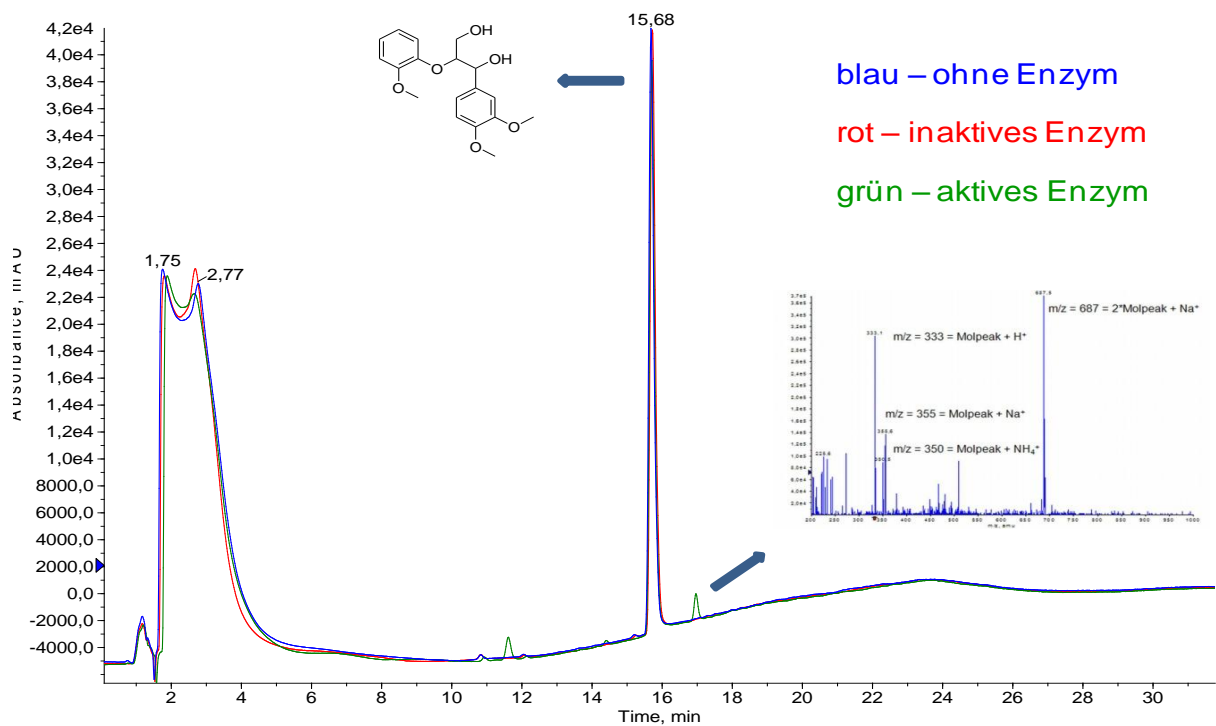


Abbildung 40: Vergleich der HPLC-DAD-Chromatogramme der beiden Blindproben – ohne Enzym (blau) und inaktives Enzym (rot) – enzymatische Umsetzung von Adlerol mit einer DyP-Peroxidase in Gegenwart des Mediators HBT (grün).

Der Peak bei 17 min zeigt im positiven Ionisierungsmodus ein Quasimolekülion mit $m/z = 333$ (Insert Abbildung 40). Es könnte sich hierbei um Adleron handeln (Barreca *et al.* 2003). Dabei wird die OH-Gruppe am α -C-Atom des Adlerols zur Ketogruppe oxidiert.

Zur strukturellen Charakterisierung von Lignin (organosolv) wurden NMR-Spektren in Aceton-d6 und DMSO-d6 aufgenommen (Abbildung 41).

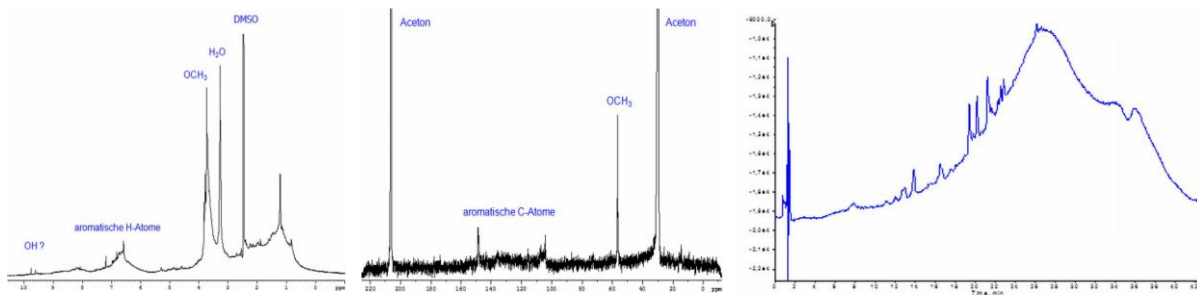


Abbildung 41: links: ^1H -NMR-Spektrum von Lignin organosolv; Mitte: ^{13}C -NMR-Spektrum von Lignin organosolv; rechts: DAD-Chromatogramm von Lignin organosolv.

Für die Umsetzungen von Lignin organosolv mittels Dyp-Typ Peroxidase wurden die gelöste Fraktion und das Pellet wie unter 6.7.3 beschrieben vorbereitet und für 23 h inkubiert. Bereits nach 6 h war ein deutlicher Farbunterschied zwischen aktiven und inaktiven Proben zu beobachten (Abbildung 42). HPLC-Analysen zeigten die Bildung von 4 Produkten (Abbildung 43).

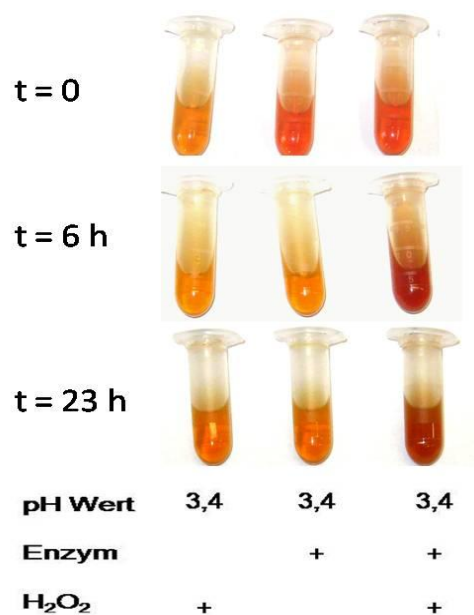


Abbildung 42: Umsetzungen von Lignin organosolv (Überstand) mit einer Dyp-Typ Peroxidase.

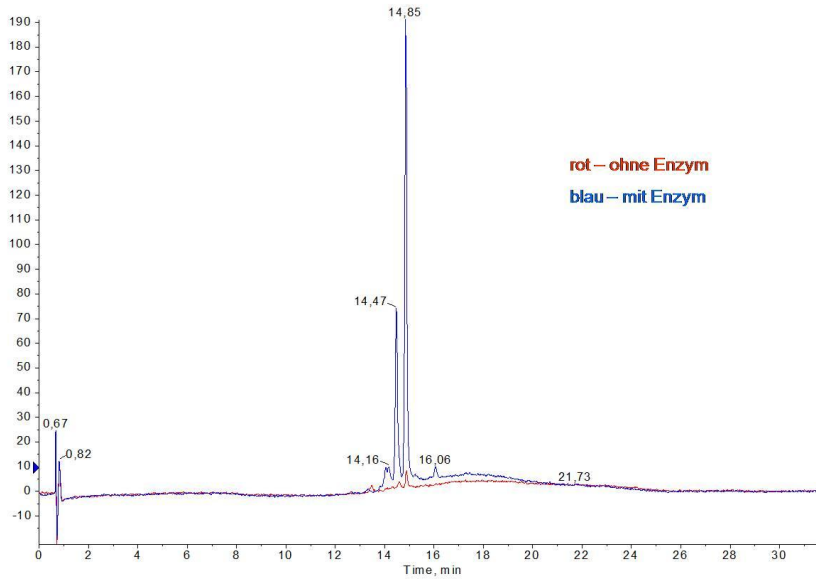


Abbildung 43: HPLC-DAD-Chromatogramm; Umsetzung von Lignin organosolv mit einer DyP-Typ Peroxidase.

Die Analyse der Ligninpellets erfolgte mittels Partikelmessung. Hierzu wurden Anzahl und Größe der Partikel durch einen MasterSizer (Malvern Instruments Ltd.) bestimmt. Die Partikeldurchmesser betragen in der Blindprobe 20 – 200 μm mit einer mittleren Größe von $\sim 60 \mu\text{m}$ (Gaußverteilung) (Abbildung 44). Durch die Umsetzung mit einer Dyp-Typ Peroxidase änderte sich die Partikelgrößenverteilung signifikant. Der mittlere Partikeldurchmesser verschob sich deutlich in kleineren Größen von 0,1 – 1 μm bzw. 2 – 30 μm . Die meisten Partikel besaßen eine Größe von $\sim 20 \mu\text{m}$ (Abbildung 44 rechts). Daneben traten auch größere Partikel mit einer Größenverteilung von 100 bis 800 μm auf.

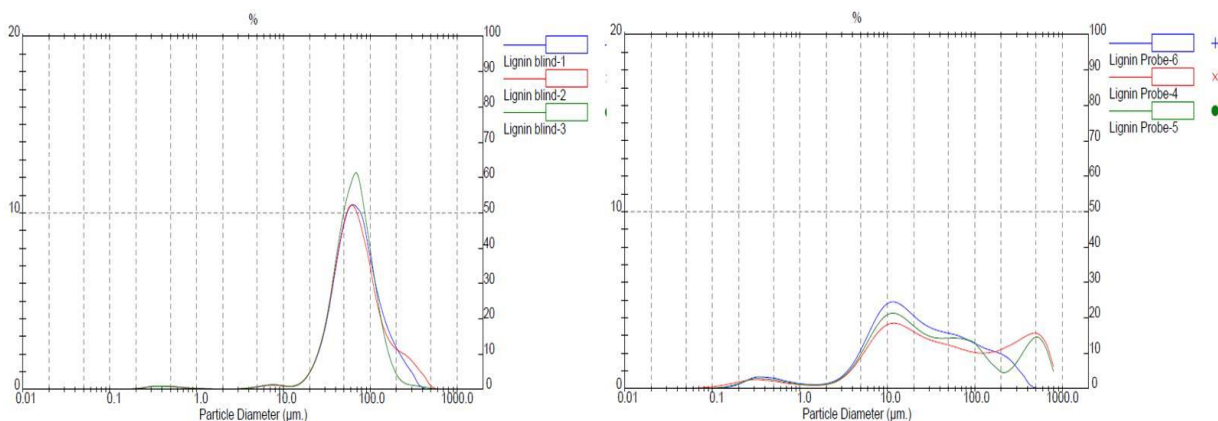


Abbildung 44: Messung der Partikelgröße von Lignin (organosolv); links: Blindwert; rechts: nach 18 h Umsetzung mit einer Dyp-Typ Peroxidase.

2.6 Klonierung lignolytischer Enzyme und heterologe Expression in *E. coli*

In vorangegangenen Arbeiten, sowie im ersten Teilbereich dieses Projektes wurden Proteine des Sekretoms von *Pleurotus sapidus* mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und Proteinspots massenspektrometrisch (MALDI-MS/MS) analysiert (2.2.1). Die Mehrzahl der dabei ermittelten Peptidsequenzen wurde mit Hilfe von Datenbankrecherchen verschiedenen Enzymen bzw. Enzymklassen zugeordnet. Mit Hilfe dieser Datenbasis wurden verschiedene Enzyme kloniert und heterolog exprimiert.

2.6.1 Klonierung und heterologe Expression einer Arylalkoholoxidase (AAO) aus *P. sapidus*

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Myzel einer 10-Tage alten Kultur isoliert und eine cDNA Bank erstellt (Abbildung 45). Ausgehend von den MS-Sequenzierungen und AAO-DNA-Sequenzen von *P. eryngii*, *P. pulmonarius* und *P. ostreatus* wurden Primer für die Amplifizierung der cDNA der AAO abgeleitet. Die Banden im erwarteten Größenbereich von ~ 1900 bp wurden aus dem Agarosegel isoliert (Abbildung 45) und kloniert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe von ChromasPro® analysiert. Die Gesamtsequenz der AAO wurde durch überlappende Einzelsequenzen identifiziert (Abbildung 46).

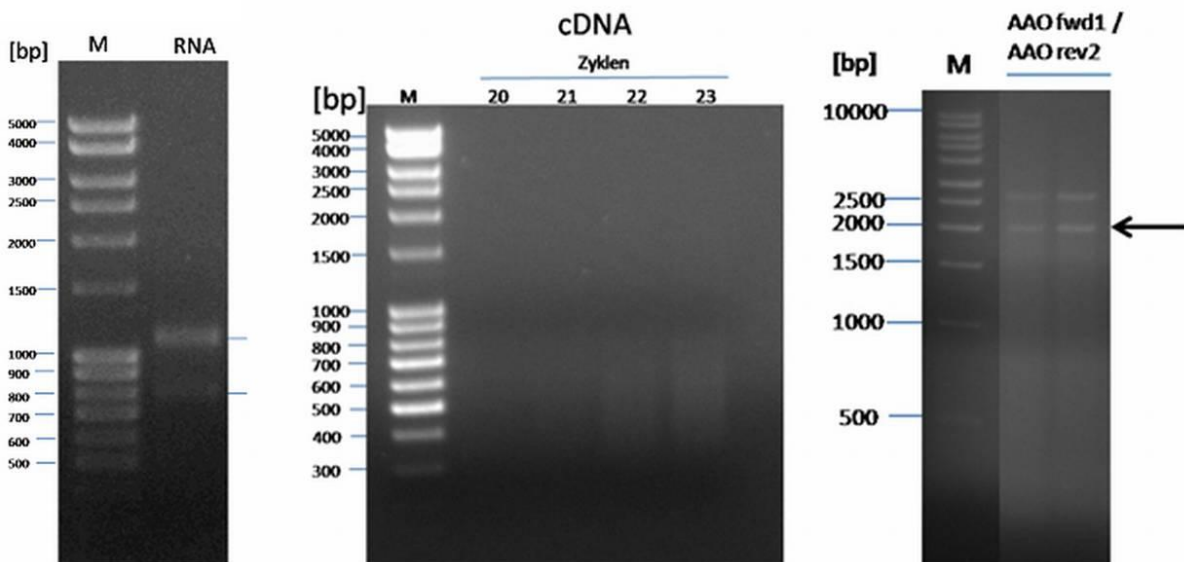


Abbildung 45: links: Analyse der Gesamt-RNA; Mitte: Analyse der ds cDNA; rechts: Analyse der PCR-Produkte; 1,2%iges Agarosegel; M: 1 kbp-Leiter (Roth).

a)
 ATGTCGTTT¹AGTGCAC²TTCGTCAAC³TTCCTTCATCGCTTGGCTTGGCTCTGCCATCACTGGCGGCCGCTAACCTCCCA
 ACCGCCGATTTT⁴TGACTACATCGTTCGTCGGGGCGGGGAACGCGGGGAATGTTGTCGCTGCACGACTCACGGAGGATCCC
 AACGTGTCGTCTTGGTCC⁵TGGAAGCGGGTGTATCAGATGAGAA⁶TGTAGTAGGGGCGAGAGGCTCCACTTCTTGGCGCC
 GGACTTGTTCCTAAC⁷TCTATCTTCGACTGGAAT⁸TACACGACAACAGCTCAAGCTGGGTACAATGGGCGGTCGATTGCG
 TACCC⁹TCTGGCCGTATGCTAGGAGGGTCTAGCTCTGTTCA¹⁰TACATGGTTATGATGCGCGGTTTCGATAGAGGACTTC
 GATCGCTATGCGGCCGTC¹¹ACTGGCGATGATGGATGGAAC¹²TGGGACAAATCCAGCAGTTCGTCAGGAAGAACGAAATG
 GTCGTGCCCCCTGCTGACAAC¹³CATAA¹⁴TACTTCCGGCGAATTTATCCAGCGGTACATGGGACTAACGGCTCTGTCTCT
 ATTAGCTT¹⁵GCCAGGCTTCCCTACCCCACTT¹⁶GATGATCGCGTCTTAGCCACAAC¹⁷TCAGGAGCAAAGCGAAGAGTCTTTT
 TTCAATCCTGACATGGGAACAGGTCATCCTCTCGGAATCAGTTGGTCAATCGCATCAGTCGGCAACGGTCAACGTAGC
 AGTTCTTCTACTGCC¹⁸TACTTACGGCTGCCCAGT¹⁹CACGGCCAACTCTCAGCGTGTGATAAA²⁰TGCTCAAGTACTAAA
 CTCGTAAACAGCGGAACGACGAACGGCTACCTGCGTTC²¹CGGTGTAGAGTACGCAGAGCGTGAAGGAGCACCACG
 ACGACTGTTTGTGCTAAAAAAGAAG²²TCGTTCTTCCGCGGGATCCGTTGGTACCCCATCTTCTGCAATGTTCAGGC
 ATCGGTGATCAGAGT²³GATCTGTACGCGTGGTATCGATACCA²⁴TCGTCAACAA²⁵TCCTAGCGTAGGCCGAAACCTGTCC
 GACCATTGCTCCTTCTGCTACGTTCTT²⁶CGTCAACAACAATCAATCATTCGATAACCTTTCAGAGACTCGTCCGAG
 TTCAACGCTGATTTAGATCAGTGGACAAACAC²⁷TAGAACCGGGCCCTCTCACC²⁸CGCTGATGCTAACCACTGGCCTGG
 CTGCGGTTGCCATCGAAT²⁹CAAGCATCTTCCAGTCCGTC³⁰CCGGACCCAGCTGCGGGCCCAACTCGGCTCATGGGAG
 ACCATCTTCTCGAACCAATGGTTCCATCCAGCTCT³¹CCCTCGTCTGATACTGGTAACTTTATGAGCGTTACAAACGCA
 TTAAT³²TGCTCCCGTGGCCCGTGGGGACATCAAGCT³³TGCTACGTTCAACCCATTCGACAAGCCACTCATCAACCCGAG
 TATCTCTCAACGGAA³⁴TCGACATCTTCGCCATGATCCAAGCAGTCAAATCAAACCTCCGTTCTTTTGGCCAAGCA
 TGGGCAGATTT³⁵CGTTATACGCCCATTCGATGCCGTTT³⁶TGAGCGACCCGACGAAACGACGCTGTATCGAGTCATACATC
 CGAGACAACGCCAACACAATTTTCCACCCAGTAGGAACGGCCAGCATGTCCCACGCGGAGCTTCTTGGGGCGTCGTA
 GATCCCGATCTCAAGGTCAAAGGTGTGGACGGCTCAGAATCGTCGATGGGTCTATTTTGCCTTCCGCGCCAAACGCG
 CACACCAAGGACCGATATACCTTGTAGGCGAACGAGGAGCTGATCTAATTAAGGCTGATCAG 1779 bp

b)
 MSFSALRQLLF IACLALPSLAAANLPTADFDYI VVGAGNAGNVVAARLTEDPNVSVLVLE
 AGVSDENVVGAEAPLLAPGLVPNSI FDWNYTTT¹AQAGYNGRSIAYPRGRMLGGSSSVHYM
 VMMRGSIEFD²RYAAVTGDDGWNWDNIQQFVRKNEMVVPADNHNTSGEFI PAVHGTNGS
 V³SISLPGFPTPLDDRVLAT⁴TQEQSEEFFNPD⁵MGTGHPLGISWSIASVGNQRRSSSTAY
 LRPAQSRPNLSVL INAQVT⁶KLVNSGTTNGLPAFR⁷CV⁸EYAEREGAPTTTVCAKKEVVL⁹SAG
 SVGTPILLQLSGIGDQSDLSAVGIDT¹⁰IVNNPSVGRNLS¹¹DHLLLPATFFVNNNQSF¹²DNLFR
 DSSEFNADLDQWTNTRT¹³GPLTALIANHLAWLRLPSN¹⁴SI¹⁵FQSVDPAAAGPNSAHWETIFS
 NQWFHPALPRPDTGN¹⁶MSVTNALIAPVARGDIK¹⁷LATS¹⁸NPFDKPLINPQYLS¹⁹TEFDIFAMI
 QAVKSNLRELSGQAWADFVIRPF²⁰DARLSDPTNDAAIESYIRD²¹NANTI²²FHPVGTASMSPRG
 ASWGVVDPDLKVKVDGLRIVDGSILPFAPNAHTQGP²³IYLVGERGADLIKADQ 593 aa

Abbildung 46: a) Nucleotid- und b) übersetzte Aminosäuresequenz der AAO aus *P. sapidus*.

Bei Datenbankrecherchen wurden hohe Homologien der klonierten Sequenz zu AAOs aus *P. pulmonaris* und *P. eryngii* festgestellt. Die zuvor massenspektrometrisch ermittelten Peptidsequenzen sind in der übersetzten Peptidsequenz enthalten (Abbildung 47).

```

1  MSFSALRQLLFIACLALPSLAAANLPTADFDYIVVGAGNAGNVVAARLTEDPNVSVLVLEAGVSDENVVGAERPLLAFL 80
-----
81  VPNSIFDWNYYTTAQAGYNGRSIAYPRGRMLGGSSSVHYMVMRGSIE-----DFDRYAAVTGDDGWNWDNIQQFVR 152
1  -----LVNSGTTNGLPAFRDSSEFNADLDQWINTRYAAVTGDDGWNWDNIQQFVR 50
153  KNEMVVPADNHNTSGEFIPAVHGTVGSVSIPLGFPTPLDDRVLATTQEQQSEEFFNPDMTGHPLGISWSIASVGNQG 232
51  -----TKGPLYLGMF----- 60
233  RSSSSTAYLRPAQSRPNLSVLINAQVTKLVNSGTTNGLPAFRDVEYAEREGAPITTVCAKKEVLSAGSVGTPILLQLSG 312
-----
313  IGDQSDLSAVGIDIIVNNPSVGRNLSDHLLLPATFFVNNNQSFNLFDRSSEFNADLDQWINTRTGPLTALIANHLAWLR 392
-----
393  LPSNSSIFQSVDPDPAAGPNSAHWETIFSNQWFHPALPRPDTGNFMSVTNALIAFVARGDIKLATSNPFDKPLINPQYLST 472
-----
473  EFDIFAMIQAVKSNLRFSGQAWADFVIRPFARLSDPTINDAAIES-----YIRDNANTIFHFVGTASMSPRGAS 542
61  -----RLSDPTINDAALFAGGPLRGTWFDYLVVGAGNAGNVV--AARLYPTGAG 106
543  WGVVDPDLKVKGVGDLRIVDGSILPFAPNAHTQGPYYLVGERGADLIKADQ 593
107  NAHMTAAR----- 114

```

Abbildung 47: Sequenzvergleich der durch massenspektrometrisch sequenzierten Peptide mit der übersetzten AAO cDNA aus *P. sapidus*.

Bioinformatisch (SWISS-MODEL) wurde die hypothetische Tertiärstruktur der AAO aus *P. sapidus* in Homologie zur Struktur der AAO aus *P. eryngii* berechnet (Abbildung 48).

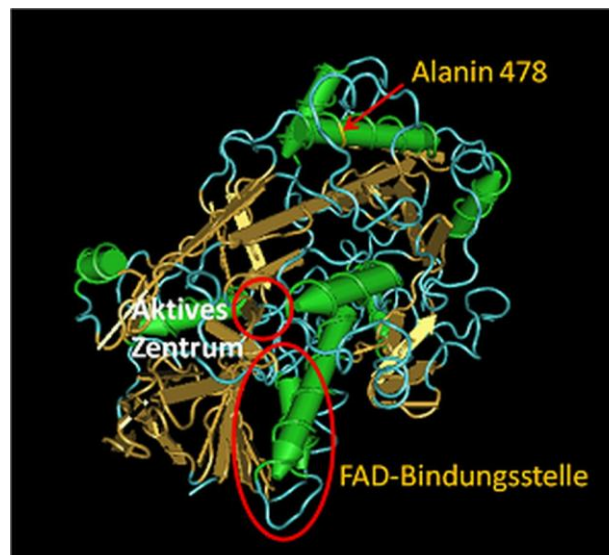


Abbildung 48: 3D-Modell der AAO aus PSA, SWISS-MODEL.

Für die heterologe Expression der AAO wurde die cDNA der AAO in die Expressionsvektoren pMAL-c4X und pMAL-p4X (NEB) kloniert. Das Anfügen der benötigten Restriktionsenzymststellen an die AAO-cDNA-Sequenz erfolgte mittels

PCR. Das PCR-Produkt wurde über eine Agarosegelelektrophorese analysiert (Abbildung 49) und isoliert.

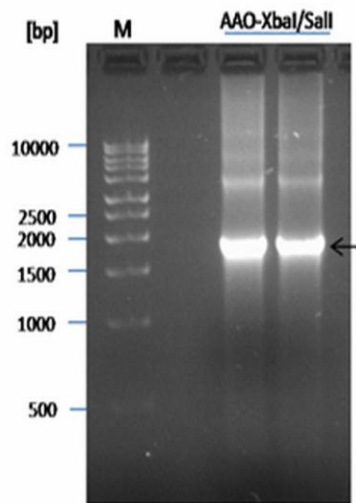


Abbildung 49: Analyse der PCR-Produkte; 1,2%iges Agarosegel; Die mit einem Pfeil markierten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. M – Marker: 1 kbp-Leiter; AAO-XbaI/SalI – AAO-Gen mit angefügten Schnittstellen, erwartete Fragmentgröße 1800 bp.

Die Expressionsplasmide wurden in *E. coli* K12-Zellen transformiert. Bei der Überexpression wird das Protein als MBP (Maltose-Binde-Protein)-Fusionsprotein exprimiert. Während das Fusionsprotein bei der Expression im Vektor pMAL-p4X (p = periplasmatisch) über ein Signalpeptid in den periplasmatischen Raum transportiert wird, verbleibt es bei der Expression im Vektor pMAL-c4X (c = cytoplasmatisch) im Cytoplasma. Mit beiden Expressionssystemen wurde eine Produktion der Fusionsproteine gezeigt (Abbildung 50).

Die Überproduktion des Zielproteins im Cytoplasma vermindert das Bakterienwachstum und wirkt somit ggf. cytotoxisch. Das Fusionsprotein wird teilweise abgebaut, da sowohl eine Bande für das MBP alleine (42,5 kDa) als auch eine Bande für das Fusionsprotein (~ 113 kDa) vorkommt (Abbildung 50). Das MBP bleibt als stabiles Abbauprodukt bestehen.

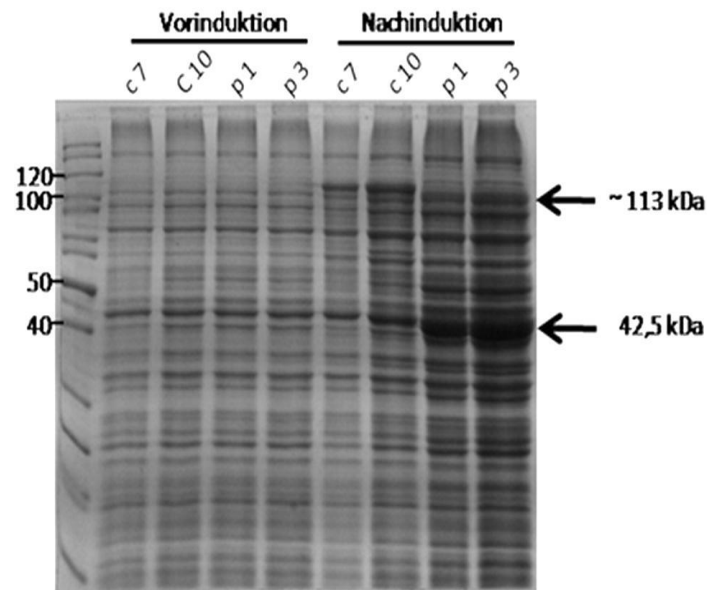


Abbildung 50: Expression des MBP-AAO-Fusionsproteins; 12%iges SDS-Polyacrylamidgel; c: cytoplasmatischer Vektor; p: periplasmatischer Vektor; erwartetes Molekulargewicht für das MBP: 42,5 kDa; erwartetes Molekulargewicht für das MBP-AAO-Fusionsprotein : ~ 113 kDa; Marker: PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

Die codierende Sequenz wurde daher als Fusionsprotein mit einem MBP-Tag in *E.coli* BL21(DE3)-Zellen, einem Protease-defizienten Stamm, exprimiert.

Dabei wurde eine große Menge Enzym produziert, jedoch liegt das Enzym hauptsächlich in *inclusion bodies* eingeschlossen vor (Abbildung 51).

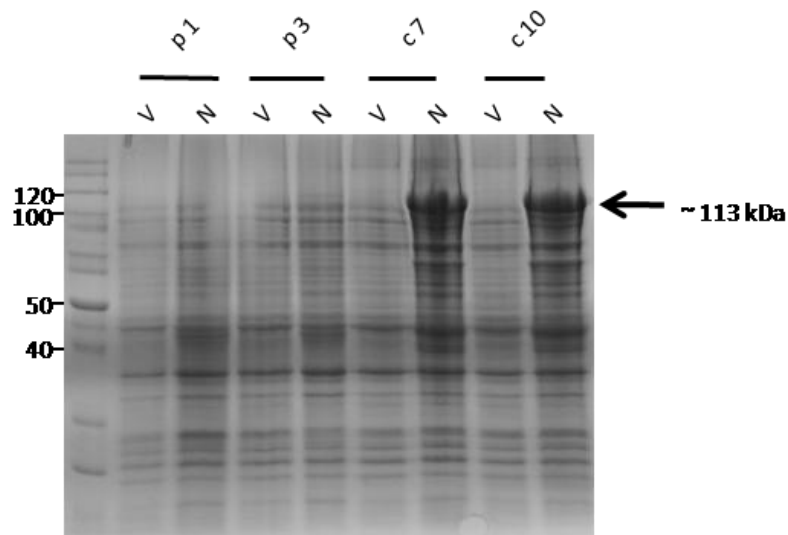


Abbildung 51: Heterologe Expression der AAO als Fusionsprotein mit MBP-Tag in Protease-defizienten *E. coli*; 12%iges SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt; p: periplasmatischer Vektor; c: cytoplasmatischer Vektor; v: vor Induktion; n: nach Induktion; erwartetes Molekulargewicht für das MBP: 42,5 kDa; erwartetes Molekulargewicht für die AAO: ~70 kDa; erwartetes Molekulargewicht für das MBP-AAO-Fusionsprotein : ~ 113 kDa; Marker: PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

Um das Enzym in seiner nativen Konformation zu erhalten und die katalytische Aktivität des Enzyms wiederherzustellen, wurde das Enzym unter denaturierenden Bedingungen behandelt (Solubilisierung) und anschließend *in vitro* durch blitzartige Verdünnung (*flash dilution*) in Renaturierungspuffer (6.9.5) ca. 80 h bei 16°C rückgefaltet (Ruiz-Duenaz *et al.*, 2006).

Die erfolgreiche Rückfaltung des Enzyms wurde anhand der Oxidation von Veratrylalkohol zu Veratrumaldehyd (AAO-Assay) überprüft. Die Produktbildung wurde photometrisch bei 310 nm detektiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei 30 °C in einem 50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5.

Die MBP-AAO wurde 1:50 in den Rückfaltungspuffer verdünnt. Für die rückgefaltete AAO im Proteingemisch wurde eine Aktivität von 5 U·L⁻¹ bestimmt.

Allerdings konnte das Enzym mit Hilfe des MBP-Tags nicht gereinigt werden. Obwohl nach der Rückfaltung katalytische Aktivität bestimmt werden konnte, band das Fusionsprotein nicht an die Matrix. Dies weist darauf hin, dass nur der AAO-Teil des Proteins korrekt zurückgefaltet wurde. Der MBP-Teil des Fusionsproteins wurde vermutlich nicht korrekt gefaltet, daher erfolgte keine enzymatische Bindung des Maltosebindungsproteins an die Amylose.

Um eine Reinigung des rekombinanten Enzyms unter denaturierenden Bedingungen zu erreichen, wurde die codierende AAO-Sequenz in den pET-15b Vektor (Novagen) umkloniert. Die AAO wurde als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-Tag in E.coli BL21(DE3)-Zellen exprimiert. Auch hierbei wurde eine große Enzymmenge produziert, jedoch lag das Enzym ebenfalls hauptsächlich in inclusion bodies eingeschlossen vor (Abbildung 52).

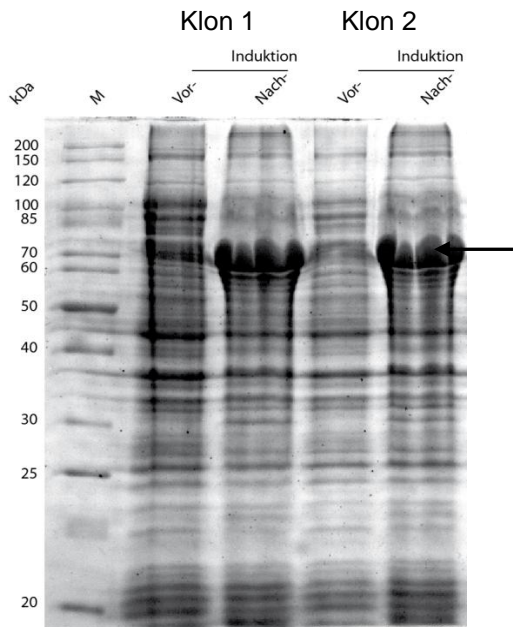


Abbildung 52: Heterologe Expression der AAO als Fusionsprotein mit n-terminalem HIS-Tag in Protease-defizienten *E. coli*; 12%iges SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt; erwartetes Molekulargewicht für die AAO: ~70 kDa; erwartetes Molekulargewicht für das HIS-AAO-Fusionsprotein : ~ 70 kDa; Marker: PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

Das Enzym wurde solubilisiert und über eine Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 53). Um wieder katalytische Aktivität des Enzyms zu erhalten, wurde das Enzym rückgefaltet (Ruiz-Duenaz *et al.*, 2006).

Die His-AAO wurde 1:30 in den Rückfaltungspuffer (6.9.5) verdünnt. Für die gereinigte, rückgefaltete AAO wurde eine Aktivität von $2 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ bestimmt.

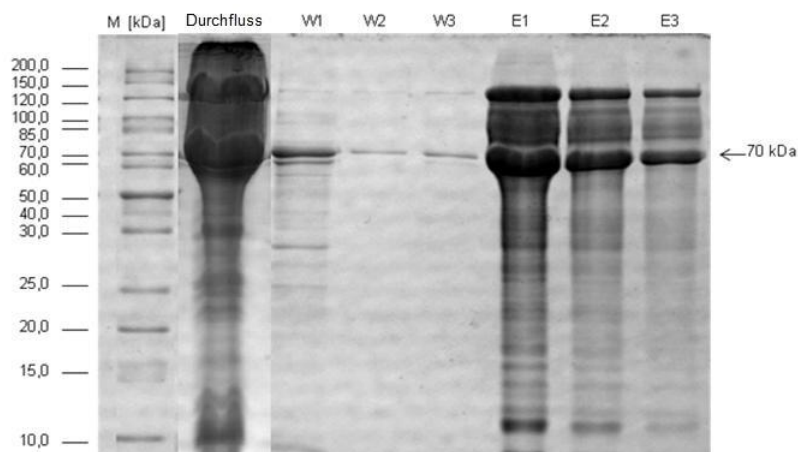


Abbildung 53: Elektrophoretische Analyse der Reinigung der His-AAO über Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen, 12%iges SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie gefärbt; erwartetes Molekulargewicht für die AAO: ~70 kDa; erwartetes Molekulargewicht für das HIS-AAO-Fusionsprotein : ~ 70 kDa; Marker: PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

2.6.2 Klonierung einer GDS(L)-Lipase aus *P. sapidus*

Neben der bereits beschriebenen AAO (2.6.1) wurden in der Sekretomanalyse von *P. sapidus* einzelne Peptidsequenzen (Tabelle 23) einer GDS(L)-Lipase zugeordnet. Diese wurden per Datenbankrecherche mit einer GDS(L)-Lipase aus *P. ostreatus* verglichen (Abbildung 54).

<i>P. ostreatus</i>	MLRSFVVLTSVCAAYA AVLPRDALNGVHLAVDPKCGVAGGRFGDVNIGLKSLTSYEHIVA
<i>P. sapidus</i>	-----
<i>P. ostreatus</i>	FGDSWTDGGGAHDGEPLPPPILTPPNPRAGGRASDGPVWVERLASAAGATLLDFAEIGAVT
<i>P. sapidus</i>	-----
<i>P. ostreatus</i>	DKNIWPKTLLPTTSSGANDFVQG AHNYINQRNGFDPETTLYTIFLGVGDFDLSQQTGTDN
<i>P. sapidus</i>	-----
<i>P. ostreatus</i>	LYTVAGAIVYTILELTSYPTYAKNII VVDNYGRGIYETPSGDAFKEGIYAGLNTLHTRYG
<i>P. sapidus</i>	-----NIIVVDNYGR-----EGIYAGLNTLHTR--
<i>P. ostreatus</i>	TNVGFVDLKTLLWDGVLGSSPGYEAFGYTSKGACLPSSTSTSGACANPESTFYWLPGIPSA
<i>P. sapidus</i>	-----
<i>P. ostreatus</i>	ATHGLIADYVEKVL TTC
<i>P. sapidus</i>	-----

Abbildung 54: Sequenzvergleich einer GDS(L)-Lipase aus *Pleurotus ostreatus* mit den aus *Pleurotus sapidus* ermittelten Peptidsequenzen (grün) und (rot).

Zunächst wurde der Aktivitätsverlauf von Lipasen (6.4.1) während der Kultivierung von *P. sapidus* bestimmt. Auch Einflussfaktoren wie zum Beispiel die Kohlenstoff- (C-)Quelle, wurden untersucht.

Die Aktivität von Lipasen im Sekretom wurde durch die verwendete C-Quelle signifikant beeinflusst. Ein deutlicher Induktionseffekt wurde bei der Kultivierung des Pilzes mit Tween® 80 als einziger C-Quelle beobachtet (Abbildung 55). Die höchste Lipaseaktivität – mit 25,8 U L⁻¹ – wurde am 5. Kulturtag gemessen.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde daher Myzel (ca. 100 mg) vom 5. Tag der Kultivierung mit Tween® 80 als C-Quelle verwendet. Mit der isolierten Gesamt-RNA wurde eine cDNA-Bank erstellt (Abbildung 56) und diese zur weiteren Klonierung verwendet.

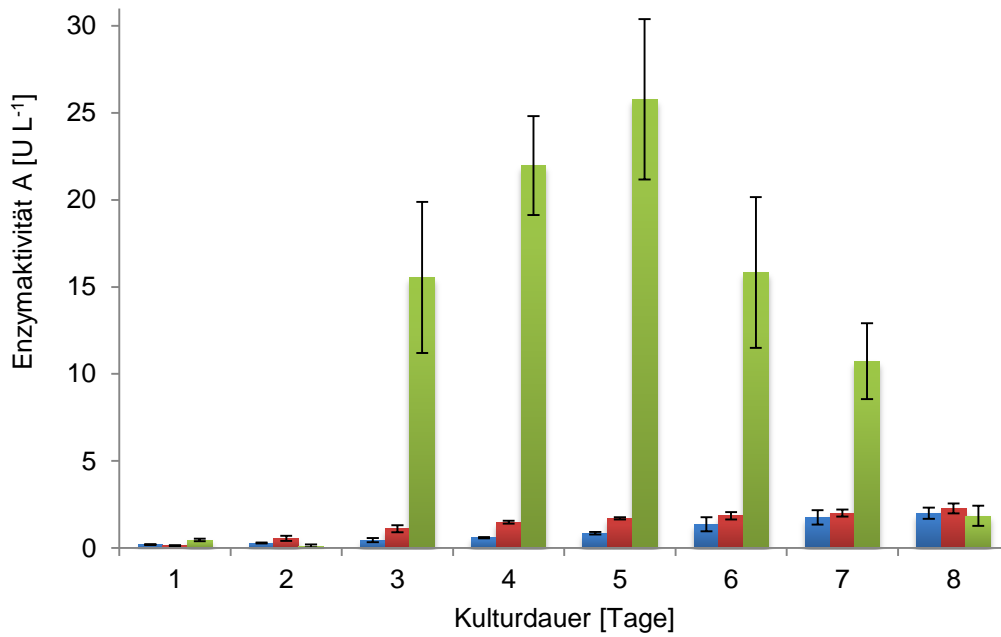


Abbildung 55: Lipaseaktivität in Kulturüberständen von Submerskulturen von *P. sapidus*, kultiviert in Medien mit verschiedenen C-Quellen; blau: Keimöl; rot: SNL-Medium und grün: Tween® 80.

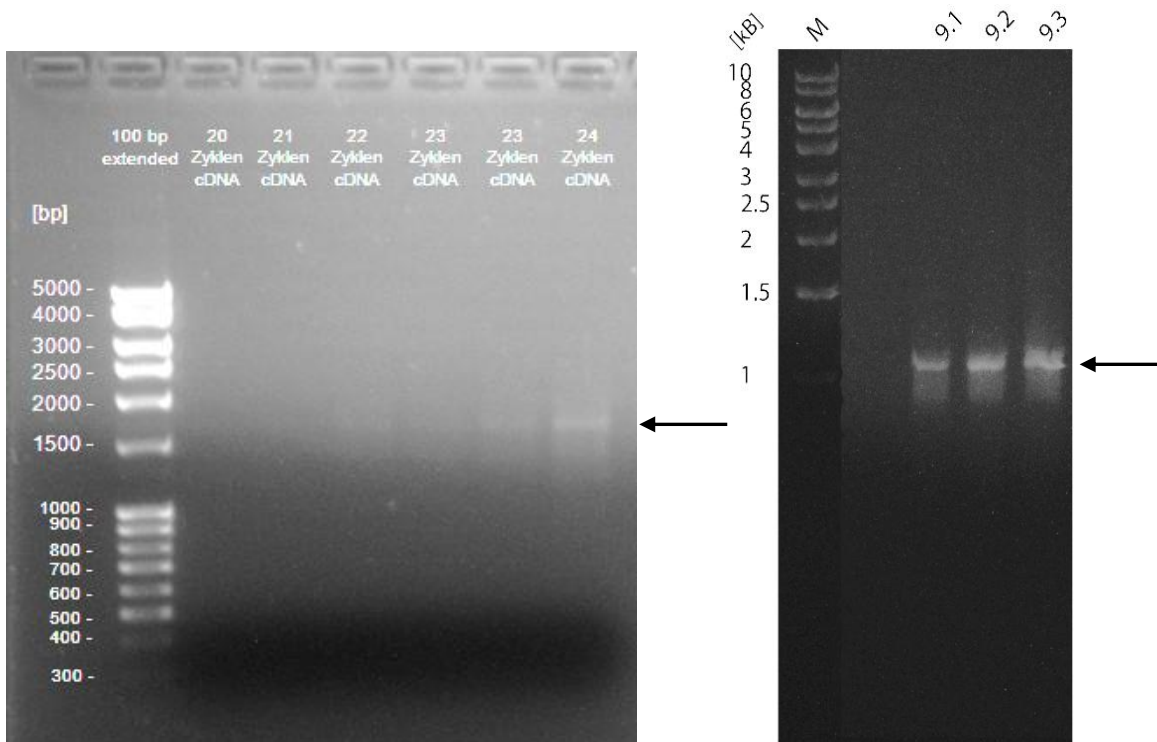


Abbildung 56: links: Analyse der cDNA Banken; rechts: Analyse der PCR-Produkte mit spezifischen Primern, erwartete Größe: ~1000 bp; 1,2%iges Agarosegel; M: 1 kbp-Leiter (Roth).

Die Primer für die Amplifizierung der Gesamtsequenz der GDS(L)-Lipase wurden von einer DNA-Sequenz für eine GDS(L)-Lipase des nahen Verwandten *P. ostreatus* abgeleitet. Die Lage wurde so gewählt, dass das amplifizierte Fragment sowohl das Start- als auch das Stopp-Codon der GDS(L)-Lipase enthielt (Tabelle 23).

Die Banden im erwarteten Größenbereich von ~ 1000 bp wurden aus dem Agarosegel isoliert (Abbildung 56), kloniert und sequenziert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe von ChromasPro[®] analysiert.

Die klonierte Sequenz umfasst 954 Basenpaare und 317 Aminosäuren (Abbildung 57). Das berechnete Molekulargewicht beträgt **33,3 kDa**. In der Sequenz sind die konservierten Struktur motive GDS(L) (Leucin ist durch Tryptophan ersetzt) bzw. GxSxG, welche das Serin als katalytisches Nukleophil umgeben, vorhanden. Die zuvor massenspektrometrisch ermittelten Peptidsequenzen aus *P. sapidus* (Tabelle 23), die der Enzymklasse der GDS(L)-Lipasen zugeordnet wurden, sind in der übersetzten Peptidsequenz enthalten.

<pre> ATG CTC CGA TCC TTT GTC GTA CTG ACA TCC GTC TGC GCT GCC TAC GCT GCA GTA CTT CCC CGC GAC GCA CCC AAC GGC GTT CAC TTG GCC GTT GAT CCA AAG TGC GGT GTT GCG GGG GGA CGA TTT GGC GAT GTC AAC ATC GGT CTC AAA CCG TTG ACA TCC TAC GAA CAT ATC GTC GCA TTT GGA GAC TCA TGG ACT GAC GGA GGA GCA CAT AAC GGA GAG CCG TTA CCG CCA CCA GTT CTT ACA CCA CCA AAC CCA AGG GCT GGA GGA CGG GCG AGT AAT GGT CCT GTA TGG GTG GAG AAA TTG GCT TCC GCT GCT GGT GCA ACC TTG CTC GAC TTT GCA GAA ATT GGC GCT GTT ACA GAT AAA AAT ATC TGG CCA TCT AGT CTG CTT CCT ACC ACC GCA TCG AGC GCA AAC GAC TTT GTC GGT CAA GCG CAC AAC TAC ATT AAT CAA CGA AAC GGA TTT GAT CCA GAG ACG ACA CTA TAT ACC ATA TTC CTC GGA GTC GGG GAC TTT GAC TTG TCC CAA CAA ACG GGC ACT GAT AAC CTC TAC ACG GTG GCT GGC GCC ATC GTA TAC ACG ATC CTT GAA CTC ACT TCC TAC CCC ACA TAC GCC AAG AAC ATA ATC GTC GTT GAC AAC TAT GGT CGT GGA ATC TAC GAA ACA CCG TCA GGA GAC GCG TTC AAG GAA GGC ATC TAC GCT GGA TTG AAC ACC CTC CAC ACG AGA TAC GGC ACG AGC GTC GGG TTT GTC GAT CTC AAG ACC CTA TGG GAT GGC GTC TTG GGC AGC AGC CCC GGA TAC GAA GCA TTT GGA TAT ACC AGT AAG GCA GCA TGC TTG CCC TCT TCA ACG TCG ACG TCT GGA GCC TGT GCC AAT CCC GAA TCA ACG TTC TAC TGG CTA CCA GGG ATA CCG TCG GCG GCT ACG CAC GGT CTG ATC GCA GAC TAC GTG GAG AAG GTG CTG ACA ACA TGC TGA </pre>	<pre> MLRSFVVLTSVCAAYA AVLPRDAPNGVHLAVDPKCGVAGGRF GDVNI GLKPLTSYEHIVAF<u>GDS</u>WTDGGAHNG EPLPPPVLTPPNPRAGGRASNGPVVVEKLASAAGATLLDFAEIGAVTDKNIWPSSLLPTTASSANDFVQGQAHN YINQRNGFDPETTLTYTIFLGVGDFDLSQQTGTDNLYTVAGAIVYTI LELTSYPTYAKNIIVVDNYGRGIYETP SGDAFKEGIYAGLNTLHTRYGTSVGFVDLKTLLWDGVL<u>GSSPGY</u>EAFGYTSKAACLPSSTSTSGACANPESTFY WLPGIPSAATHGLIADYVEKVLTTTC* </pre>
--	---

Abbildung 57: oben: Nukleotidsequenz der klonierten GDS(L)-Lipase aus *P. sapidus* (954 bp); unten: übersetzte Aminosäuresequenz der GDS(L)- Lipase aus *P. sapidus*. Das Strukturmotiv GxSxG ist blau, unterstrichen markiert und das GDS(L)-Motiv ist rot, unterstrichen hervorgehoben. Die in der Sekretomanalyse erhaltenen Peptidsequenzen sind schwarz unterstrichen.

Bei Datenbankrecherchen wurden hohe Homologien der klonierten Sequenz zu einer Lipase codierenden Aminosäuresequenz aus *P. ostreatus* (POS) festgestellt. Die beiden Sequenzen wiesen eine Übereinstimmung von 96% auf.

```

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

POS      MLRSFVVLTSVCAAYA AVLPRDALNGVHLAVDPKCGVAGGRFGDVNIGLKSLTSYEHIVA 60
PSA      MLRSFVVLTSVCAAYA AVLPRDAPNGVHLAVDPKCGVAGGRFGDVNIGLKPLTSYEHIVA 60
          *****
          *****

POS      FGDSWTDGGAH DGEPLPPPILTPPNPRAGGRASDGPVWVERLASAAGATLLDFAEIGAVT 120
PSA      FGDSWTDGGAH NGEPLPPPVLTPPNPRAGGRASNGPVWVEKLASAAGATLLDFAEIGAVT 120
          *****;*****;*****;*****;*****

POS      DKNIWPKTLLPTSSGANDFVGOAHNYINQRNGFDPETTLYTIFLGVGDFDLSQQTGTDN 180
PSA      DKNIWPSSLLPTASSANDFVGOAHNYINQRNGFDPETTLYTIFLGVGDFDLSQQTGTDN 180
          *****;*****;.*****

POS      LYT VAGAI VYTI E L E L T S Y P T Y A K N I I V V D N Y G R G I Y E T P S G D A F K E G I Y A G L N T L H T R Y G 240
PSA      LYT VAGAI VYTI E L E L T S Y P T Y A K N I I V V D N Y G R G I Y E T P S G D A F K E G I Y A G L N T L H T R Y G 240
          *****

POS      TNVGFVDLKT LW D G V L G S S P G Y E A F G Y T S K G A C L P S S T S T S G A C A N P E S T F Y W L P G I P S A 300
PSA      T S V G F V D L K T L W D G V L G S S P G Y E A F G Y T S K A A C L P S S T S T S G A C A N P E S T F Y W L P G I P S A 300
          *.*****

POS      ATHGLIADYVEKVLTTTC 317
PSA      ATHGLIADYVEKVLTTTC 317
          *****

```

Abbildung 58: Vergleich der Aminosäuresequenz aus *P. sapidus* mit der Aminosäuresequenz einer Lipase aus *P. ostreatus*.

Um eine genaue Einordnung des isolierten Enzyms vornehmen zu können, wurden Datenbankrecherchen durchgeführt. Mit Hilfe von BLAST (NCBI) wurde eine Homologie zu Enzymen der SGNH-Hydrolase Superfamilie festgestellt. Die Domänensuche mit "Pfam" (Sanger) zeigte, dass das Enzym den GDS(L)-Lipasen zugeordnet werden kann, die zu dieser Superfamilie gehören.

Ein Datenbankabgleich, zur Ermittlung einer möglichen Glucosebindungsdomäne (CBD), zeigte, dass keine bekannte CBD vorhanden ist.

Die codierende Sequenz der GDS(L)-Lipase aus *P. sapidus* wurde zur heterologen Expression in *Trichoderma reesei* an die Firma AB Enzymes weitergeleitet (2.8.2).?

2.6.3 Klonierung einer Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus*

Die Primer (Tabelle 24) wurden wegen der großen Homologie von *P. sapidus* zu *P. ostreatus* von der Dyp-Typ Peroxidase-Gensequenz aus dem *P. ostreatus*-Genomprojekt abgeleitet.

Als Matrize wurde eine bereits vorhandene cDNA-Bank (2.6.2) verwendet. PCR-Produkte mit der erwarteten Fragmentgröße von ~ 1600 bp (Gen + flankierende Sequenzen) wurden aus dem Agarosegel isoliert (Abbildung 59), in den Vektor pCR2.1-TOPO® zwischenkloniert, in *E. coli* TOP10 Zellen transformiert und sequenziert. Eine Nukleotidsequenz mit 1551 bp wurde erhalten. Ein Vergleich mit der Datenbank ergab, dass es sich bei der Sequenz um eine Dyp-Typ Peroxidase handelt.

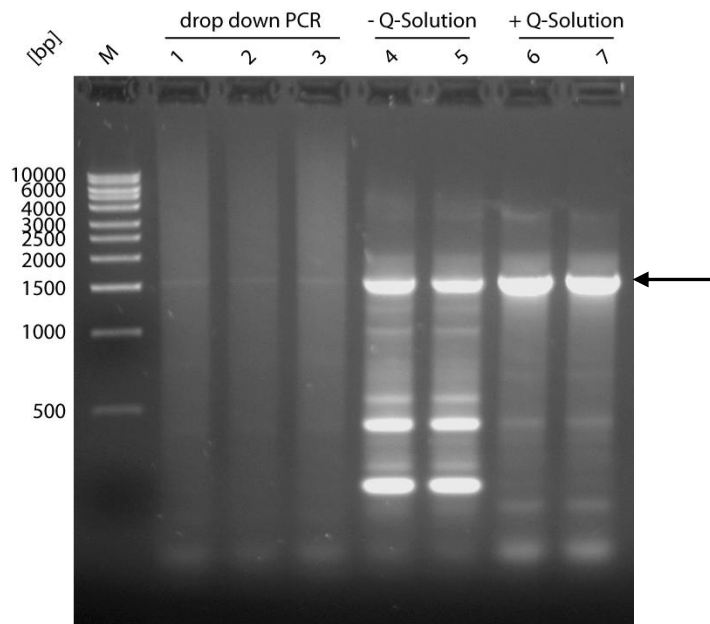


Abbildung 59: Analyse der PCR-Produkte; 1,2%iges Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel. Die mit einem Pfeil markierten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. (M – Marker: 1 kbp-Leiter; Dyp-Typ Peroxidase-Gen, erwartete Fragmentgröße 1600 bp)

Die mittels der Funktion „EMBOSS Transeq“ der Datenbank „EMBL-EBI“ von der ermittelten cDNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz für die Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus* umfasst 516 Aminosäuren (Abbildung 60). Das berechnete Molekulargewicht beträgt **57,1 kDa** mit einem berechneten pI von 5,73.

```

ATGCGCTGGTGGACTACCTGCGTCGCTCTCACTTCGTTAATACCTTACGCCCTCTTGCCAGTTATGGGTTCAATCTGCCTCAGCAACTCGAGGCGA
GGCAGAACGACTATCCGAGTGGATCCCTACTACAGACTATCCTGGGCAGCATAATTGCCAACGCTTGAGTTGATCCAGAAGTTGAATGCCACTAA
TGGCACATTCTGCGCTGGAAGAGATTCAGGAGATATTATGATTGGCATGAGGAAGCCCAAAGAAATCTTCTTTTCTACTCGCTTCAGAATCCA
AGGAAGTTCAAGAGTGTCTCGCGAAATTGATATACCCTCACATAACTACGACTGCTCAAATGGTCTGCACCACCTGCGCGCAACCCTCAGCTATGC
TGAACGTCGCTTGGACTTCCCAAGGGTTGCGTAAGCTCGGCGTCTTAGATAACCTCGGTGATCCCTACTTTCGCTATGGGGCAATTAAGCGACGCTGC
CGCGCTTGGTGATACCGACCCAAGCACAACTTGGGCCCCAGGTCTCTACGCCAACAGACGGACGGCGCATTCCTCATCGCGGCTAAAGACTGGGAA
CCCATCGACACCTTACTTAATCAAATGAAGGCCTGGTTGGGTGATGCGATCGTAGAGACACACAGCAACAGGGGCGCAGTACGACCTGGCGATGCAG
CTGGTAAAGAGCACTTTGGCTGGCTTGATGGCTTTATTCAACCTGCTGTAGCTGGCTTTGCTACAAGCACATATCCCGACAGCAGCTCCTCCTACC
CGGTACGCTTTTACGAAGGAAATCGGCGACCCTCGCAGAGCTGCCCCAGCAGCATGGACGAAATGGGGTTCCTTCATGGCTTACCGACAACTTCAG
GAGCTCGTTCCCGAGTTTGATGACTATCTTATGCAAGAAGCGGCCCTCATTCAGGACTCGTCAAGGAGCGTCCGCGAGCGCGCCGACCTTCTTGGAG
CCCGTATGTTCCGGTCGCTGGAAGAGCGGTACTCCTCTTGACCTTGCTCCAGAGAAAGACGACCCATCCATCGGCCCAAATCTTATGTTGAACAATAA
CTTCGACTTCAACCACCCAGCGCCATTCAACATCAATACCAACCAATCTACTGTCCATTCTCGGCCACATCCGCAAGATTGCGCCCTCGTGCTGAT
CAAGGAAATCAGAATCTCAAGAACCAATGATCAGGGCCAGTATACCTTATGGCGAAGAACTCAGCGACGACGAGATAAAACAAGAAGACAGGGA
CTGAACGTGGTGTGCGCATTTGTGACCTATCAAAGTGATCTCGGTTCCAGGATTCACTTCCAGCAGGCTGAATGGGCCAACACGTC AACATCCCCAC
TGGAAAAGCGATCCAACACCTGGATTTGACCCGATTGTCGGCCAGAACAGCGGTAACCGCTTGTGTCTCTGGGATTGATTACAGATCTTAAC
CACGACTTGACCTTCATGAGTTTCGTTGTTTCAAAGGGAGGGGACTACTTCTTCAGCCCCTCCATGTCCGCATCTTGACAAAAATCGTGCTTAA

```

```

MRWWTTCVALTSLIPYALLPSYGFNLPQQLEARQNDYPSGSLLDHYPGQHTLPTLELIQKLNATNGTFLPLEE
IQGDIMIGMRKPKEIFFFYSLQNP RKFKSVLAKLIYPHITTTAQMVCTTCAQPSAMLNVAWTSQGLRKLGVLD
NLGDPYFAMGQLSDAAALGDTDPSTTWPAGLYANKTDGAFLIAAKDWEPI DTLNQMKAWLGD AIVETHSNRG
AVRPGDAAGKEHFGWLDGFIQPAVAGFATSTYPGQQLLLPGTLLTKEIGDPRRAARPAWTKWGSF MAYRQLQE
LVPEFDDYLMQEALI QDSSRSVRERADLLGARMFGRWKSGTPLDLAPEKDDPSIGPNLMLNNNFDFNH PAPF
NINTNQSYCPFSAHIRKIRPRADQGNQNLKNQ MIRASIPYGEELSDDEINN KKTGTERGVAFVTYQSDLGSGF
HFQQA EWANNVNIPTGKSDPTPGFDPIVQNSGKPLVVSGIDYTDLNDLTFMSFVVSKGGDYFFSPSMSAIL
HKIAA*

```

Abbildung 60: oben: Nukleotidsequenz der klonierten Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus* (1551 bp); unten: übersetzte Aminosäuresequenz der Dyp-Typ Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* (516 AA).

Über den Onlineservice von SWISS-MODEL wurde die hypothetische Tertiärstruktur der Dyp-Typ Peroxidase aus PSA (Klon 10) in Homologie zur kristallisierten Struktur der Dyp-Typ Peroxidase (DyP; *Thanatephorus cucumeris*; PDB-file: 2D3Q chain A,B) berechnet (Abbildung 61). Anschließend wurde über den Onlineservice von EMBL mit dem erstellten PDB file ein VAST Search durchgeführt. Die 3D Struktur wurde mit Cn3D analysiert.

Bei weiteren Datenbankrecherchen wurden Homologien der klonierten Sequenz zu für Dyp-Typ Peroxidasen codierende Aminosäuresequenzen aus *P. ostreatus*, *B. adusta* (*T. cucumeris*) und *M. scorodoni* festgestellt. Die codierenden Sequenzen aus *P. sapidus* und *P. ostreatus* weisen eine Übereinstimmung von 95% (NCBI) auf (Abbildung 62). Die Sequenzen für Dyp-Typ Peroxidasen aus *P. sapidus* und *M. scorodoni* wiesen ebenso wie die Sequenzen aus *P. sapidus* und *B. adusta* (*T. cucumeris*) eine Übereinstimmung von ~ 43% (NCBI) auf.

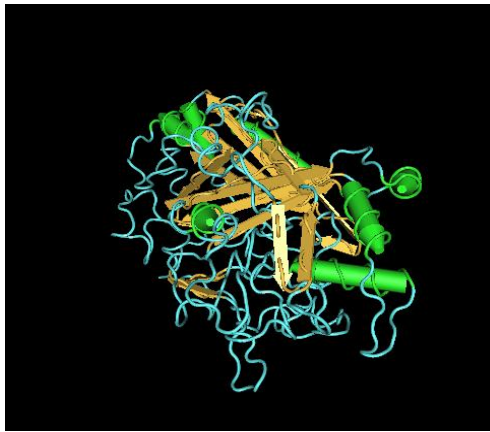


Abbildung 61: 3D-Proteinstrukturmodell der Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus* - basierend auf der Struktur der Dyp-Typ Peroxidase (DyP; *B. adusta* (*T. cucumeris*); PDB-file: 2D3Q chain A,B) modelliert mit SWISS-MODEL.

```

Dyp-Typ_K10      MRWWTTCVALTSLIPYALLPSYGFNLPPQQLLEARQNDYPSGSLH-----DYPGQHT 51
DyP-Typ_POS     MRWWTTCVALTSLIPYTLPSYGFSLPQQLLEARQNDYPSGSLHDCVLTRLFVDYPGQHT 60
DyP_TCU         MRLSLFVVSVAVLVG---SSSHVNAAKLGARQTRTT-----PLLT-----NFPGQAP 44
msp1            MKLFSASVFAAIIASHYASATAHIRAPNVKPRRTN----SLLT-----APFQQP 46
*: * : : * . . ** * * .

Dyp-Typ_K10      TWAPGLYANKTDGAFLIAAKDWEPIIDTLNQMKAWLGDIVETHSNRGAVRPGDAAGKE 231
DyP-Typ_POS     TWAPGLYANKTDGAFLIAARDWEPIIDTLNQMKNWLGDAIVETHSNRGAVRPGDAAGKE 240
DyP_TCU         QWVAPFTGTTIHGVFLIGSDQDDFLDQFTDDISSTFGSSITQVQALSGSARFGDQAG 222
msp1            NWVPGFVGTSVHGVFLLASDTIDNVNTELANIQITILNGSITBIHRLQGEAREIDQGG 223
* . . : . . . * . : * . : : : : : : : : : : : : : * . * * * * * * * :

Dyp-Typ_K10      FGWLDGFIQPAVAGFAT--STYPGQQLLLPGTLLTKEIGDPRRAARPAWTKWGSFMAYRQ 289
DyP-Typ_POS     FGWLDGFIQPAVAGFAT--STYPGQQLLLPGTLLTKEIGDPRRAARPAWTKWGSFMAYRQ 298
DyP_TCU         FGFLDGISQPSVTGWET--TVFPGQAVVPPGIILLGRDGDGTG--TRPSWALDGSFMAFRH 278
msp1            FGFMDGISNPAVDGFTFPAEIRPGQALIPP GIMLLGEANDTFQNDREPPWAKDGSFLVFRQ 283
* * : * * : : * * * * : : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * :

Dyp-Typ_K10      LQELVPEFDDYLMQEAALIQDS-SRSVRERADLLGARMFGRWKSGLPLDLAPEKIDPSIG 348
DyP-Typ_POS     LQELVPEFDDYLMQEAALIQDS-SRSVRERADLLGARMFGRWKSGLPLDLAPEKIDPSIG 357
DyP_TCU         FQQKVPEFNAYTLANAIPANSAGNLTQQEGAEFLGARMFGRWKSGLPIDLAFTADFPALG 338
msp1            MQQRAPEFNKFLQDHALNMP---NMTSEGGADLLGARIVGRWKSADPIDLPLVDFVLA 340
* : . * * * : : * * . . : : * : * * * * : * * * * * : * * * * :

Dyp-Typ_K10      PNLMMLNNFDFNHPAPFNINTNQSYPFSAIRKIRPRADQGNQ--LKNQMIRASIPYG 406
DyP-Typ_POS     PNLMMLNNFDFNHPAPFDINSNQSYPFSAIRKIRPRADQGNQ--LKNQMIRASIPYG 415
DyP_TCU         ADPQRNNNFDYSDT----LTDETRCPFGAIVRKTNPRQDLGGP--VDTFAMRBSIPYG 391
msp1            ADNQRNNNFDYSDT----ATNQRCPFSAIRKANPRGDLGGINKFPNQIIRAGIPYG 394
. : * * * * : . . : : : * * * * : * * * * * * * . : * * : * * * *

Dyp-Typ_K10      EELSDDEINRKKTGTE---RGVAVFTYQSDLGSGFHFQQAEWANNVNIPTGKSDPTPGF 462
DyP-Typ_POS     EELSDDEINRKKTATE---RGVAVFTYQSDLGSGFHFQQAEWANNVNIPTGKSDPTPGF 471
DyP_TCU         PETSDAELASGVTAQD---RGLLFVEYQSIIGNGFREQQINWANNANFPFSKP-ITPGI 446
msp1            PEVTDAEKASNSSTDPFLERGLAFVAYQSNIQNGFVFLQKNWVDNTN--FFRP-GT-GV 450
* * * . . : : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * . * * .

Dyp-Typ_K10      PIVGQN-----SGKPLVVSVIDYTDLNHDLTFMS-FVVSCKGGDYFFSFSMSAILHK 513
DyP-Typ_POS     PIVGQN-----NGKPLVVSVIDYTDLNHDLTFMS-FVVSCKGGDYFFSFSMSAILHK 522
DyP_TCU         EPIIG-----QTTPRVGGLDPLNQNETFTVPL-FVIPKGGDYFFLFSISALTAT 495
msp1            PLIGTNSRNSGTDAPNTPRVVSGLDPNATSTIEIGIDFVVSRGGEYFFSFSLSAIRTV 510
* : * * . * . * * * : . : . * * : * * * * * * * * :

```

Abbildung 62: Vergleich der ermittelten Aminosäuresequenz aus *P. sapidus* mit den Aminosäuresequenzen einer Dyp-Typ Peroxidase aus *P. ostreatus*, *B. adusta* (*T. cucumeris*) und *M. scorodonius*.

Heterologe Expression

Die codierende Sequenz der Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus* wurde zur heterologen Expression in *Trichoderma reesei* an die Firma AB Enzymes weitergeleitet (2.8.1)?.

2.6.4 Auswahl weiterer Enzyme aus *P. sapidus*

Anhand der Resultate aus den Sekretomanalysen (2.2.1) und der vorhandenen Peptidsequenzen wurde eine Esterase als weiteres Schlüsselenzym des enzymatischen Aufschlusses von Rapsstroh ausgewählt. Die ermittelte cDNA- bzw. die daraus übersetzte Aminosäuresequenz (Abbildung 63) wurde an den Projektpartner Artes Biotechnology übermittelt.

```
MVLLRAVAAAALALLPFIAAQAPQVQVGNATAIIGRSIPEFSKEFFGGIIPFAEPPVQQLRLNNPVLKTRLDTPTFDAGNYGPAQLQPD
PSVPVISEDCLRINVLRTAGVPAGVLLPVMWVYGGGDFDGDSSIYNASAIVAQSALRGTPVVFVSLNYRLGPLGFPKGQEAHRG
ALNLGLKDQLAALEWVQANIGFFGGDKSKVTVFQGSAGSICLSIHFLNSPIQSLARAAIFESGFPATSONFPAAHREKSWTNFVKD
IPQCASTAGSKDTFSCLRSDTIDQATLLQAGALADDQSGELFAWDPTIDGPGGILPDI PSKLLAKGKFVRLPFIAGTVLDEATTF
PKTVTTEQIRQSLIANFTSPFPGPTVLAKDVETILKLYPDI PALGSPFGTGNETFGLSSQYKRTAAIFGDLSFQSQRRSWIQTLS
KAGVKTFGYLF TDPQSSNPANGVSHASEIPYVYGAPGIFGGT VTPEAIALSRIMVDYVVSFATSLDPNDGKGFPRPVWTQYTPSNQ
AIMLLNSTGTSMIPDDYRKKQIDFINSNPAVWHHRRSF
```

Abbildung 63: AS-Sequenz einer sekretierten Esterase aus *P. sapidus*; massenspektrometrisch generierte Peptidsequenzen unterstrichen

Aus den Resultaten des Vorprojekts (AZ 13199) wurden zwei weitere für den Lignocelluloseaufschluss relevante Enzyme ausgewählt. Die Sequenzen einer Peroxidase vom Dyp-Typ und einer polyvalenten Peroxidase (Abbildung 64) wurden an den Projektpartner Artes Biotechnology übermittelt und für die heterologe Expression in *H. polymorpha* vorbereitet.

Dyp type peroxidase:

ACCESSION CAK55151
AUTHORS Giardina, P., Faraco, V., Palmieri, G., Piscitelli, A. and Sannia, G.

```
1 mrwwttcval tslipytlip sygfslpqq l earqndypsg silhdcvltr l pvdypgqht
61 lptleliqkl natngtflpl eeiqgdimg mrkpkiefff ysiqnprkfk svlakliyph
121 ittaqmvct tctqpsamln vawtsqglrk lgvlddlgdp yfamgqlnda aalgtdpst
181 twapglyank tdgafliaar dwepidtlln qmknwlgdai vethsnrgav rpgdaagkeh
241 fgwldgfiqp avagfatsty pggqlllpgt lltkeigdpr raarpawtkw gsfmayrqlq
301 elvpefddy l mgeaaliqds srsvreradl lgarmfgrwk sgtpldlape rddpsigpnl
361 mlnnmfdfnh papfdinsnq sycpfsahir kirpradqgn tnlknqmira sipyeelsd
421 deinskkat ergvafvtyq sdlgsghfq qawannvni ptgksdptpg fdpivgqng
481 kplvvsgidy tdlnhdltfm sfvsvskggy ffpsmsail hkiaa
```

Versatile Peroxidase:

ACCESSION CAJ01576
AUTHORS Bouws, H., Zorn, H. and Berger, R.G.

```
1 msfktlsalv lalgaavqft saavprvqkr atcadgrtta naaccvlfpi lddiqenlfd
61 ggcqgeevhe slrltfhdai gfsptlggg adgsiitfdt ietvfanag ideivsaqkp
121 fvakhnisag dfiqfagavg vsncpggvri pfflgrpdav aaspdhlvpe pfdsvdtila
181 rmgdagfsav evvllashes iaaadlvds ipgtpdfstp gvfdsqffie tqkgrlfpq
241 tpdnkgevqs plqgeirlqs dhllardpqt acewqsmvnn qpkignrfaa tmskmaligq
301 dskklidcsd viptppalvg aahlpagfsl sdveqacaet pfpaltadpg pvtsvppvpg
361 s
```

Abbildung 64: AS-Sequenzen zweier Peroxidasen aus *Pleurotus* sp.

2.7 Heterologe Expression in *H. polymorpha*

2.7.1 Identifikation Peroxidase-positiver rekombinanter *H. polymorpha*-Stämme durch Aktivitätsmessungen in Kulturüberständen

Für die unter 6.10.3 aufgeführten Zielpasmide wurden je 30 rekombinante *H. polymorpha* RB11-Stämme generiert. Als Negativkontrollstamm diente pFPMT121/RB11, bei dem der Vektor pFPMT121 (ohne Insert) genomisch integriert wurde. Aliquots der resultierenden Kulturüberstände wurden mittels des in 6.4.1 beschriebenen Peroxidaseaktivitätsassays analysiert. Die Signalstärken waren im Vergleich zu einer als Positivkontrolle eingesetzten Peroxidase schwach. Während das Positivkontrollmaterial bereits nach wenigen Minuten zu einer intensiven Grünfärbung führte, benötigten die *H. polymorpha*-Kulturüberstände ca. eine Stunde, um eine sichtbare Farbreaktion zu generieren. Die Messung der Extinktion bei 420 nm wurde nach einer Reaktionszeit von 2 h durchgeführt. Als positiv wurden Stämme mit $E > 0,2$ gewertet (Tabelle 12), dies entsprach einer katalytischen Aktivität von $0,006 \text{ U L}^{-1}$ für die polyvalente Peroxidase.

Tabelle 12: Zusammenfassung Peroxidaseaktivitäten von Kulturüberständen rekombinanter *H. polymorpha* RB11-Stämme nach MeOH-Induktion in verschiedenen Medien. Als positiv wurden Signalstärken von $E > 0,2$ gewertet.

Stammserie	Fusionsprotein	Medium	Positive
pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11	MF α E-VP(331)-H6	YNB ungepuffert	3
		YNB pH6	0
		YP	0
pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11	MF α E-VP(339)-H6	YNB ungepuffert	4
		YNB pH6	0
		YP	0
pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11	MF α E-DTP(454)-H6	YNB ungepuffert	2
		YNB pH6	0
		YP	0
pFPMT-DTP(525)-H6 # 17/RB11	DTP(525)-H6	YNB ungepuffert	0
		YNB pH6	0
		YP	0

Für die Serie pFPMT-DTP(525)-H6 # 17/RB11 wurden keine Peroxidase-positiven Kulturüberstände detektiert. Für die drei anderen Stammserien zeigten sich in geringer Frequenz positive Stämme (Tabelle 12).

Auffallend war, dass positive Signale nur nach Derepression/MeOH-Induktion in ungepuffertem YNB erzielt wurden. Eine Kultivierung derselben Stämmen in YNB pH 6 oder YP führten nicht zu Peroxidase-Aktivität im Kulturüberstand (Tabelle 12).

2.7.2 SDS-PAGE/Western Blot-Analysen von Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen rekombinanter *H. polymorpha*-Stämme

Nachdem mittels Peroxidase-Assay von drei der vier Serien Stämme mit Peroxidaseaktivität identifiziert wurden, wurden im nächsten Schritt Gesamtzellextrakte und Kulturüberstände mittels SDS-PAGE/Western Blot hinsichtlich der Produktausbeute analysiert. Zu diesem Zweck wurden nicht nur die im Assay positiven, sondern auch einige negative Stämme mit Extinktionen von knapp unterhalb von 0,2 ausgewählt. Da alle Fusionsproteine über einen C-terminalen His Tag verfügen, wurde ein His Tag-spezifischer Primärantikörper zur Detektion spezifischer Banden eingesetzt (Abbildung 65). Alle getesteten Peroxidase-Stämme zeigten intrazelluläre Produktbanden. Die erwarteten Molekulargewichte für korrekt prozessiertes VP(331)-H6 und VP(339)-H6 liegen bei 35,4 und 36,4 kDa. Die beobachteten Banden (Spuren 2 - 13) zeigen apparente Molekulargewichte in der Größenordnung 60 kDa. Die große Abweichung lässt vermuten, dass es sich bei den beobachteten Molekülspezies um N-glykosylierte Proformen handelt. Für DTP(454)-H6 beträgt das kalkulierte MW der korrekt prozessierten Form 51 kDa. Hier zeigten die Gesamtzellextrakte eine dominante Bande bei 75 kDa (Spuren 14 - 17). Auch hier liegen vermutlich N-glykosylierte Proformen vor. Bei der Analyse der zugehörigen Kulturüberstände (Abbildung 66) zeigten die pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 und pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11-Stammserien Banden auf der Höhe der kalkulierten MWs der reifen Formen (Spuren 1 - 13), während für die pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11-Stämme kein Produkt nachgewiesen werden konnte (Spuren 14 - 16).

Interessanterweise zeigten sich mit den pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 und pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11-Stammserien auch mit dem Material von Peroxidase-Assay-negativen Stämmen spezifische Peroxidase-Banden im Western Blot (siehe Abbildung 65, Spuren 2, 11, 13, sowie Abbildung 66, Spuren 1, 4, 11, 13). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die willkürlich definierte Grenze von 0,2 Extinktionseinheiten als positives Signal zu hoch angesetzt war. Bei der pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11-

Serie besteht eine gute Korrelation zwischen den positiven Signalen im Assay und den Bandenstärken vom Gesamtzellextrakt (Abbildung 65, Spuren 14 - 16). Allerdings wurden in den Kulturüberständen dieser Stämme keine His Tag-spezifischen Signale detektiert (Abbildung 66, Spuren 14 -16), obwohl das in Spuren 14 und 16 gezeigte Material Peroxidase-Aktivität zeigte. Dies könnte bedeuten, dass die Menge an sezerniertem Produkt unter der Nachweisgrenze des Western Blots liegt. Denkbar wäre aber auch, dass der C-Terminus mit dem His Tag proteolytisch abgespalten wurde, ohne dass die Enzymaktivität zerstört wurde.

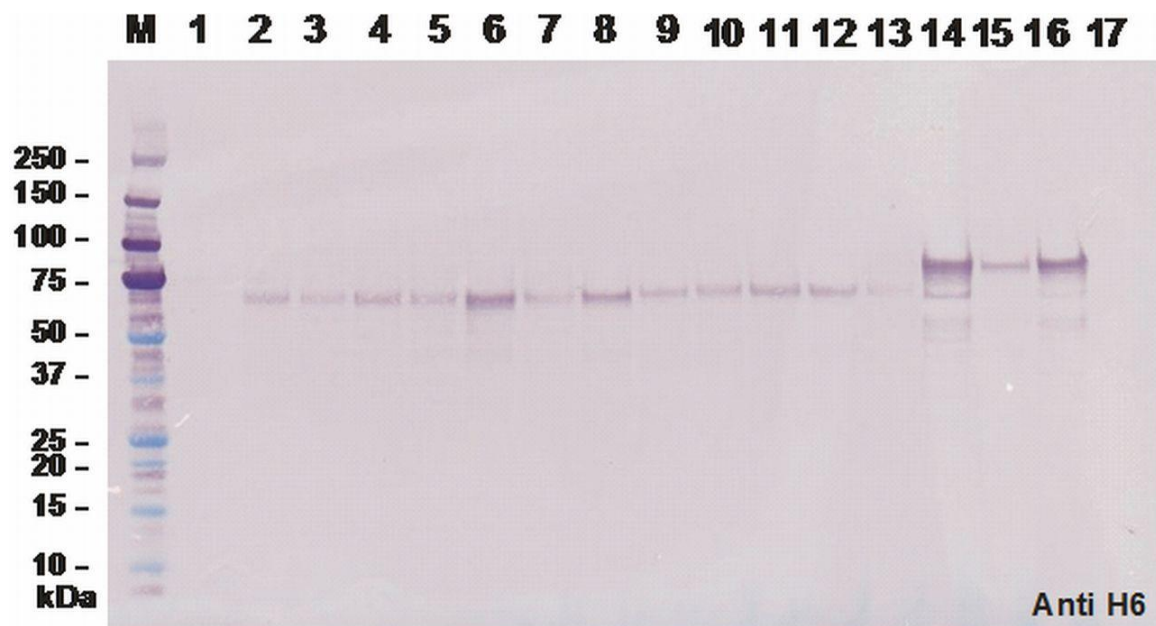


Abbildung 65: Analyse von Gesamtzellextrakten ausgewählter Peroxidase-Assay-positiver oder negativer Stämme mittels SDS-PAGE/Western Blot. Im Beladungsschema ist jeweils angegeben, ob der dem Material zugrunde liegende Stamm im Peroxidase-Assay positiv oder negativ erschien. Beladungsschema:

M	Precision Plus Protein Standards		10 μ l
1	Peroxidase-Standard ohne His Tag (von H. Zorn)		19 μ l
2	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 3	Peroxidase-Assay: Negativ	19 μ l
3	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 10	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
4	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 22	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
5	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 25	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
6	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 27	Peroxidase-Assay: (Positiv)	19 μ l
7	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 28	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
8	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 3	Peroxidase-Assay: (Positiv)	19 μ l
9	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 4	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
10	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 7	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
11	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 13	Peroxidase-Assay: Negativ	19 μ l
12	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 16	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
13	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 23	Peroxidase-Assay: Negativ	19 μ l
14	pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11 # 9	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
15	pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11 # 18	Peroxidase-Assay: Negativ	19 μ l
6	pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11 # 22	Peroxidase-Assay: Positiv	19 μ l
17	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	19 μ l.

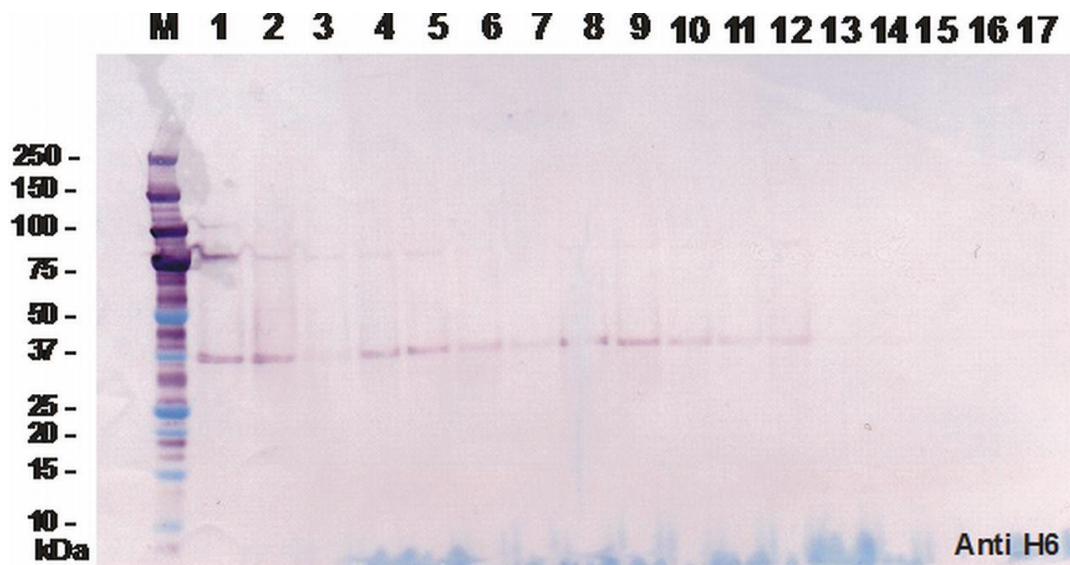


Abbildung 66: Analyse von Kulturüberständen ausgewählter Peroxidase-Assay-positiver oder negativer Stämme mittels SDS-PAGE/Western Blot. Die Kulturüberstände wurden vor der Analyse mit PNGaseF behandelt. Anstelle des in Abb. 1 gezeigten Positivkontrollmaterials (Spur 1) wurde der Kulturüberstand eines weiteren Peroxidase-Assay-negativen pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11-Stamms (Abbildung 65, Spur 4) analysiert. Beladungsschema:

M	Precision Plus Protein Standards		10 μ l
1	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 3	Peroxidase-Assay: Negativ	22,5 μ l
2	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 10	Peroxidase-Assay: Positiv	22,5 μ l
3	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 22	Peroxidase-Assay: Positiv	22,5 μ l
4	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 24	Peroxidase-Assay: Negativ	22,5 μ l
5	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 25	Peroxidase-Assay: Positiv	22,5 μ l
6	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 27	Peroxidase-Assay: (Positiv)	22,5 μ l
7	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8/RB11 # 28	Peroxidase-Assay: Positiv	22,5 μ l
8	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 3	Peroxidase-Assay: (Positiv)	22,5 μ l
9	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 4	Peroxidase-Assay: Positiv	22,5 μ l
10	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 7	Peroxidase-Assay: Positiv	22,5 μ l
11	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 13	Peroxidase-Assay: Negativ	22,5 μ l
12	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 16	Peroxidase-Assay: Positiv	22,5 μ l
13	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1/RB11 # 23	Peroxidase-Assay: Negativ	22,5 μ l
14	pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11 # 9	Peroxidase-Assay: Positiv	22,5 μ l
15	pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11 # 18	Peroxidase-Assay: Negativ	11,3 μ l
16	pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13/RB11 # 22	Peroxidase-Assay: Positiv	11,3 μ l
17	pFPMT121/RB11	Negativkontrollstamm	19 μ l.

2.7.3 Identifikation Esterase-positiver rekombinanter *H. polymorpha* Stämme mittels elektrophoretischer Methoden

Expressionsstudien zur heterologen Expression einer Esterase aus *P. sapidus* (EPS1, 2.6.4) in *H. polymorpha* wurden durchgeführt. Es wurden rekombinante Stämme generiert, bei denen die Gene für sekretorische und intrazelluläre Varianten (6.10.3 - 6.10.7) dieser Esterase genomisch integriert wurden.

Für die sekretorischen Varianten MF α E-EPS-H6, OCH1-(1-81)-EPS-H6 und OCH1-EPS-H6 wurden keine Produkt-spezifischen Signale identifiziert.

Zur Identifikation sekretorischer Varianten mit Phytase-Tag wurden die Phytase-Aktivitäten in den Kulturüberständen vermessen. Die höchsten Phytase-Aktivitäten zeigten sich in YP/2% Glycerin, etwas geringere Aktivitäten in YNB/2% Glycerin/1% Peptone/0,1M MES pH 6,1 und deutlich geringere bis gar keine Aktivitäten in den weiteren Medien.

Bei dem Phytase-EPS-H6-Fusionsprotein befindet sich zwischen der Phytase und der Esterase ein dibasisches Motiv (6.10.3, Abbildung 106D), welches die Schnittstelle für die im trans-Golgi Membran-gebunden vorkommende Kex2-Protease ist. Während des Vorgangs der Sekretion kommen Kex2p und das Fusionsprotein in unmittelbaren Kontakt, wobei eine Abspaltung der Esterase von der Phytase erfolgen soll. Die oben beschriebenen Kulturüberstände der Phytase-positiven Transformanten-Pools sollten entweder das ungespaltene Fusionsprotein oder freie Phytase und Esterase enthalten. Um dies zu untersuchen, wurden ausgewählte Kulturüberstände mittels SDS/PAGE und Western Blot untersucht. Im Western Blot mit myc-Tag-spezifischem Antikörper (Abbildung 67) zeigte sich wie bereits bei den Phytase-Aktivitätsbestimmungen, dass deutlich mehr Phytase in YNB/2% Glycerin/1% Peptone/0,1M MES pH 6,1 als in YP/2% Glycerin gebildet wurde. In den deglycosylierten Proben zeigte sich jeweils eine Bande mit einem apparenten MW von etwa 53 kDa (Abbildung 67B). Dies stimmt gut mit dem berechneten MW der Phytase (52,8 kDa) überein. Die zugehörigen nicht-deglycosylierten Proben zeigen einen Schmier im Größenbereich 70 – 90 kDa, welcher den N-glycosylierten Molekülspecies entspricht (Abbildung 67A). In den stärksten Proben sind die entsprechenden Signale auch in einem mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbten Proteingel erkennbar. In diesem Gel zeigt sich in jeder zweiten Spur eine 30 kDa-Bande, welche der für die Deglycosylierung eingesetzten EndoH entspricht (Abbildung 67A). Das Auftreten von Phytasesignalen impliziert, dass die Abspaltung der Esterase 1 von der Phytase über die Kex2-Protease (Vergleich Abbildung 106D) funktioniert hat, und dass Esterase 1 demnach äquimolar im Kulturüberstand vorliegen sollte. Dennoch konnten im

Western Blot mit einem His-Tag-spezifischen Primärantikörper keine Esterase 1-spezifischen Banden (kalkuliertes MW 58,3 kDa) detektiert werden. Dieser Befund könnte dadurch erklärt werden, dass die Esterase 1 entweder nach der Abspaltung von der Phytase oder bereits vorher durch Proteolyse degradiert wird.

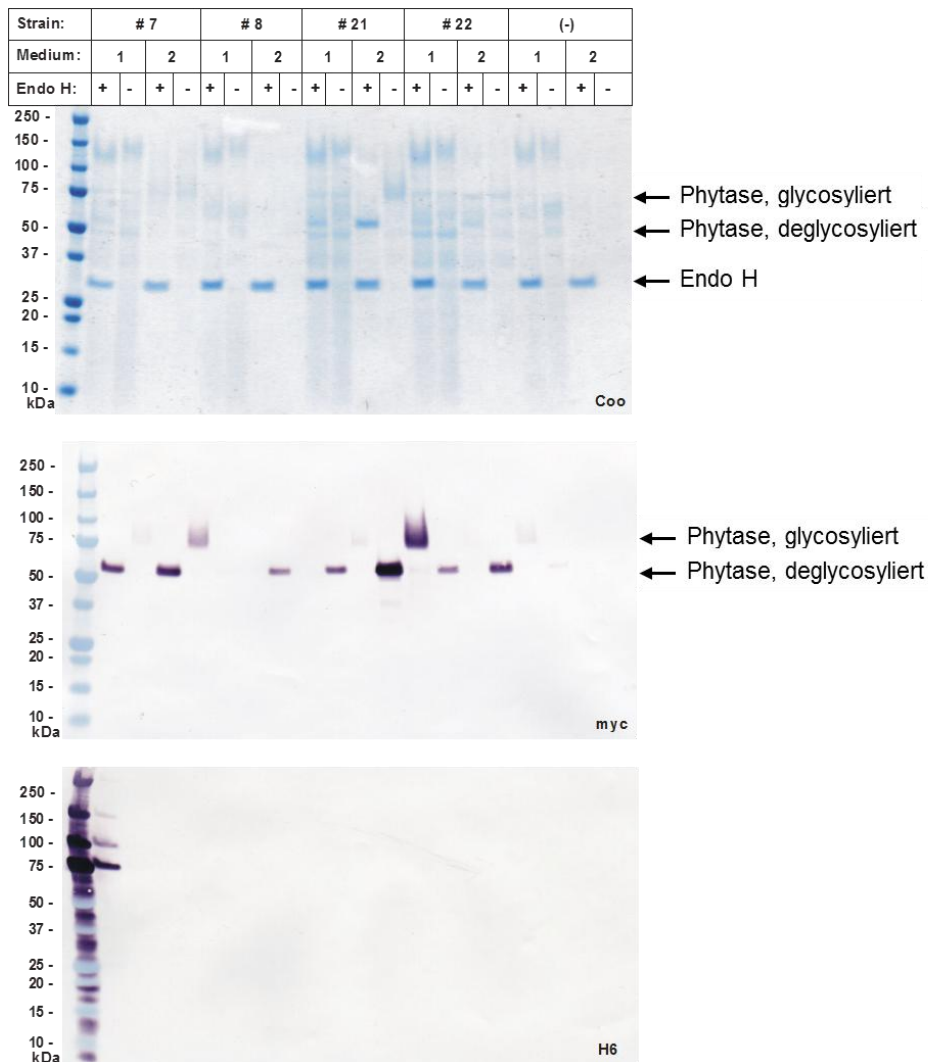


Abbildung 67: SDS-PAGE/Western Blot von Phytase-Assay-positive Phytase-EPS-H6-Stämmen nach Kultivierung in zwei verschiedenen Medien (42 h bei 37°C in Medium 1 oder 2). Eine SDS PAGE wurde mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt (A). Mit den anderen beiden Gelen wurden Semy-dry-Transfers auf NC-Membranen und anschließende Western Blots durchgeführt. In (B) wurde ein myc-Tag-spezifischer monoklonaler Maus-Primärantikörper und in (C) ein His-Tag-spezifischer Kaninchen-Primärantikörper eingesetzt. Die Pfeile zeigen die Positionen von Endo H und glycosilierter bzw deglycosylierter Phytase an. Das berechnete MW der Esterase beträgt 58,3 kDa. Es konnten keine His-Tag-spezifischen Signale detektiert werden (C).

Alternativ zum sekretorischen Weg wurde ein Konstrukt ohne Signalsequenz für die cytosolische Expression generiert (Abbildung 106E). Das entsprechende Expressionsplasmid pFPMT-EST-H6 # 12 (Tabelle 28) wurde in *H. polymorpha* RB11 eingeführt, und die Stammgenerierung erfolgte wie in 6.10.4b beschrieben.

Dabei wurden direkt Einzelstämme erzeugt. Die EPS-H6-Serie lieferte drei Stämme mit deutlicher Esterase-Produktivität, wobei sich im Western Blot jeweils eine dominante Bande von etwa 60 kDa zeigte, was gut mit dem kalkulierten MW von 60,2 kDa übereinstimmt. Das Produkt lag zu 100% in der intrazellulären unlöslichen Fraktion vor (Abbildung 68), wodurch eine Reinigung erschwert wird.

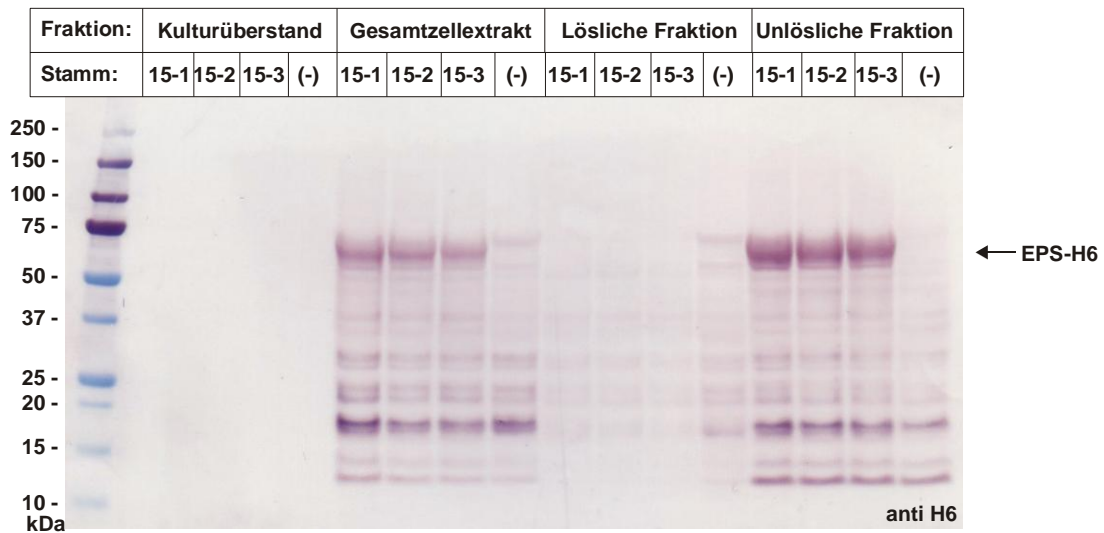


Abbildung 68: SDS-PAGE/Western Blot von Kulturüberstand und intrazellulären Fraktionen von Stämmen der EPS-H6-Serie. Die aufgeführten Stämme wurden für 42 h bei 37°C in YNB/2% Glycerin kultiviert (Derepression) und anschließend nach Zugabe von 1% MeOH für weitere 22 h kultiviert. Es wurden spezifische Banden mittels eines His-Tag-spezifischen Primärantikörpers (rabbit) und eines GAR IgG AP-Sekundärantikörpers in Kombination mit NBT/BCIP als Chromogen visualisiert. Das berechnete Molekulargewicht von EPS-H6 beträgt 60,2kDa. Die Position der Produktbande ist mit einem Pfeil markiert. Als Negativkontrolle (-) wurde Stamm pFPMT121/RB11 eingesetzt, bei dem mehrere Kopien des Expressionsvektors ohne Insert genomisch integriert sind.

2.8 Heterologe Expressionen in *Trichoderma reesei*

Die Peroxidase- und Lipase Gene aus *P. sapidus* wurden unter Anwendung der *T. reesei* Codon Nutzung synthetisiert. Die Expression der Peroxidase und Lipase Gene in *T. reesei* RF6651 erfolgte unter der Kontrolle des *cbhI*-Promotors und *cbhI*-Terminators. Die effiziente Enzymproduktion wurde weiter durch Optimierung der Fermentationsprozesse im 0.5-L Fermenter erzielt.

2.8.1 Heterologe Expression einer Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus*

Das Peroxidase-Gen umfasst 1548 Basenpaare, kodiert für ein Protein mit 516 Aminosäuren mit einem theoretischen Molekulargewicht von 57 kDa und enthält keine erkennbare Signalsequenz. Die Expression des Peroxidase-Gens erfolgte mit den Plasmiden pAB510-DypK10 und pAB600-DypK10Met (Abbildung 69). Das Plasmid pAB510.DypK10 enthielt das Peroxidase Gen unter der Kontrolle des *cbhI*-Promotors und –Terminators (Sekretion vermittelt durch *cbhI* Signalsequenz). In dem Plasmid pAB600-DypK10Met stand das Gen als Fusion hinter der einem *cbhII* Carrier. Eine proteolytische Spaltung durch die KexII Protease führt zur Bildung von aktiver Peroxidase durch Abtrennung des Carrier-Anteils.

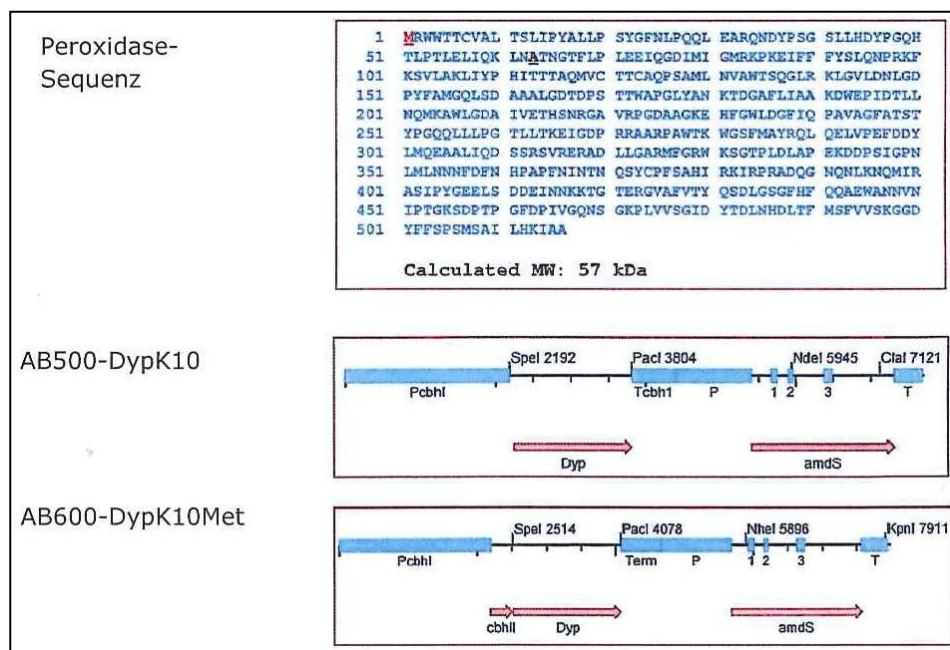


Abbildung 69: Schematische Darstellung der Peroxidase Expressionskassetten. Die Aminosäuresequenz der Peroxidase aus *P. sapidus*: Das Protein hat ein theoretisch berechnetes Molekulargewicht von 57 kDa. Die Expressionskassetten wurden als NotI-Fragmente aus den dazugehörigen Plasmiden isoliert. AB500-DypK10 enthält das Peroxidase-Gen unter der Kontrolle des *cbhI*-Promotors und Terminators. In AB600-DypK10Met steht die Fusion *cbhII*-Carrier-DypK10 unter der Kontrolle des *cbhI*-Promotors und Terminators.

Insgesamt vier Peroxidase-positive Transformanten, zwei von jedem Konstrukt, wurden in 0,5 L Fermentern kultiviert. Die beste Peroxidase Produktion erfolgte bei der fed-batch Fermentation des Stammes RH32908 mit dem Plasmid pAB500-DypK10 nach 160 h mit einer Aktivität von 21.000 U L⁻¹. Der zweite Stamm erreichte eine Aktivität von 18.000 U L⁻¹ nach 136 h. Die Transformanten mit dem zweiten Konstrukt produzierten insgesamt weniger Peroxidase. Die beste Peroxidase Produktion erfolgte bei der batch-Fermentation des Stammes RH32902 mit 6.500 U L⁻¹ nach 91 h in Medium D5. Der Stamm RH32903 erreichte nach 91 h ebenfalls ein Maximum mit 5.900 U L⁻¹.

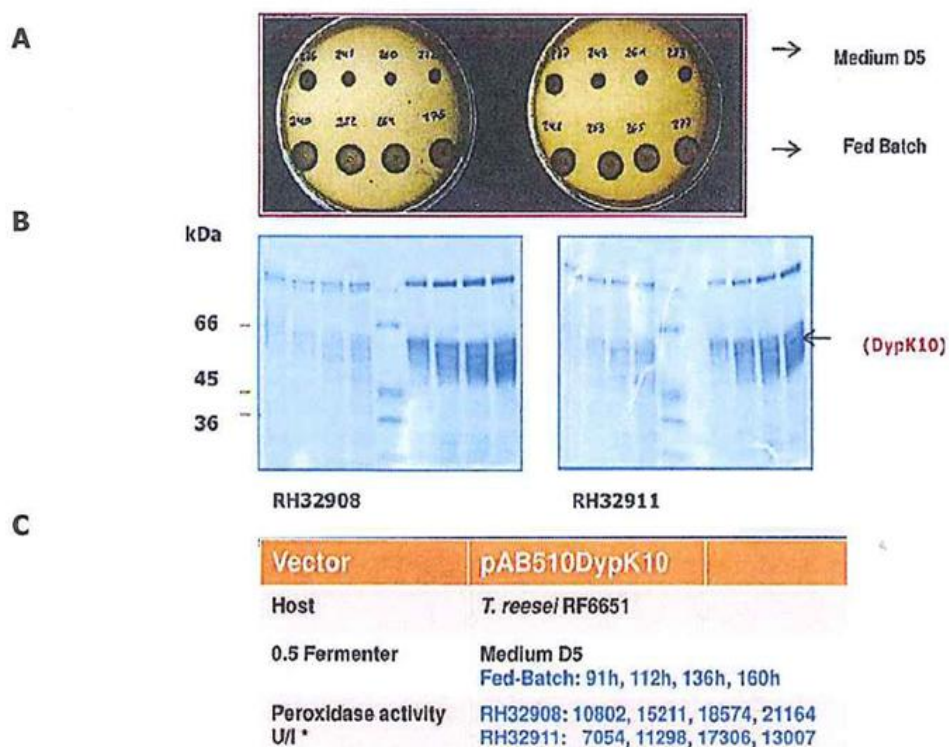


Abbildung 70: Produktion der Peroxidase in *T. reesei* (pAB510). Peroxidase-produzierende Transformanten wurden in 0.5 L Fermenter in batch- und fed-batch Verfahren kultiviert. Die Enzymaktivität wurde nach 91, 112, 136 und 160 h durch Plattentest (A), SDS-Gelelektrophorese (B) und Aktivitätsbestimmung* (C, fed-batch) untersucht; mit grau: RH32908 und grün: RH32911. *: Die Aktivitätsbestimmungen wurden an der Universität Gießen, Institut f. Lebensmittelchemie u. -biotechnologie durchgeführt.

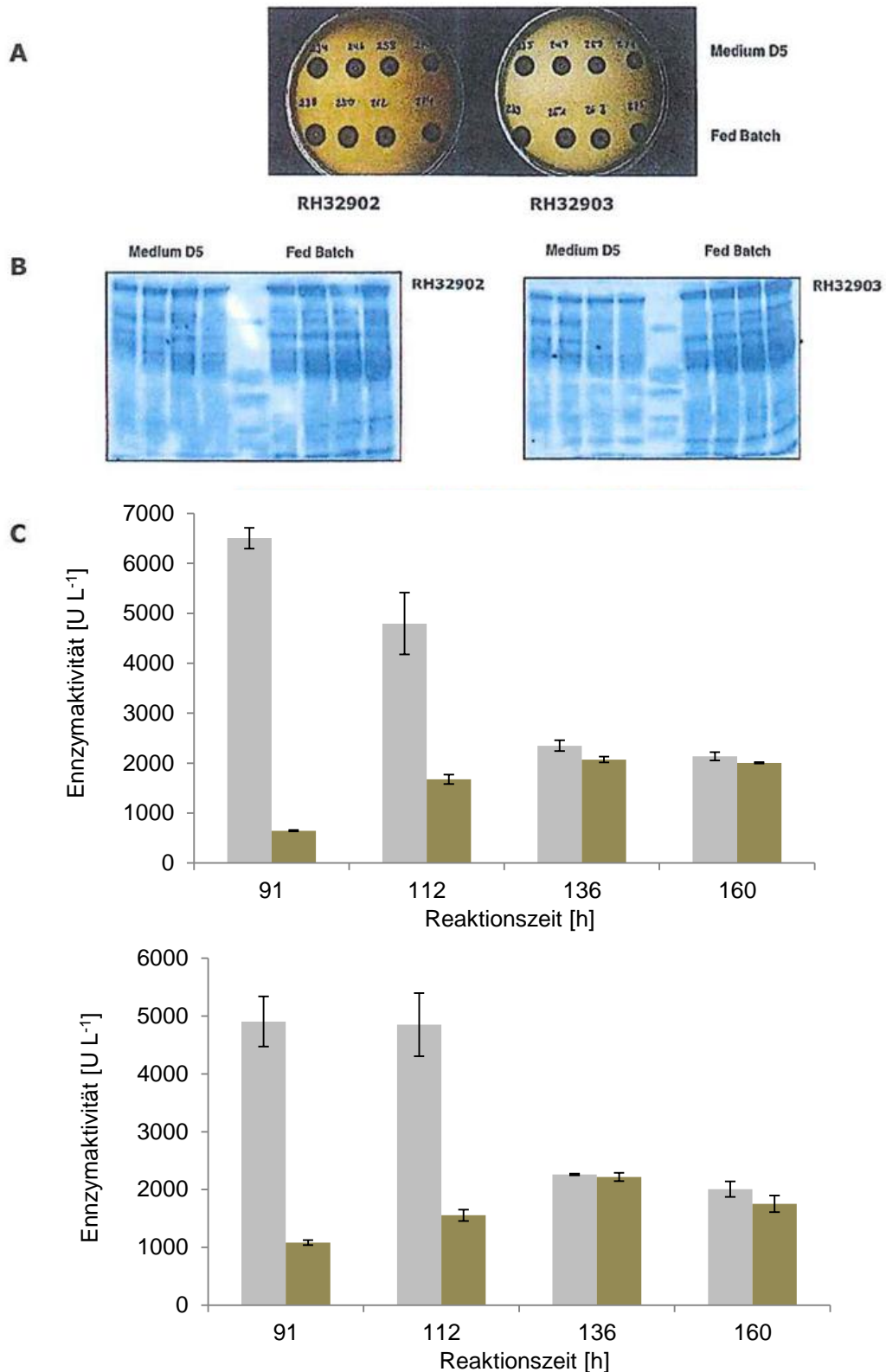


Abbildung 71: Produktion der Peroxidase in *T. reesei* (pAB600). Peroxidase-produzierende Transformanten wurden in 0.5 L Fermenter in batch- und fed-batch Verfahren kultiviert. Die Enzymaktivität wurde nach 91, 112, 136 und 160 h durch Plattentest (A), SDS-Gelelektrophorese (B) und Aktivitätsbestimmung* (C) untersucht; oben: Medium D5, unten: fed-batch Verfahren mit grau: RH32902 und grün: RH32903. *: Die Aktivitätsbestimmungen wurden an der Universität Gießen, Institut f. Lebensmittelchemie u. -biotechnologie durchgeführt.

2.8.2 Heterologe Expression einer GDS(L)-Lipase aus *P. sapidus*

Das Lipase-Gen besteht aus 597 Basenpaaren und codiert für 317 Aminosäuren. Das Lipase-Gen enthält eine N-terminale Signalsequenz von 16 Aminosäuren (PSORT Prediction <http://www.psort.org/>). Für die Expression der Lipase-DNA wurden drei Expressionsvektoren (Abbildung 72) konstruiert:

pAB500-LipPS, das Lipase-Gen mit seiner Signalsequenz steht unter der Kontrolle des *cbhl* (Cellobiohydrolase I)-Promotors und *cbhl*-Terminators von *T. reesei*; pAB510-LipPS: das Lipase-Gen steht unter Kontrolle des gleichen *cbhl*-Promotors und *cbhl*-Terminators; Sekretion wird vermittelt durch *cbhl*-Signalsequenz; pAB600-LipPS, das Lipase-Gen ohne Signalsequenz ist mit einem *cbhII* (Cellobiohydrolase II) Carrier fusioniert. Das Fusions-Konstrukt steht unter der Kontrolle des *cbhl*-Promotors und Terminators. Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins durch die Erkennungsstelle für die KexII Protease (Lys-Arg) innerhalb des Konstrukts führt zur Bildung von aktiver Lipase.

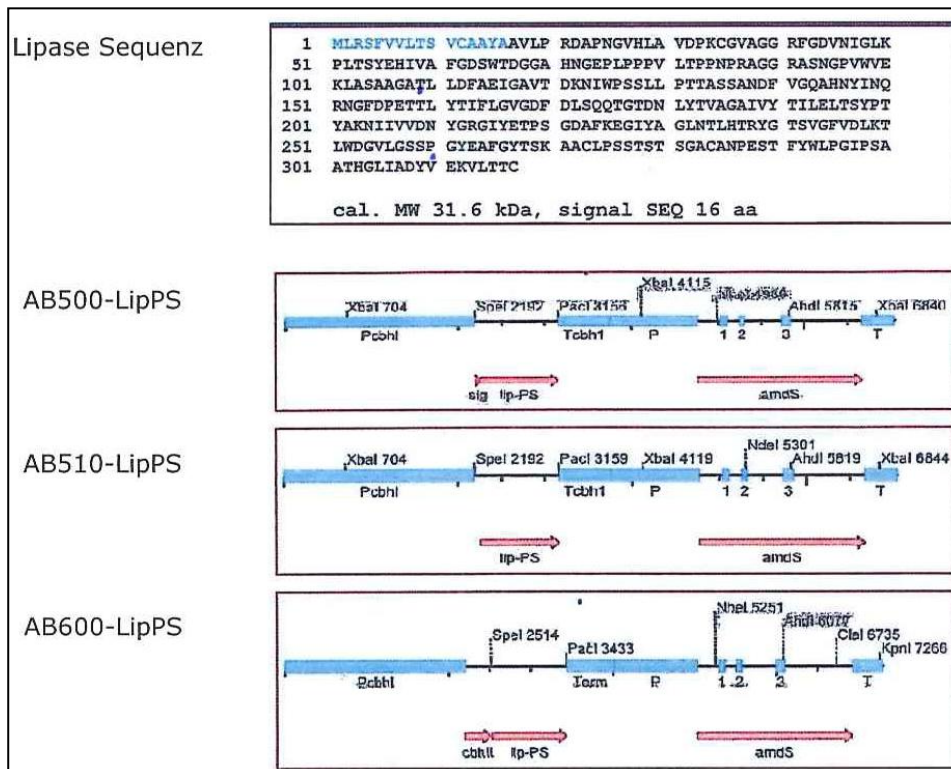


Abbildung 72: Schematische Darstellung der Lipase-Expressionskassetten. Die Aminosäure Sequenz der Lipase aus *P. sapidus*: Die 16 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz ist blau markiert. In allen Konstrukten stand das Lipase-Gen unter der Kontrolle des *cbhl*-Promotors und -Terminators. AB500-LipPS enthält die Lipase Signalsequenz. In AB510-LipPS dient die *cbhl*-Signalsequenz der Sekretion der Lipase. In AB600-LipPS dient die *cbhII*-Signalsequenz der Sekretion eines *cbhII*-KexII-Lipase Fusionsproteins.

Es wurden sechs Lipase-positive Transformanten in 0,5 L Fermentern kultiviert. Das Konstrukt mit der Lipase Signalsequenz erreichte die höchste Aktivität mit 360 U L^{-1} nach 161 h im Medium D5. Der Stamm RH32929 mit dem Konstrukt pAB510 erreichte das Aktivitätsmaximum mit 340 U L^{-1} nach 137 h in Medium D5. Das Aktivitätsmaximum des Stammes RH32924 lag bei 280 U L^{-1} nach 137 h in Medium D5.

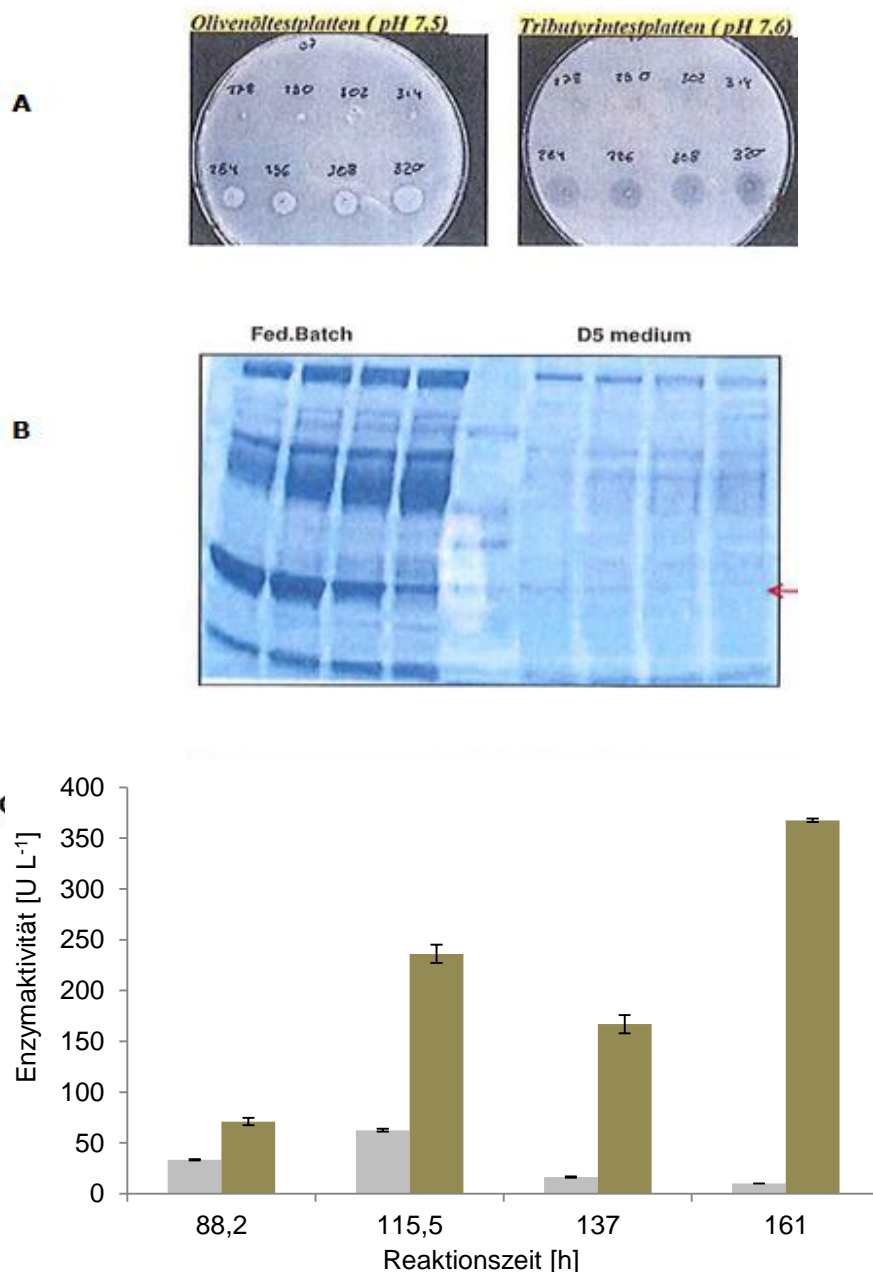


Abbildung 73: Produktion der Lipase in *T. reesei* (pAB500). Lipase-produzierende Transformanten wurden in 0.5 L Fermenter in fed-batch- und batch Verfahren kultiviert. Die Enzymaktivität wurde nach 88,2; 115,5; 137 und 161 h durch Plattentest (A), SDS-Gelelektrophorese (B) und Aktivitätsbestimmung* (C) untersucht; Stamm: RH32919, grau: fed-batch und grün: Medium D5. *: Die Aktivitätsbestimmungen wurden an der Universität Gießen, Institut f. Lebensmittelchemie u. -biotechnologie durchgeführt.

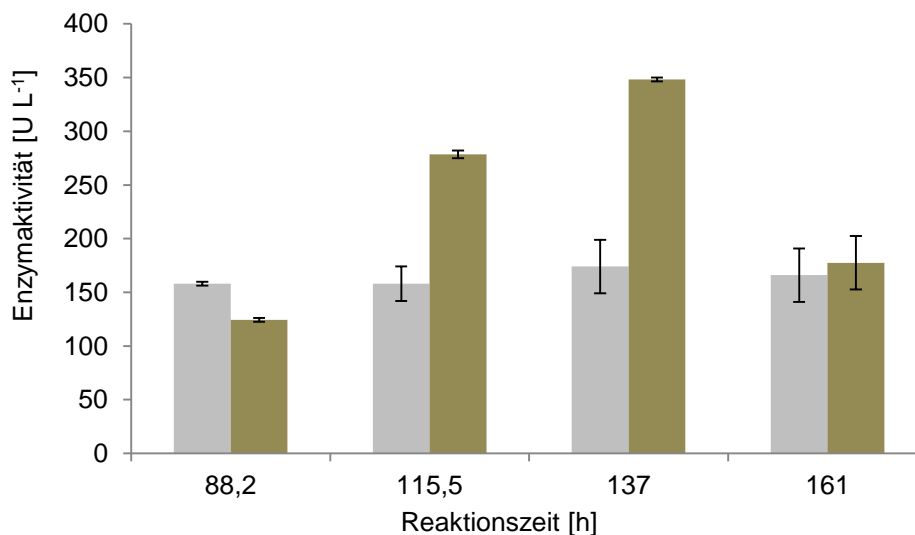
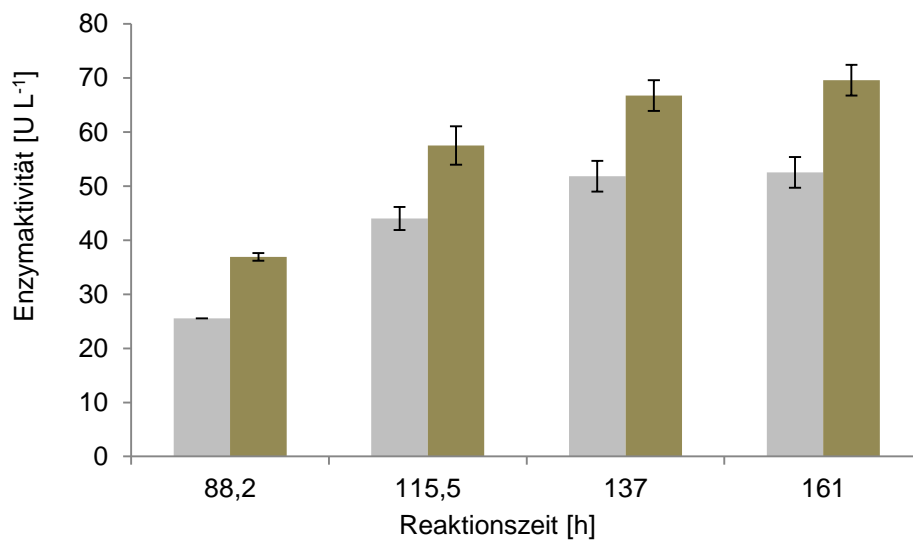
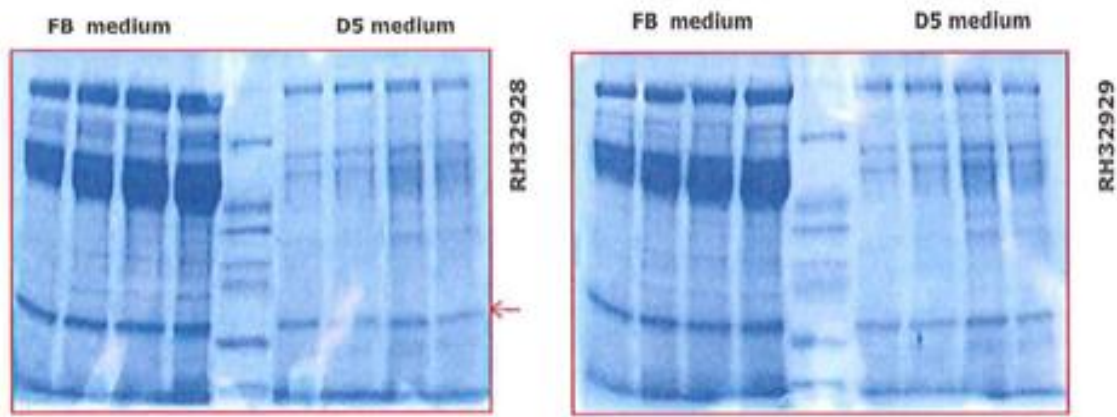


Abbildung 74: Produktion der Lipase in *T. reesei* (pAB510). Lipase-produzierende Transformanten wurden in 0.5 L Fermenter in fed-batch- und batch Verfahren kultiviert. Die Enzymaktivität wurde nach 88,2; 115,5; 137 und 161 h durch SDS-Gelelektrophorese und Aktivitätsbestimmung* untersucht; oben: fed-batch Verfahren, unten: Medium D5 mit grau: RH32928 und grün: RH32929. *: Die Aktivitätsbestimmungen wurden an der Universität Gießen, Institut f. Lebensmittelchemie u. -biotechnologie durchgeführt.

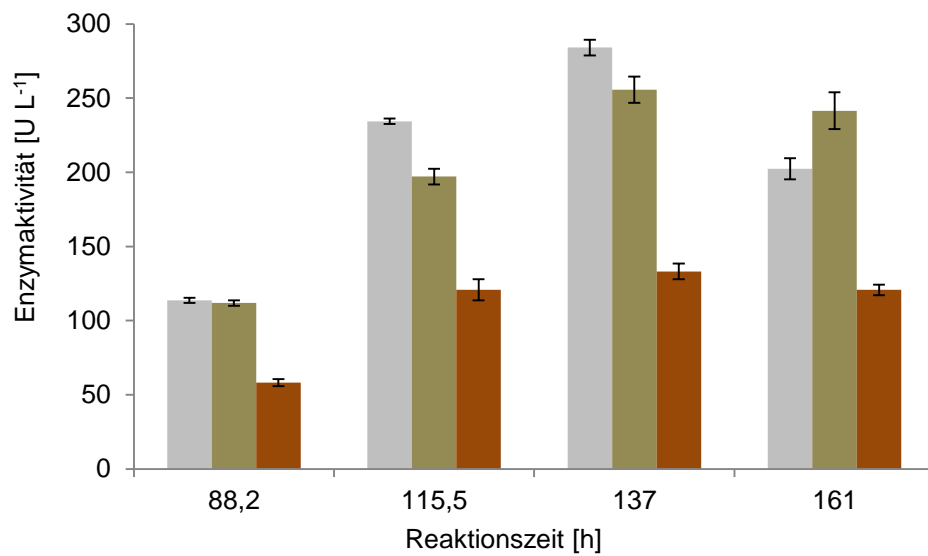
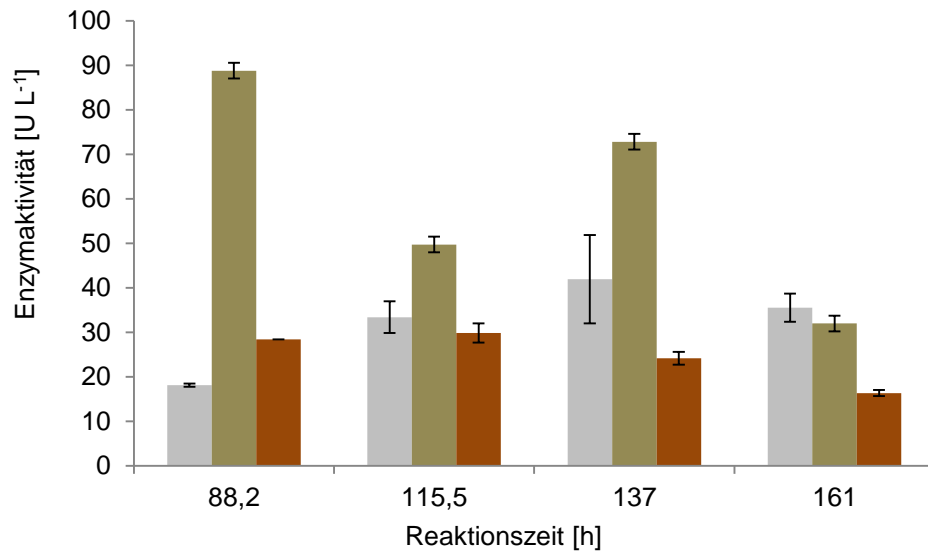
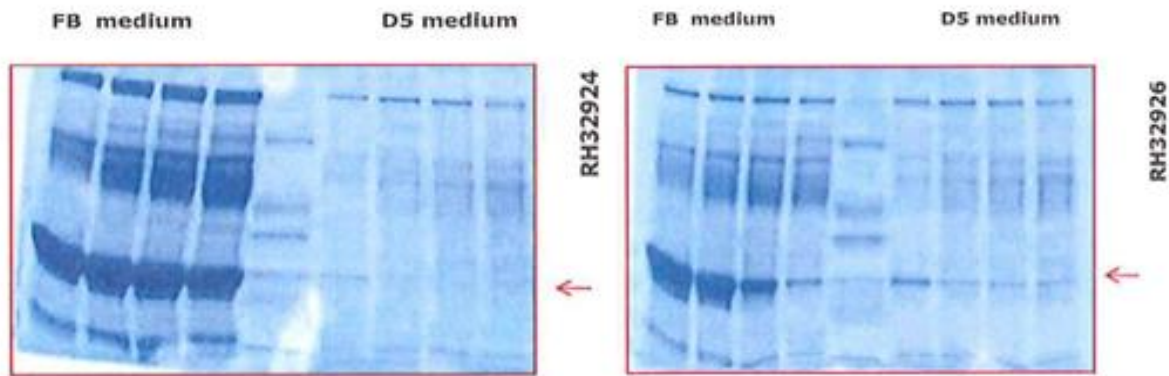


Abbildung 75: Produktion der Lipase in *T. reesei* (pAB510). Lipase-produzierende Transformanten wurden in 0.5 L Fermenter in fed-batch- (oben) und batch (unten) Verfahren kultiviert. Die Enzymaktivität wurde nach 88,2; 115,5; 137 und 161 h durch SDS-Gelelektrophorese und Aktivitätsbestimmung* untersucht; oben: fed-batch Verfahren, unten: Medium D5 mit grau: RH32924, grün: RH32926 und braun: RH32927. *: Die Aktivitätsbestimmungen wurden an der Universität Gießen, Institut f. Lebensmittelchemie u. -biotechnologie durchgeführt.

2.9 Charakterisierung einer heterolog in *T. reesei* exprimierten Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus*

Zur Charakterisierung der Dyp-Typ Peroxidase wurde die Aktivität gegenüber ABTS in Anwesenheit von H₂O₂ (Peroxidase-Assay, 6.4.1) bestimmt. Die Produktbildung wurde photometrisch bei 420 nm detektiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte bei 30 °C über einen Zeitraum von 10 Minuten.

Zur Bestimmung des optimalen Reaktionspuffers für die Dyp-Typ Peroxidase wurde die Aktivität in unterschiedlichen Puffern bestimmt.

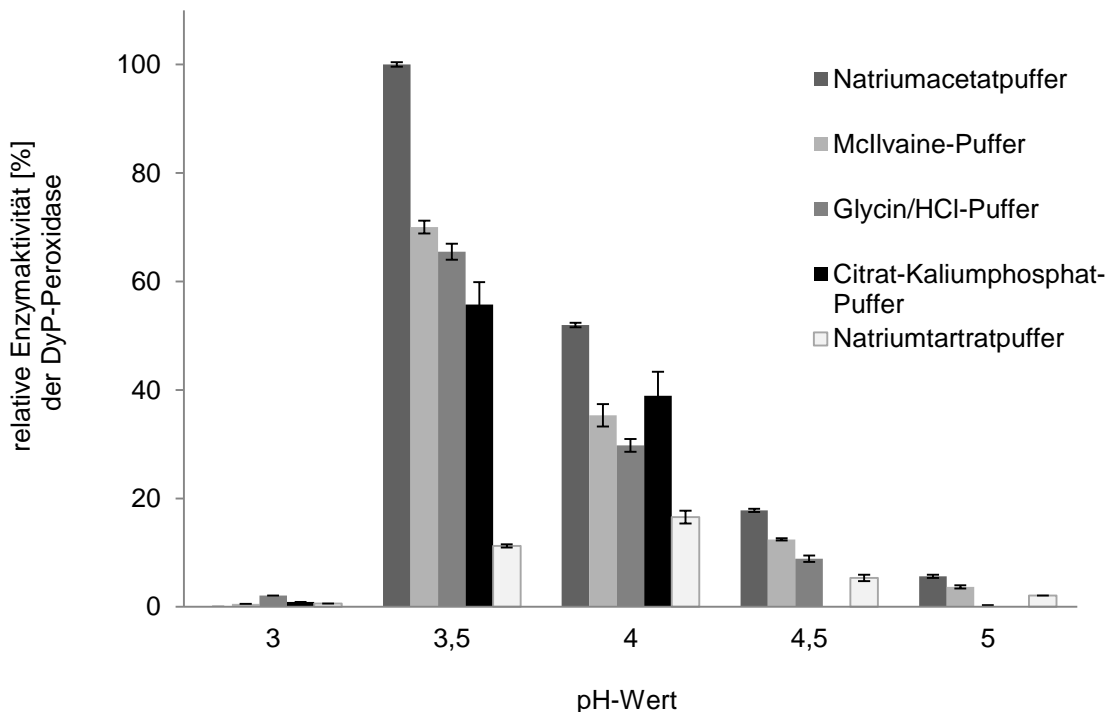


Abbildung 76: Relative Enzymaktivität [%] der Dyp-Typ Peroxidase in Abhängigkeit vom Puffer.

Die Aktivität wurde über einen pH-Bereich von 3,0 bis 5,0 bestimmt. Die größte Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase wurde im Natriumacetatpuffer pH 3,5 bestimmt. Bei pH 3,0 konnte keine signifikante Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 76). Für die weitere Charakterisierung der Dyp-Typ Peroxidase wurde ein Natriumacetatpuffer pH 3,5 verwendet. Für die Bestimmung der pH-Stabilität und des pH-Optimums des Enzyms wurde der McIlvaine-Puffer verwendet, da mit diesem ein größerer pH-Bereich abgedeckt werden kann.

Zur Untersuchung der pH-Stabilität wurde die Dyp-Typ Peroxidase in McIlvaine-Puffer über einen pH-Bereich von 3,0 bis 5,0 inkubiert und stündlich über 4 h die Aktivität bestimmt.

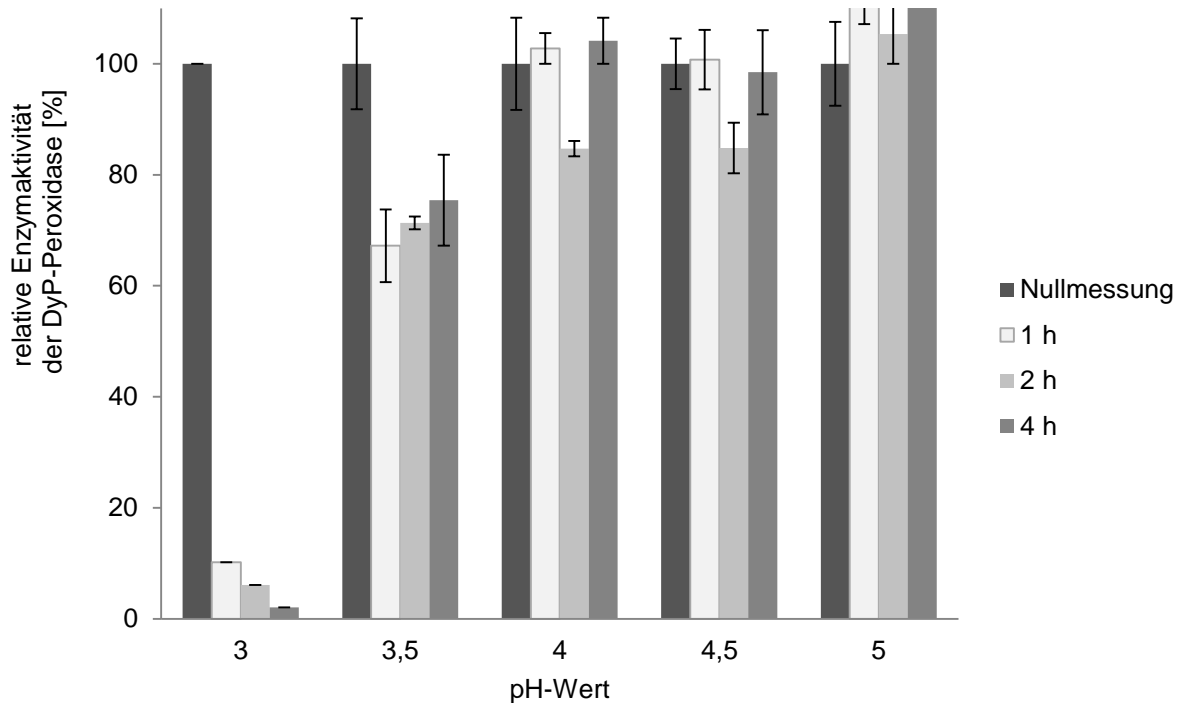


Abbildung 77: Bestimmung der pH Stabilität der Dyp-Typ Peroxidase

Die Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase bleibt im pH-Bereich von 3,5 bis 5,0 über mehrere Stunden weitgehend stabil. Bei dem pH-Wert von 3,5 nahm die Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase um ca. 30% ab. Bei pH 3,0 nimmt die Aktivität bereits nach einer Stunde sehr stark ab (nur 10% der Anfangsaktivität), nach vier Stunden war kaum noch Aktivität detektierbar.

Die Dyp-Typ Peroxidase wurde mit einer 30%igen Ethanol-Lösung in Natriumacetatpuffer verdünnt. Die Aktivität der Probe wurde über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Nach einer Inkubation von 24 h war kein Verlust an Aktivität feststellbar.

Zu Überprüfung der Lagerstabilität wurde die Dyp-Typ Peroxidase über mehrere Tage bei - 20°C und bei 4°C gelagert und anschließend die Aktivität bestimmt. Die Aktivität war bei beiden Proben annähernd gleich. Auch die Wiederholung der Messung mit erneut

aufgetauten Proben zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität. Die Dyp-Typ Peroxidase lässt sich ohne Aktivitätsverluste bei 4°C und -20°C lagern.

Die Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase wurde bei verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen gemessen. Die Konzentrationen des Wasserstoffperoxids variierten in einem Bereich von 0,0125 mM bis 1,25 mM.

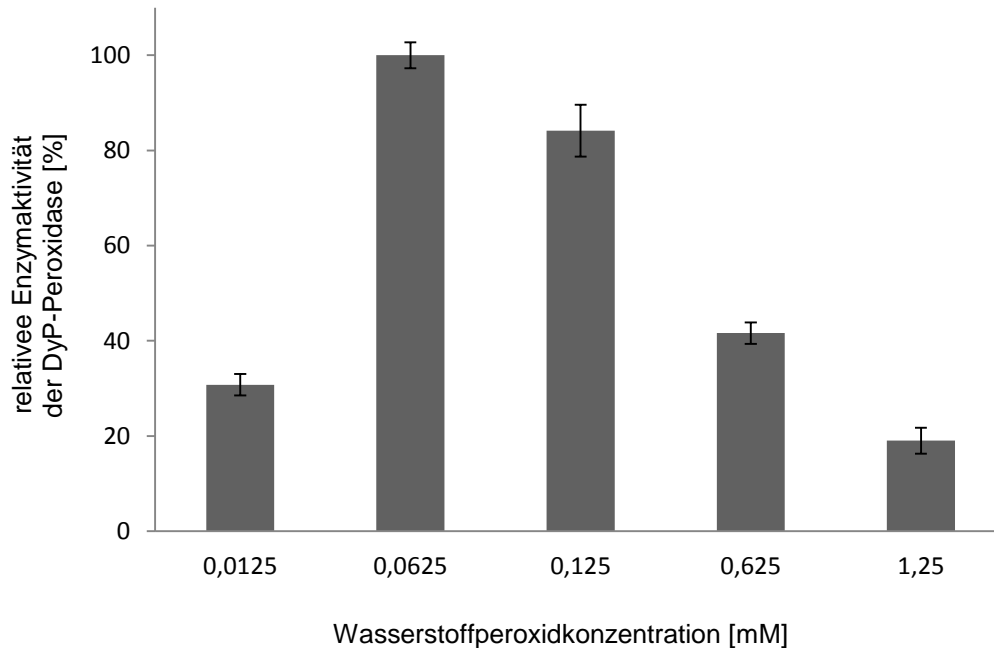


Abbildung 78: Relative Enzymaktivität der Dyp-Typ Peroxidase in Abhängigkeit der Wasserstoffperoxidkonzentration

Die Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase (eingesetzte Proteinmenge Kulturüberstand 15 µg) war bei der Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,0625 mM maximal. Bei 1,25 mM betrug die Aktivität nur noch 20% dieser Aktivität.

Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt.

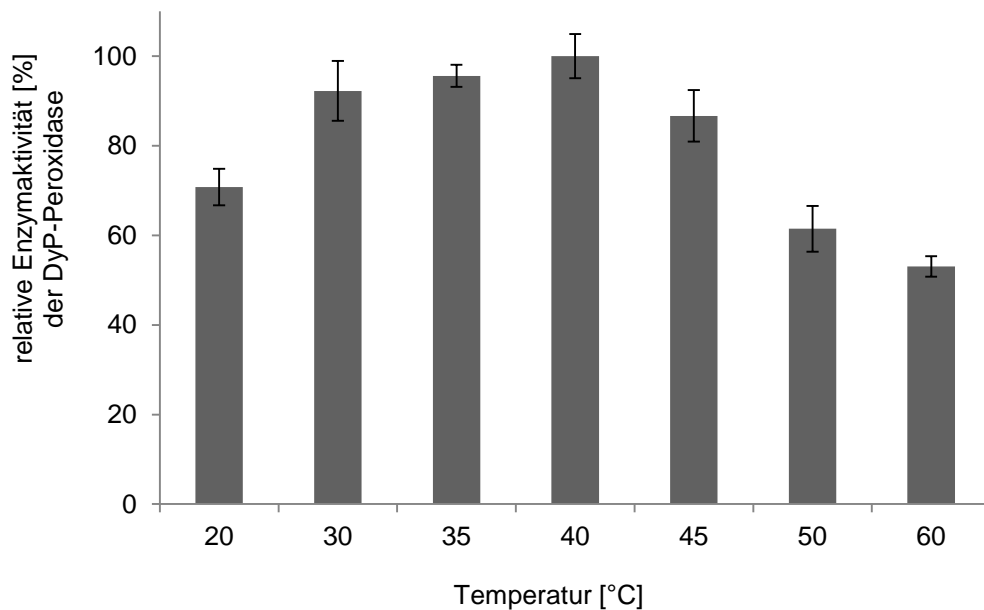


Abbildung 79: relative Enzymaktivität der Dyp-Typ Peroxidase in Abhängigkeit der Temperatur

Das Temperaturoptimum wurde in einem Bereich von 20°C bis 60°C bestimmt. Die Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase war bei einer Temperatur von 40°C maximal und besaß in einem Bereich von 30°C bis 45°C noch 80% ihrer Aktivität.

Die Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase wurde gegenüber den Substraten ABTS (420 nm), DMP (468 nm) und Veratrylalkohol (310 nm) getestet (Tabelle 13).

Tabelle 13: Ermittelte Daten der Dyp-Typ Peroxidase-Aktivität mit unterschiedlichen Substraten; ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonsäure), DMP: 2,6-dimethoxyphenol, VA: Veratrylalkohol

Substrat	Verdünnungsfaktor der Dyp-Typ Peroxidase	Aktivität [U L-1]
ABTS	1:1600	59375
DMP	1:100	340
VA	1:100	-

Ein Umsatz des Veratrylalkohols durch die Dyp-Typ Peroxidase konnte nicht beobachtet werden. Die Aktivität der Dyp-Typ Peroxidase ist mit ABTS (59375 U L^{-1}) um ein vielfaches höher als mit DMP (340 U L^{-1}) als Substrat.

2.10 *In-vitro* Umsetzungen mit isolierten Enzymen

2.10.1 *In-vitro* Umsetzungen von Lignocellulose durch *P. sapidus* Enzyme

Für die *in-vitro* Umsetzungen mit Rapsstroh und Pappelholz wurden verschiedene lignolytische Enzyme verwendet:

Laccase (L) (Sigma, 50 U mL^{-1}); Zellwand-Mix (Cellulase/Xylanase im Verhältnis (Aktivität) (1:5), $1,2 \text{ U mL}^{-1}$ Cellulase und $6,2 \text{ U mL}^{-1}$ Xylanase) (C-X); Dyp-Typ Peroxidasen (heterolog exprimierte Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus* (D, 17 U mL^{-1}) und MaxiBright (DSM, 810 U mL^{-1}) (Mspl oder M)).

In einer ersten Versuchsreihe wurden die einzelnen Enzyme, ein Cellulase/Xylanase-Mix, eine Laccase und eine Dyp-Typ Peroxidase eingesetzt und mit einer wechselnden Inkubation dieser Enzyme und einer Kombination aus allen Enzymen verglichen. Als Temperatur wurde die Wachstumstemperatur der Basidiomyceten, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, gewählt. Die wechselnde Inkubation zeigte mit $\sim 22\%$ Gewichtsverlust und einer erhöhten Freisetzung von Glucose (6.7.8) und Gesamtphenol (6.7.7) den besten Abbau der Lignocellulose (Abbildung 80). In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Reihenfolge der Enzyminkubationen untersucht (Abbildung 81). Die freigesetzte Menge an Gesamtphenolen unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Wechselstrategien. Vom erreichten Gewichtsverlust waren die Inkubationen am erfolgversprechendsten, bei denen zunächst der Cellulase/Xylanase-Mix eingesetzt und anschließend eine Inkubation mit Laccasen oder Peroxidasen erfolgte (Abbildung 81). Dies ergab eine Erhöhung des Abbaus von 5-12% gegenüber den anderen Kombinationen. Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob die Verlängerung der Inkubationszeit von drei auf vier Tage, oder der Einsatz der doppelten Enzymkonzentration eine Steigerung im Abbau erreichen kann. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit wurde der Gesamtphenolgehalt nahezu verdoppelt (Abbildung 82). Ebenso wurden ein höherer Glucosegehalt sowie ein höherer Gewichtsverlust detektiert. Eine Verdoppelung der Enzymkonzentration brachte keinen Erfolg. Mit der so optimierten Enzymkombination wurde der Einfluss der Inkubationstemperatur untersucht. Der detektierte Gewichtsverlust war bei $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ am größten (Abbildung 83). Die detektierten Gehalte an Gesamtphenol und Glucose lagen im Bereich von 5 bis 6 mg Gesamtphenol und 22 bis 30 mg Glucose pro Gramm Substrat.

In einer weiteren Versuchsreihe (Abbildung 84) wurde neben der heterolog exprimierten Dyp-Typ Peroxidase Mspl aus *Mycetinis scorodoni* auch eine heterolog exprimierte Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus* eingesetzt. Die *in-vitro* Umsetzungen mit den einzelnen Enzymen oder dem gleichzeitigen Einsatz aller Enzyme (Kombination, Abbildung 84) zeigten geringere Freisetzungsraten als der wechselnde Einsatz von hydrolytischen und oxidativen Enzymen. Die höchsten Produktkonzentrationen ließen sich mit einer wechselnden Inkubation von Cellulase/Xylanase-Mix; Dyp-Typ Peroxidase aus *P. sapidus*; Cellulase/Xylanase-Mix und Laccase erzielen (Gewichtsverlust von 34% und Phenolgehalt von 7 mg g_{Substrat}). Der detektierte Gehalt an Glucose lag bei 28,7 mg und die Konzentration an reduzierenden Zuckern (6.7.6) betrug 29,5 mg g_{Substrat} (Abbildung 84).

Eine Maßstabsvergrößerung wurde um den Faktor 15 durchgeführt und Pappelholz als ein weiteres Substrat untersucht (Abbildung 85). Durch die Verwendung aktiver Enzyme mit der oben beschriebenen Inkubationsstrategie gelang ein Abbau von 37% der eingesetzten Rapsstrohmenge, bei Pappelholz wurden 31% abgebaut. Es wurden Gesamtphenolgehalte von 6,3 beziehungsweise 9,3 mg g_{Substrat} erhalten. Der detektierte Gehalt an Glucose lag bei 13,7 bzw. 9,8 mg und die Konzentration an reduzierenden Zuckern betrug 40 bzw. 50,5 mg g_{Substrat} (Abbildung 85). Der Ligningehalt im Reststoff wurde um 3,6% (Rapsstroh) bzw. 10,4% (Pappelholz) reduziert.

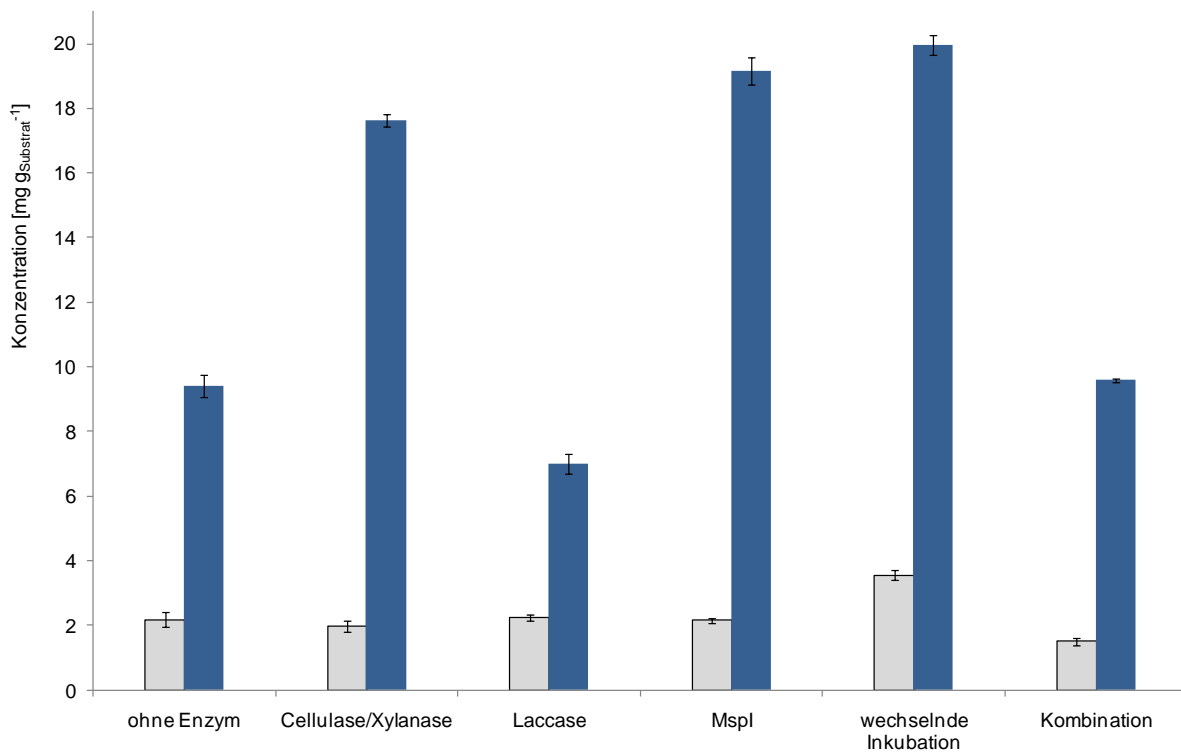
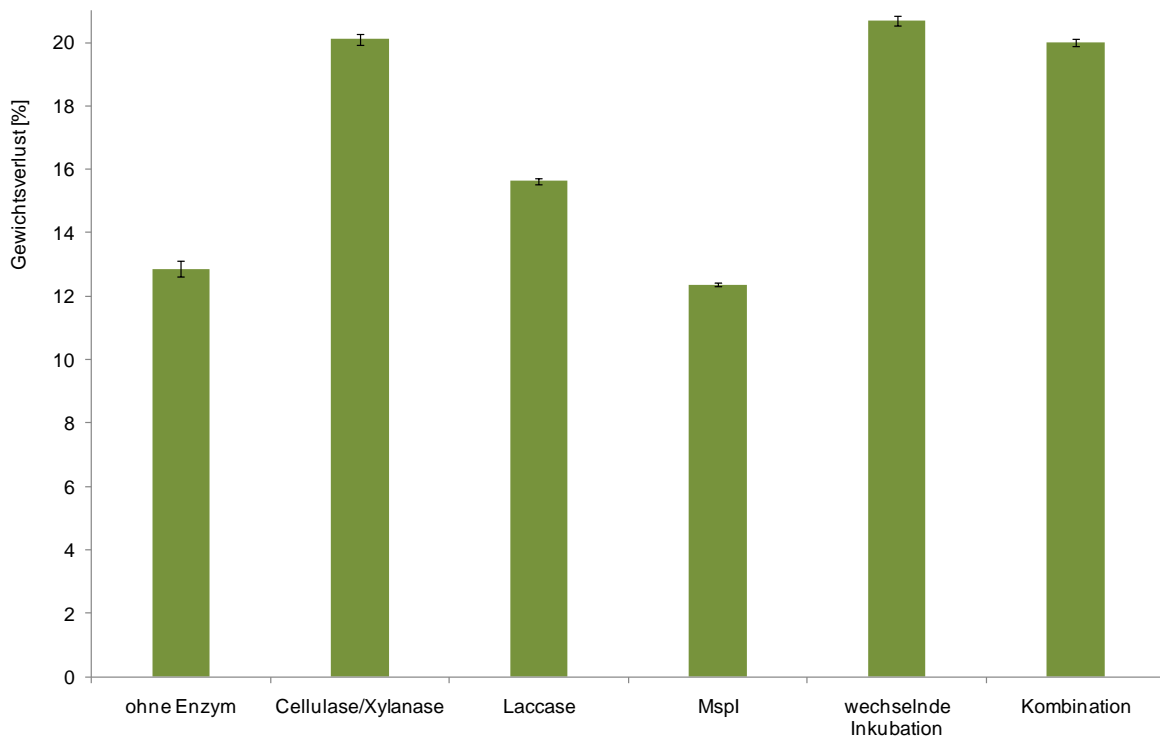


Abbildung 80: Gewichtsverlust (grün) und Gesamtphenolgehalt (grau) und Glucose (blau) nach einer *in-vitro* Umsetzung von Rapsstroh bei 25 °C über drei Tage; Kombination: gleichzeitige Inkubation mit allen Enzymen

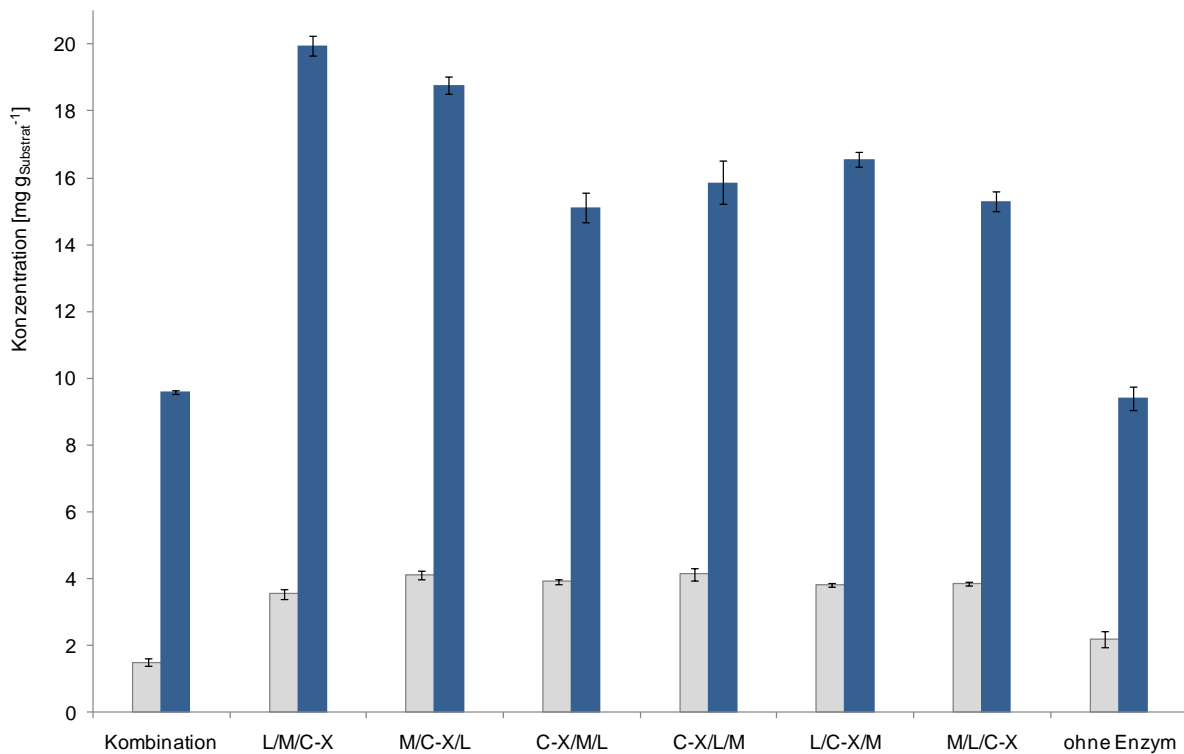
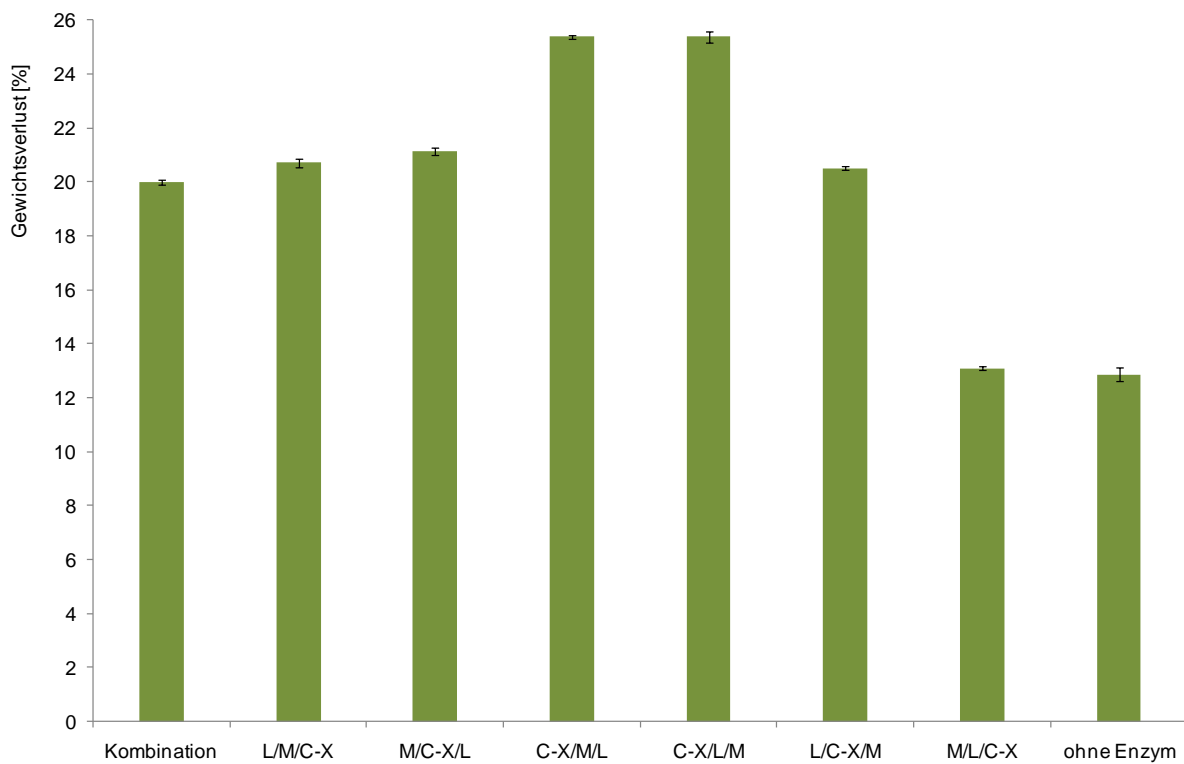


Abbildung 81: Gewichtsverlust (grün) und Gesamtphenolgehalt (grau) und Glucose (blau) nach einer *in-vitro* Umsetzung von Rapsstroh bei 25 °C über drei Tage; Kombination: gleichzeitige Inkubation mit allen Enzymen; L: Laccase; M: MspI; C-X: Cellulase/Xylanase-Mix

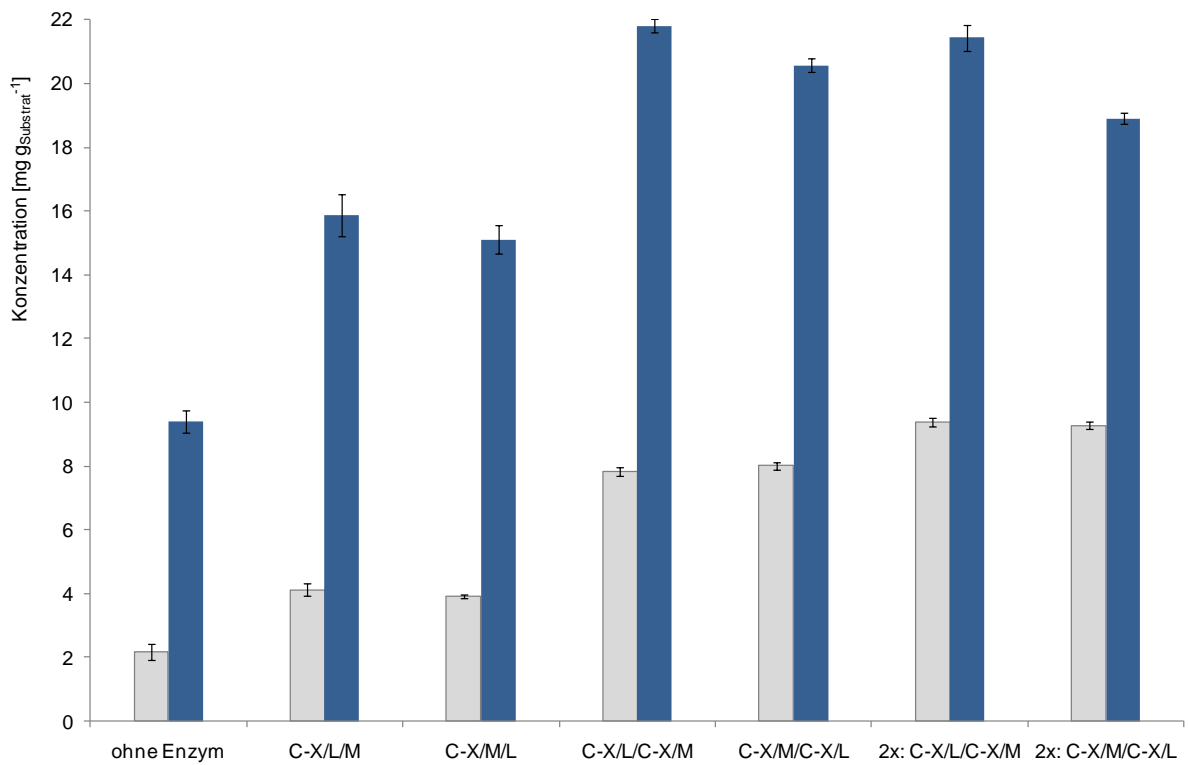
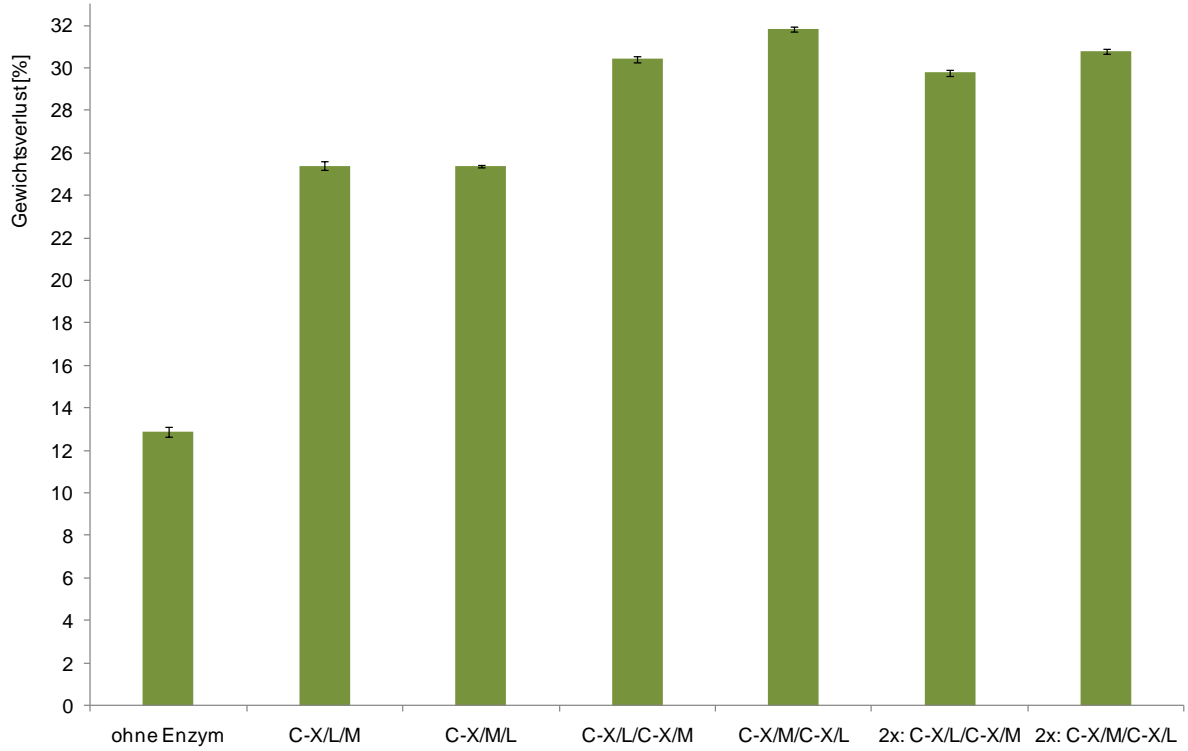


Abbildung 82: Gewichtsverlust (grün) und Gesamtphenolgehalt (grau) und Glucose (blau) nach einer *in-vitro* Umsetzung von Rapsstroh bei 25 °C über drei bzw. vier Tage; L: Laccase; M: MspI; C-X: Cellulase/Xylanase-Mix; 2x: doppelte Enzymmenge

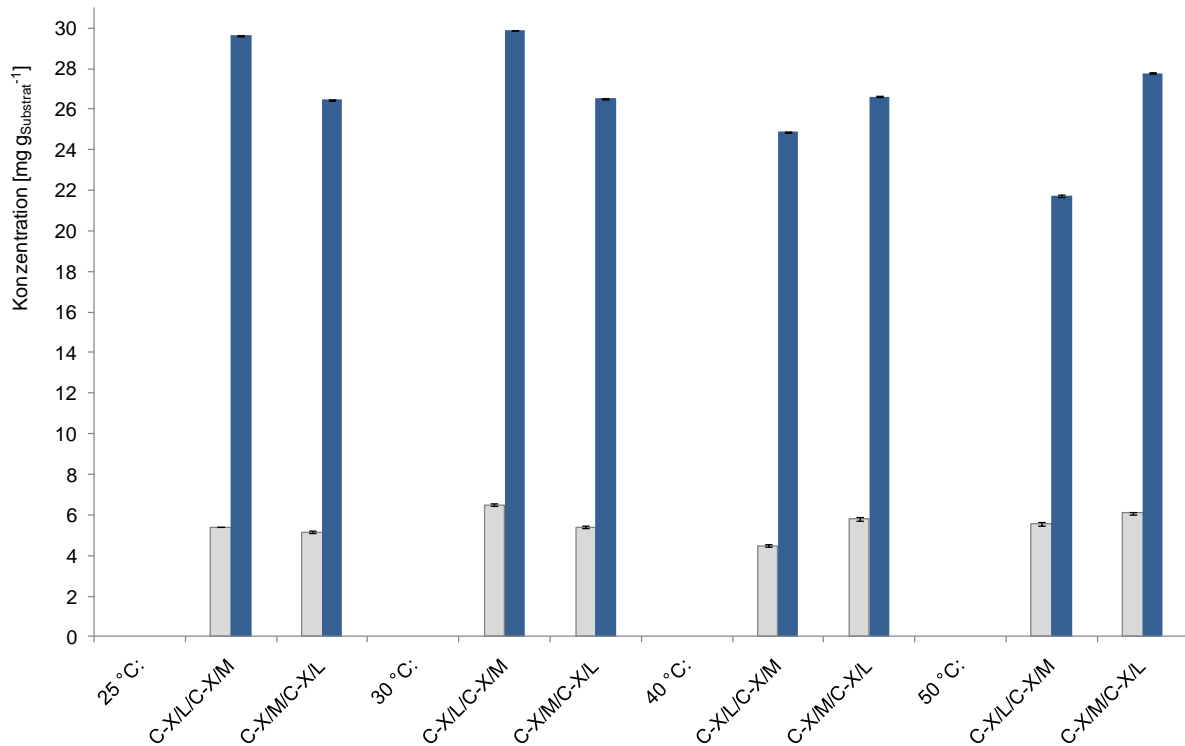
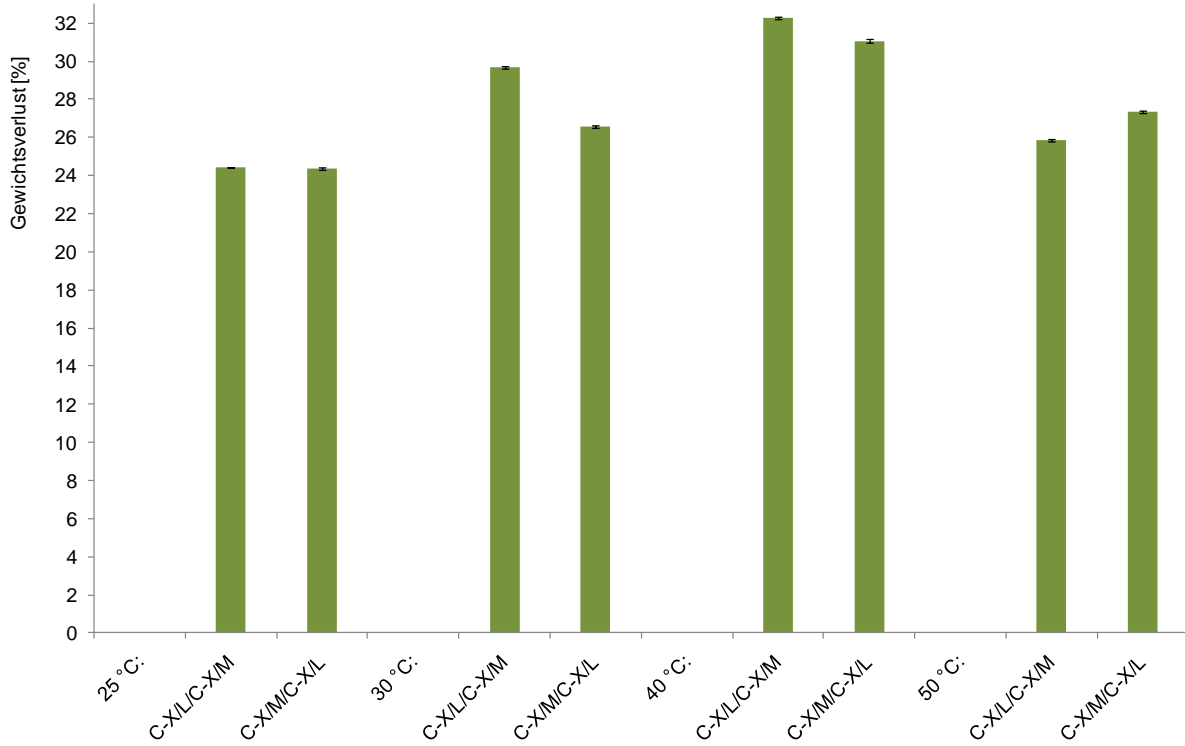


Abbildung 83: Gewichtsverlust (grün) und Gesamtphenolgehalt (grau) und Glucose (blau) nach einer *in-vitro* Umsetzung von Rapsstroh bei verschiedenen Temperaturen über vier Tage; L: Laccase; M: Mspl; C-X: Cellulase/Xylanase-Mix

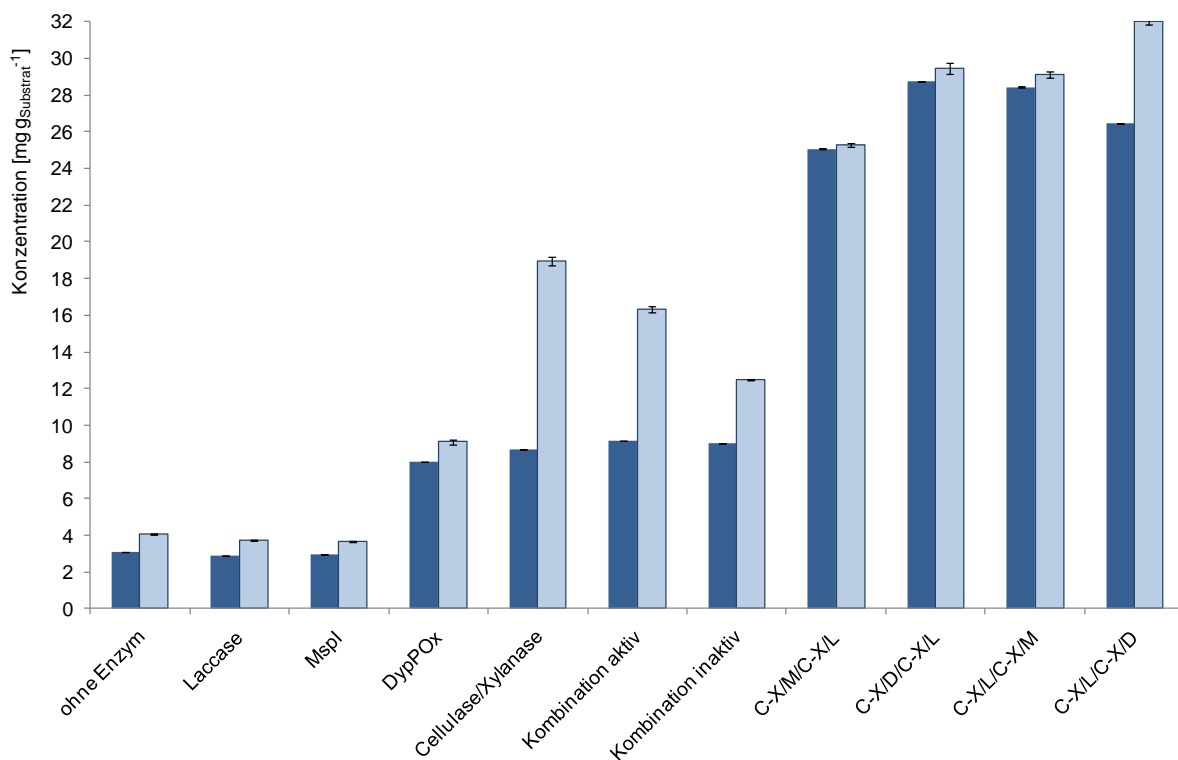
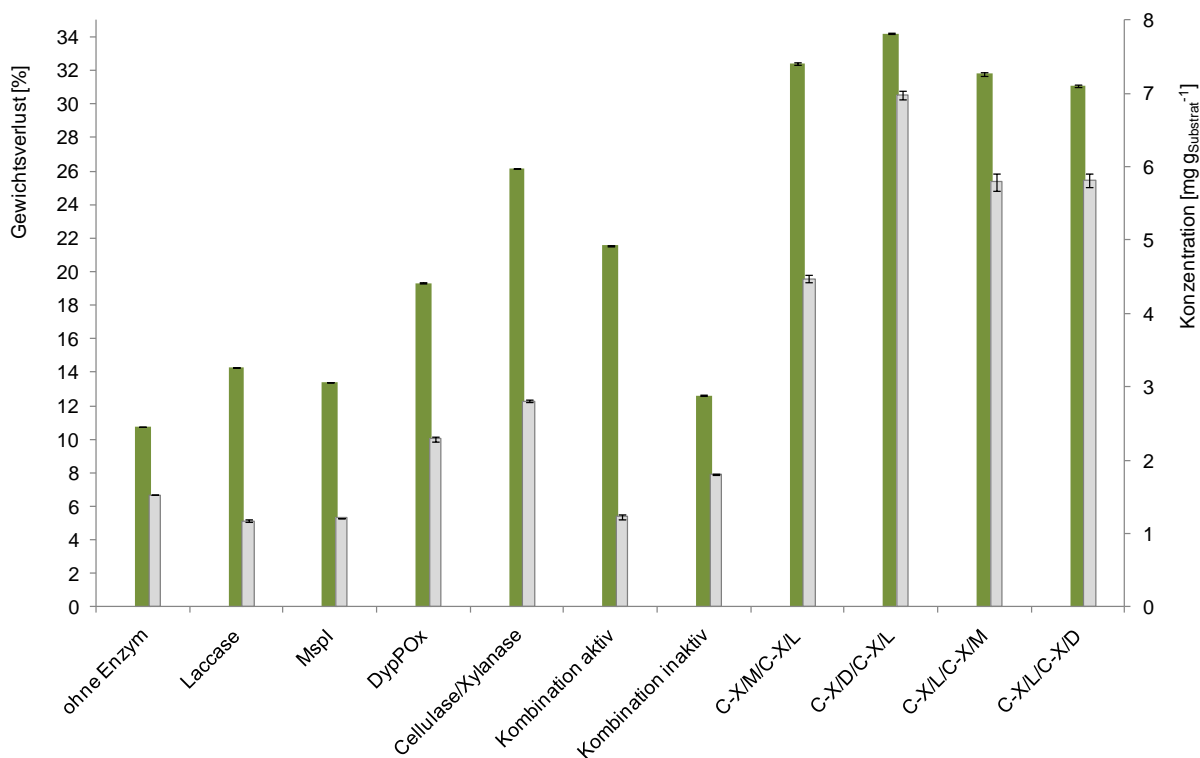


Abbildung 84: Gewichtsverlust (grün) und Gesamtphenolgehalt (Sekundärachse/grau), Glucose (blau) und reduzierende Zucker (hellblau) nach einer *in-vitro* Umsetzung von Rapsstroh bei 40 °C über vier Tage; Kombination: gleichzeitige Inkubation mit allen Enzymen; L: Laccase; M: Mspl; C-X: Cellulase/Xylanase-Mix; D: heterolog exprimierte DypTyp Peroxidase; inaktiv: Hitzeinaktivierung 20 min bei 100 °C

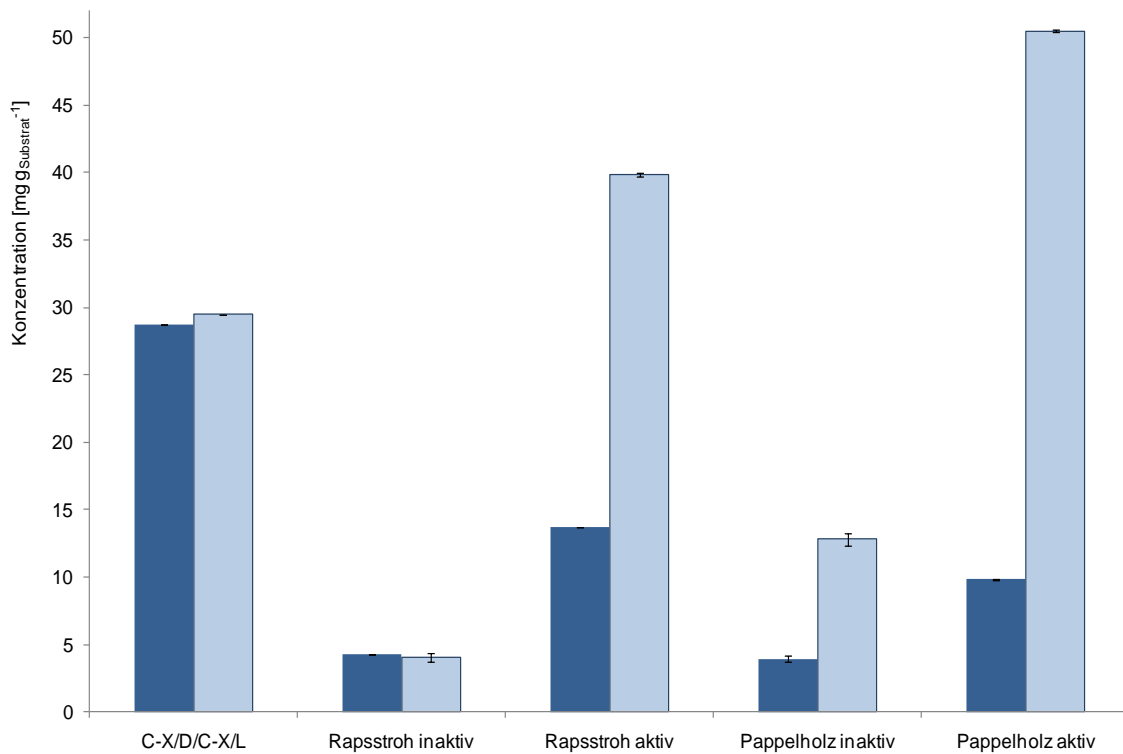
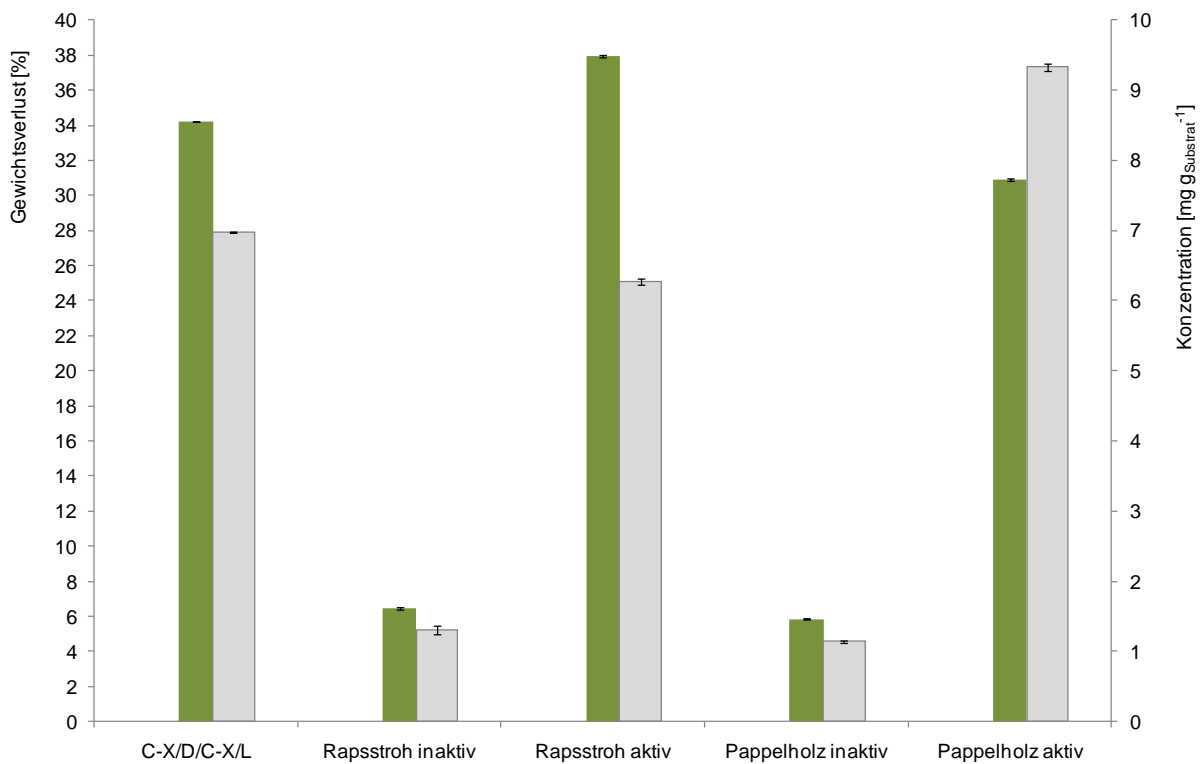


Abbildung 85: Up-Scaling der *in-vitro* Umsetzung um den Faktor 15: Gewichtsverlust (grün) und Gesamtphenolgehalt (Sekundärachse/grau), Glucose (blau) und reduzierende Zucker (hellblau) nach einer *in-vitro* Umsetzung von Rapsstroh und Pappelholz bei 40 °C über vier Tage; wechselnde Inkubation: C-X/D/C-X/L (Rapsstroh, Kleinansatz); L: Laccase; C-X: Cellulase/Xylanase-Mix; D: heterolog exprimierte DypTyp Peroxidase; inaktiv: Hitzeinaktivierung 20 min bei 100 °C

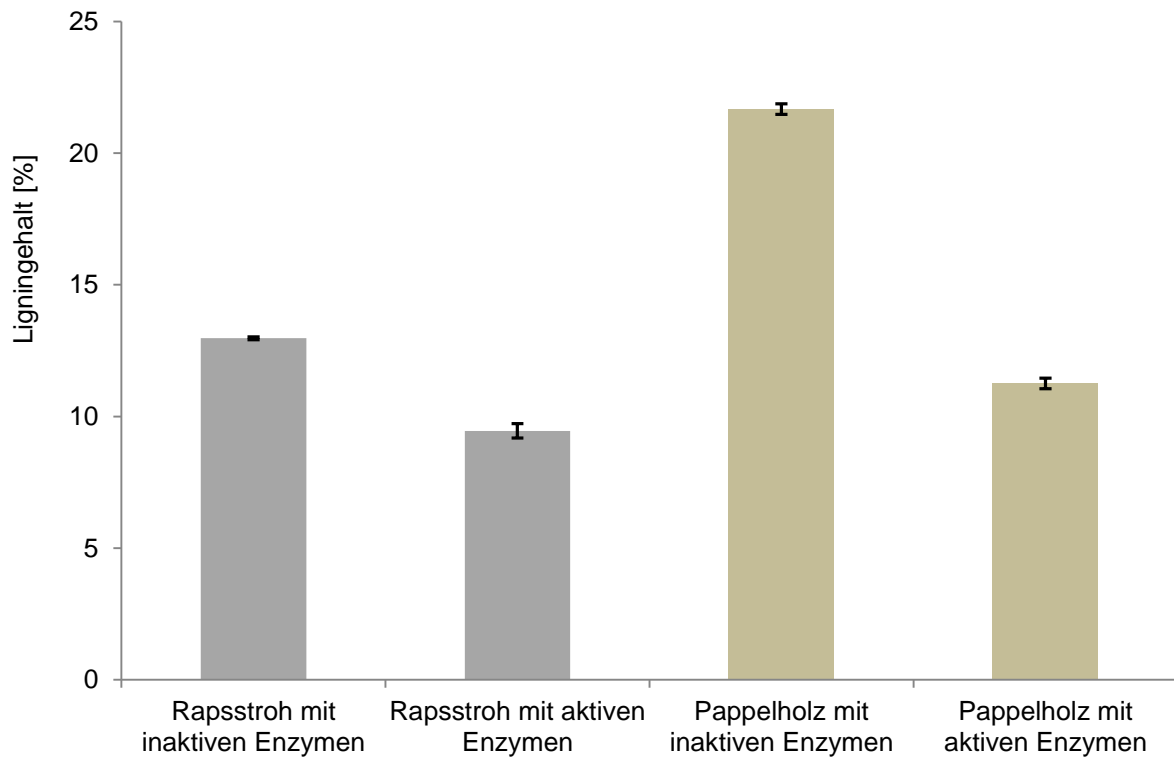


Abbildung 86: Up-Scaling der *in-vitro* Umsetzung um den Faktor 15: Ligningehalt im Reststoff nach einer *in-vitro* Umsetzung von Rapsstroh und Pappelholz bei 40 °C über vier Tage; wechselnde Inkubation: C-X/D/C-X/L; L: Laccase; C-X: Cellulase/Xylanase-Mix; D: heterolog exprimierte DypTyp Peroxidase; inaktiv: Hitzeinaktivierung 20 min bei 100 °C

2.10.2 *In-vitro* Umsetzungen von Lignocellulose durch *X. polymorpha* Enzyme

Die natürliche Funktion der Esterase aus *X. polymorpha* beim biokatalytischen Abbau pflanzlicher Zellwände wurde durch die quantitative Freisetzung von Hydroxyzimtsäuren aus wasserunlöslichem Weizenarabinoxylan (Megazyme, Irland) und fein gemahlenem Weizenstroh mittels enzymatischer Hydrolyse bestätigt (Abbildung 87).

Während aus Arabinoxylan ausschließlich Ferulasäure (bis zu $0,6 \text{ mg g}^{-1}_{\text{Substrat}}$) freigesetzt wurde, wurde aus fein gemahlenem Weizenstroh Ferula- und *p*-Cumarsäure allerdings in geringerer Menge (bis zu $0,3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{Substrat}}$) hydrolytisch abgespalten. Während der ersten 2 Stunden erfolgte mit beiden Substraten die Freisetzung der größten Mengen an Hydroxyzimtsäuren, mit bis zu $0,38 \text{ mg g}^{-1}_{\text{Substrat}}$.

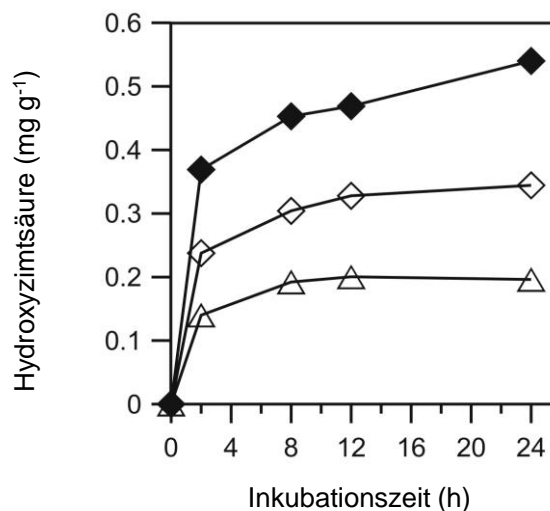


Abbildung 87: Menge freigesetzter Hydroxyzimtsäurederivate nach enzymatischer Hydrolyse durch die *Xylaria* Esterase in $\text{mg pro g}_{\text{Substrat}}$. Ferulasäure aus unlöslichem Weizenarabinoxylan (schwarzes Viereck), Ferula- (offenes Viereck) und *p*-Cumarsäure (offenes Dreieck) aus gemahlenem Weizenstroh.

Eine Steigerung der katalytischen Effektivität durch das synergistische Zusammenwirken von hydrolytischen und oxidativen Enzymen des Ascomyceten wurde anhand der natürlichen Substrate, fein gemahlene Rapsstroh (<200 μm) und fein gemahlene Buchenholz (<200 μm) untersucht.

Dazu wurden die *XpoFAE* aber auch die Laccase des Ascomyceten *X. polymorpha* (*XpoLac*) mit einer spezifischen Aktivität von 0,4 bzw. 128 U mg^{-1} eingesetzt (Tabelle 14; Liers *et al.* 2007, Nghi *et al.* 2011b). Der Ansatz wurde durch einen rekombinanten Enzymcocktail aus *T. reesei* (spez. Aktivität 1,6 und 1 U mg^{-1} Carboxymethylcellulase-

bzw. Glucuronoxylanase-Aktivität (Cell/Xyl); AB Enzymes, Darmstadt) ergänzt und optimiert.

Tabelle 14: während der Fermentation von Rapsstroh & Buchenholz eingesetzte Enzym- und Proteinmengen sowie spezifische Aktivitäten der verwendeten Enzyme.

Enzym	spezifische Aktivitäten (U mg ⁻¹)	eingesetzte Enzymmenge (U ml ⁻¹)	eingesetzte Proteinmenge (mg/ml)
Laccase	128,0	1,0	0,01
Esterase	0,4	0,17	0,4
AB Enzyme Cellulase	1,6	10,0	6,4
AB Enzyme Xylanase	1,0	6,0	6,4

Es wurden Einzelumsetzungen mit den jeweiligen Enzymen durchgeführt, sowie Kombinationsumsetzungen mit jeweils allen Enzymen bzw. ausschließlich den Hydrolasen (Tabelle 14). Zu Vergleichszwecken dienten Kontrollen mit entsprechendem Substrat und entweder denaturierten Enzymen (95 °C; 30 min) und jeweils einer Kontrolle ohne Enzyme.

Der synergistische Effekt der katalytischen Aktivitäten verschiedener Pilzenzyme bei der Fermentation von Lignocellulose wurde durch die quantitative Bestimmung der einzelnen Holzzucker mittels Ionenaustausch-Chromatographie (REZEX, RPM Monosaccharide, 300 x 7.8 mm, Phenomenex) nachgewiesen. In Tabelle 15 sind die Mengen der freigesetzten Polysaccharide aus Rapsstroh und Buchenholz nach Korrektur mit den entsprechenden Kontrollen zusammengefasst. Es wurde deutlich, dass die höchsten Freisetzungen durch Enzymcocktails bewirkt werden, die entweder aus den Hydrolasen *XpoFAE* & Cell/Xyl (z.B. Glucose 5,5 bzw. 2,8 mg g⁻¹), oder zusätzlich mit der Laccase von *X. polymorpha* (z.B. Glucose 5,9 bzw. 3,6 mg g⁻¹) ergänzt, bestehen. Erwartungsgemäß wurden aus Rapsstroh größere Mengen an Holzzuckern freigesetzt als aus Buchenholz, das mehr Lignin enthält und dadurch schwerer hydrolysierbar ist. Die Menge an freigesetzter Galactose (ca. 3,0 mg g⁻¹) und Glucose (5,9 mg g⁻¹) war nach der Umsetzung mit allen zur Verfügung stehenden Enzymen, d.h. unter dem katalytischen Einfluss aller Hydrolasen und der Phenol-oxidierenden Laccase aus Rapsstroh am höchsten.

Die freigesetzten Mengen an Arabinose und Mannose waren z.T. innerhalb desselben Substrates recht ähnlich, erwartungsgemäß aus Rapsstroh wieder höher als aus Buchenholz (Rapsstroh 1,3 – 2,5 mg g⁻¹ und Buchenholz 0,2 – 0,9 mg g⁻¹).

Tabelle 15: freigesetzte Holzzucker (mg g^{-1} Substrat) nach der enzymatischen Behandlung von fein gemahlenen Rapsstroh und Buchenholz mit einzelnen Enzymen und Enzymkombinationen.

Probe	Freigesetzte Holzzucker (mg g^{-1})				
	Arabinose	Galactose	Glucose	Mannose	Xylose
<u>fein gemahlene Rapsstroh:</u>					
XpoFAE	1,8	0,2	1,4	0,9	1,4
Cell/Xyl	1,3	0,5	4,7	2,3	3,4
XpoFAE	2,5	1,5	5,5	3,0	3,5
Cell/Xyl					
XpoFAE					
Cell/Xyl	2,3	3,0	5,9	2,6	3,5
XpoLac					
<u>fein gemahlene Buchenholz:</u>					
XpoFAE	0,9	0,4	1,7	0	0,2
Cell/Xyl	0,2	0	2,2	0	2,7
XpoFAE	0,9	0,4	2,8	0,2	2,8
Cell/Xyl					
XpoFAE					
Cell/Xyl	0,9	0,4	3,6	0,1	3,0
XpoLac					

Insgesamt stimmen die enzymatisch freigesetzten Mengen an Holzzuckern nicht mit vorhandenen Literaturwerten überein (z.B. $34\text{-}70 \text{ mg L}^{-1}$ Glucose, Aderemi *et al.* 2008 oder $\sim 10 \text{ g L}^{-1}$ Glucose, Kovacs *et al.* 2009). Das lag einerseits an den milderen Reaktionsbedingungen unter denen unser Versuch durchgeführt wurde. So betrug die Reaktionstemperatur in unserem Fall lediglich $23 \text{ }^\circ\text{C}$; eine Temperatur, die für die Stabilität der XpoFAE günstiger war, als die optimale Reaktionstemperatur ($37 - 40^\circ\text{C}$, Nghi *et al.* 2011a). Zum anderen war die Effektivität der enzymatischen Hydrolyse von lignocellulosehaltigen Materialien von der Menge der eingesetzten Enzyme und der Menge des Substrates abhängig; Parameter die wir in unserem Versuch zunächst willkürlich auswählten und deren Optimierung in fortführenden Versuchen durchgeführt werden soll. Zum anderen förderte eine chemische oder mechanische Vorbehandlung ebenfalls den Ertrag an löslichen Polysacchariden.

Der Einfluss der Enzymcocktails wurde, sowohl durch die Verwendung aller Hydrolasen als auch zusätzlich der Laccase, an Hand der Gesamtheit aller aus dem jeweiligen Substrat freigesetzten Holzzucker gezeigt (Abbildung 88). Ein solch synergistisches

Zusammenwirken mehrerer Enzyme dient auch unter natürlichen Bedingungen dem effektiven Angriff auf Lignocellulosen durch den pilzlichen Saprobiont, um schließlich die Freisetzung der lebensnotwendigen Holzzucker zu erreichen.

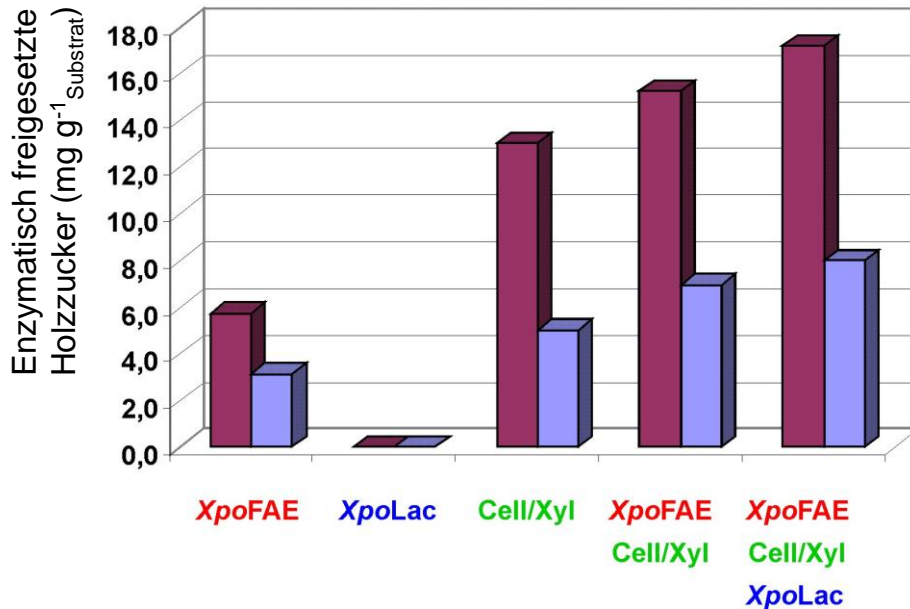


Abbildung 88: Summen enzymatisch freigesetzter Holzzucker (mg g⁻¹ Substrat) nach Inkubation von Rapsstroh (rot) und Buchenholz (violett) mit einzelnen Enzymen und Enzymcocktails; Enzyme von *X. polymorpha* (*XpoFAE*, *XpoLac*) & *T. reesei* (*Cell/Xyl*) nach 72 h Reaktionszeit (in Bezug zu den entsprechenden Kontrollen mit Hitze-inaktivierten Enzymen).

Die enzymatische Hydrolyse von Esterbindungen wie sie in Lignocellulosen z.B. den veresterten methylierten Caroxylgruppen der Galacturonsäurepolymere der Pektine vorhanden sind, kann zur Freisetzung von Methanol, sogenannten Biomethanol führen (Abbildung 89).

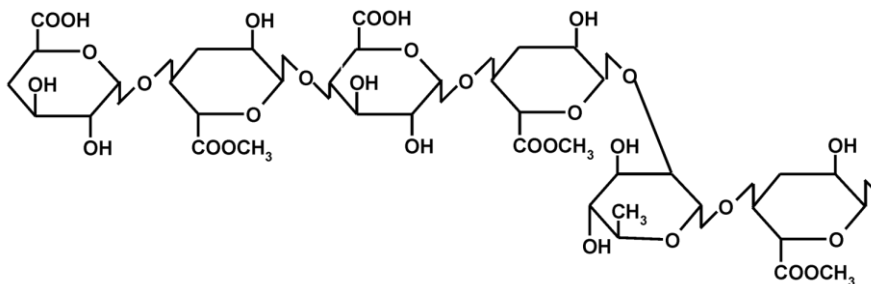


Abbildung 89: Pektin, ein pflanzliches Polymer bestehend aus veresterten Galacturonsäure-Einheiten, die mit α -L-Rhamnose-Bausteinen verknüpft sein können.

Dieser wiederum besitzt ein enormes biotechnologisches Potential zur potentiellen Synthese von Kraftstoffergänzungsmitteln wie z.B. Biodiesel. Aktuell gibt es einige Studien, die sich mit der enzymatischen Hydrolyse von pflanzlichen Materialien und der Gewinnung von Biomethanol befassen (Demirbas 2007, Ballat 2011).

In unseren Untersuchungen zur synergistischen Hydrolyse von Rapsstroh und Buchenholz konnten wir in Kooperation mit dem Projektpartner der Universität Bonn (AG Prof. König) die Freisetzung von Methanol aus den enzymatischen Umsetzungen erfolgreich nachweisen.

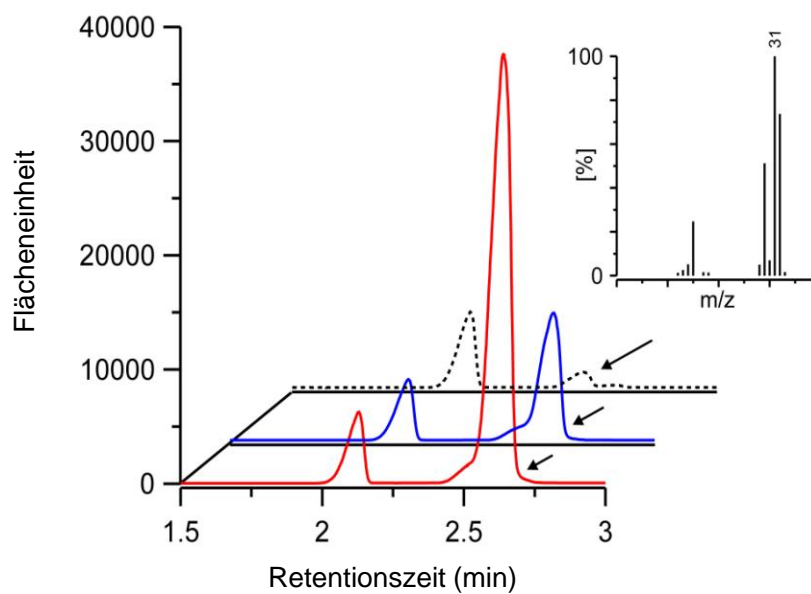


Abbildung 90: GC/MS Analyse von Methanol freigesetzt aus der enzymatischen Hydrolyse von Rapsstroh mit Enzymcocktails bestehend aus einerseits einem rekombinanten Präparat von AB Enzymes (blaue Linie) und andererseits aus dem rekombinanten Präparat von AB Enzymes sowie der *XpoFAE* und der *XpoLac* (rote Linie).

Auch hier wurden die höchsten Mengen des Reaktionsproduktes durch die Verwendung der Enzymcocktails erreicht. Durch das rekombinante Enzympräparat von AB Enzymes wurde Methanol in den Mengen von 5 bzw. 94 $\mu\text{g g}^{-1}$ aus Buche bzw. Rapsstroh freigesetzt, was durch Zusatz der *XpoFAE* auf 11 bzw. 194 $\mu\text{g g}^{-1}$ verdoppelt wurde. Durch den Einfluss der Laccase von *X. polymorpha* (*XpoLac*) wurde dieser Wert nochmals auf 20 bzw. 270 $\mu\text{g g}^{-1}$ Methanol aus Buche bzw. Rapsstroh gesteigert (Tabelle 16).

Tabelle 16: freigesetztes Methanol ($\mu\text{g g}^{-1}$ Substrat) nach der enzymatischen Behandlung von fein gemahlenem Buchenholz und Rapsstroh mit Enzymkombinationen.

Probe	Freigesetztes Methanol ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Buchenholz	Rapsstroh
<i>XpoFAE</i>	0	0
<i>XpoLac</i>	0	0
Cell/Xyl	5	94
<i>XpoFAE/ Cell/Xyl</i>	11	196
<i>XpoFAE/ Cell/Xyl/ XpoLac/</i>	20	270

Die Freisetzung aromatischer Fragmente aus Buchenholz- und Rapsstroh durch die enzymatischen Umsetzungen wurde in den wässrigen Überständen mittels Größenausschluss-Chromatographie analysiert und nachgewiesen (Hofrichter *et al.* 1998, Liers *et al.* 2011).

Es zeigte sich eine deutliche Zunahme wasserlöslicher aromatischer Fragmente (UV-Absorption bei 280 nm, Abbildung 91) für beide Substrate nach der Behandlung mit dem Enzymcocktail aus allen zur Verfügung stehenden Enzymen (*XpoFAE*, Cell/Xyl & *XpoLac*). Im Buchenholz entsprach dieses Elutionsprofil genau dem der Laccase durch die beeinflussten aromatischen Bestandteile; sodass hier nicht von einer Steigerung der Menge aromatischer Fragmente ausgegangen werden kann. Bei der Rapsstroh-Fermentation wurde eine eindeutige Zunahme aromatischer hochmolekularer Bestandteile im Bereich von 3 bis 200 kDa durch die Verwendung aller Enzyme erreicht. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass hier neben depolymerisierenden Effekten (durch z.B. die *XpoFAE*), die zu zusätzlichen freien Hydroxylgruppen führen, die wiederum durch die Laccase oxidiert werden können, auch Polymerisierungsreaktionen stattfinden. Ähnliche Effekte sind bereits für wässrige Extrakte aus Buchenholzkulturen von *X. polymorpha* beschrieben (Liers *et al.* 2006). Es kann davon ausgegangen werden, dass in diesen *in-vivo* Kulturen die gleichen Enzyme zum Aufschluss des Holzes vom Pilz gebildet wurden, wie sie in den hier beschriebenen Versuchen verwendet wurden.

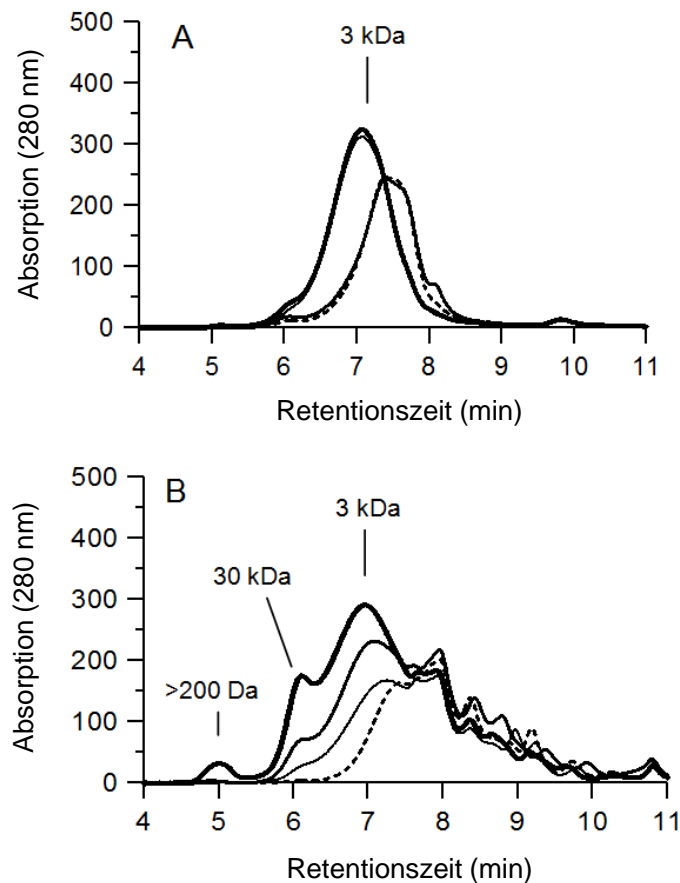


Abbildung 91: HPSEC Elutionsprofil (Molekulargewichtsverteilung) wasserlöslicher Lignocellulose-Fragmente, die aus Buchenholz (A) und Rapsstroh (B) nach der *In-vitro*-Umsetzung mit Pilzenzymen (*X. polymorpha* - Esterase & Laccase; *T. reesei* - Cellulase & Xylanase) freigesetzt wurden; gestrichelte Linie – Kontrolle ohne Enzym, dünne Linie – Umsetzung mit Laccase (*XpoLac*), mittlere Linie – Umsetzung mit Esterase (*XpoFAE*), dicke Linie - Umsetzung mit einer Kombination aus *T. reesei* Cellulase/Xylanase sowie Esterase und Laccase aus *X. polymorpha* (*XpoLac*, *XpoFAE*, Cell/ Xyl).

Die Ergebnisse zur enzymatischen Freisetzung der im Holz und Stroh enthaltenen Polysaccharide sowie zur Bildung von Biomethanol werden momentan weiter optimiert. Außerdem sind Studien zur Expression der *XpoFAE* in Kooperation mit Projektpartnern und in eigenen Versuchsansätzen im Rahmen von Qualifizierungsarbeiten, die die aufwendige Reinigung der *XpoFAE* aus Weizenstroh ersetzen und der Entwicklung eines rekombinanten biotechnologisch einsetzbaren Enzympräparates dienen wird. Die potentielle Anwendung der *XpoFAE* wird ebenfalls in weiteren Studien mit Wild-Typ aber auch rekombinanten Präparat weiter spezifiziert.

Die Ergebnisse bilden die wissenschaftliche Basis für ein Promotionsverfahren dessen Beendigung für 06/2012 geplant ist. Außerdem wurden sie bereits in Form einer wissenschaftlichen Publikation zusammengefasst, die zeitnah in einer referierten internationalen Fachzeitschrift veröffentlicht werden wird.

3 Ökologische und ökonomische Bewertung

Ob ein neu entwickeltes, biotechnologisches Verfahren tatsächlich nachhaltiger und mit geringeren Gefahren für die Umwelt verbunden ist als ein vergleichbarer chemischer oder bestehender biotechnologischer Produktionsprozess, muss für jeden Einzelfall untersucht werden: Nicht jedes biotechnische Verfahren ist darin automatisch dem chemischen Vergleichsverfahren überlegen (Heinzle *et al.* 2006). Daher sollte das im vorliegenden Projekt entwickelte enzymatische Verfahren zum schonenden Aufschluss von ligninhaltigem Pflanzenmaterial auf seine Nachhaltigkeit hin mit einem chemisch-thermischen Verfahren verglichen werden.

Im vorliegenden Fall wird der enzymatische Aufschluss von Pappelholz (2.10.1) durch aufeinander folgende Inkubation mit vier verschiedenen, in der Abfolge den natürlichen Holzabbau nachahmenden Enzymmischungen durchgeführt (Abbildung 92). Da die hierbei eingesetzte Peroxidase kommerziell noch nicht verfügbar ist, wurde hierfür mit Kosten von 7 € pro kUnit (dem Mittelwert der Kosten der übrigen eingesetzten Enzyme) gerechnet. Die Enzyme werden nach der Inkubation zu $\geq 85\%$ durch Ultrafiltration zurückgewonnen und lediglich bis zur benötigten Aktivität nachdosiert. Sofern die Lignin-, Cellulose- und Hemicellulosegehalte experimentell in diesem Projekt nicht ermittelt wurden, ist auf Literaturwerte in Grammel (1989) zurückgegriffen worden. Bei der Ausfällung des gelösten Lignins wird von einer Recovery-Rate von 93% ausgegangen. Für das Recycling des Ethanol wird von einer Wiedergewinnung von 95% ausgegangen.

Beim chemisch-thermischen Vergleichsverfahren (Organosolv-Verfahren) erfolgt das Lösen des Lignocellulosekomplexes (Buchenholz) mittels Kochen in einem Ethanol-Wasser-Gemisch unter geringem Schwefelsäurezusatz bei Überdruck (Abbildung 92). Die für das enzymatische Verfahren festgelegten Recovery- sowie Recyclingraten werden übernommen. Durch beide Verfahren werden die Cellulosefasern geschont und es wird eine hochwertige, reine Ligninfraktion mit 1000 bis 2000 g/mol erhalten.

Aus dem Vergleich der Materialflüsse ergibt sich für das enzymatische Verfahren eine Ligninausbeute (bezogen auf die im Substrat enthaltene Menge) von 60%, was dem 1,5-fachen des Organosolv-Verfahrens mit 40% entspricht.

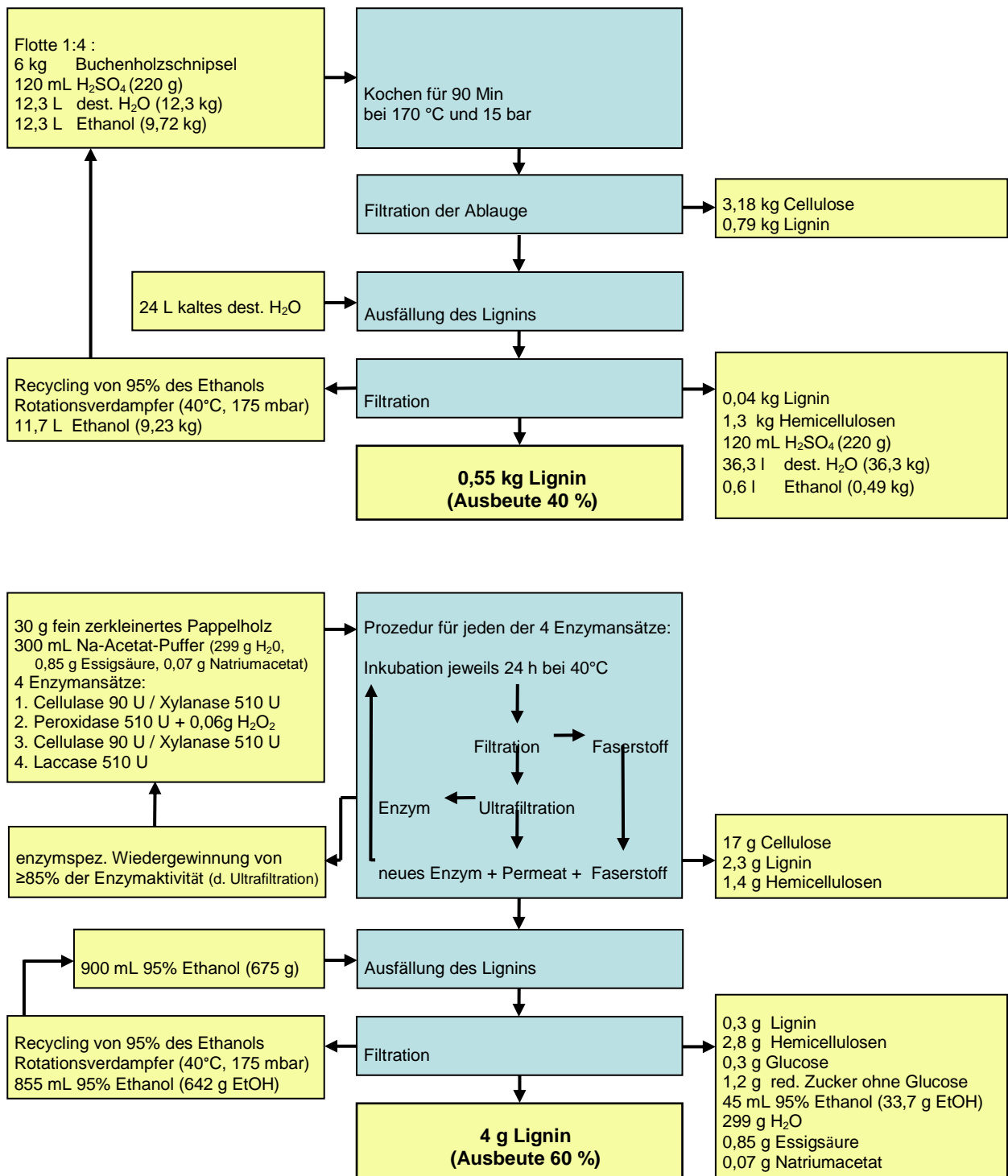


Abbildung 92: Veranschaulichung der Materialflüsse beim Organosolv-Verfahren (oben) sowie beim enzymatischen Verfahren (unten) zum Holzaufschluss

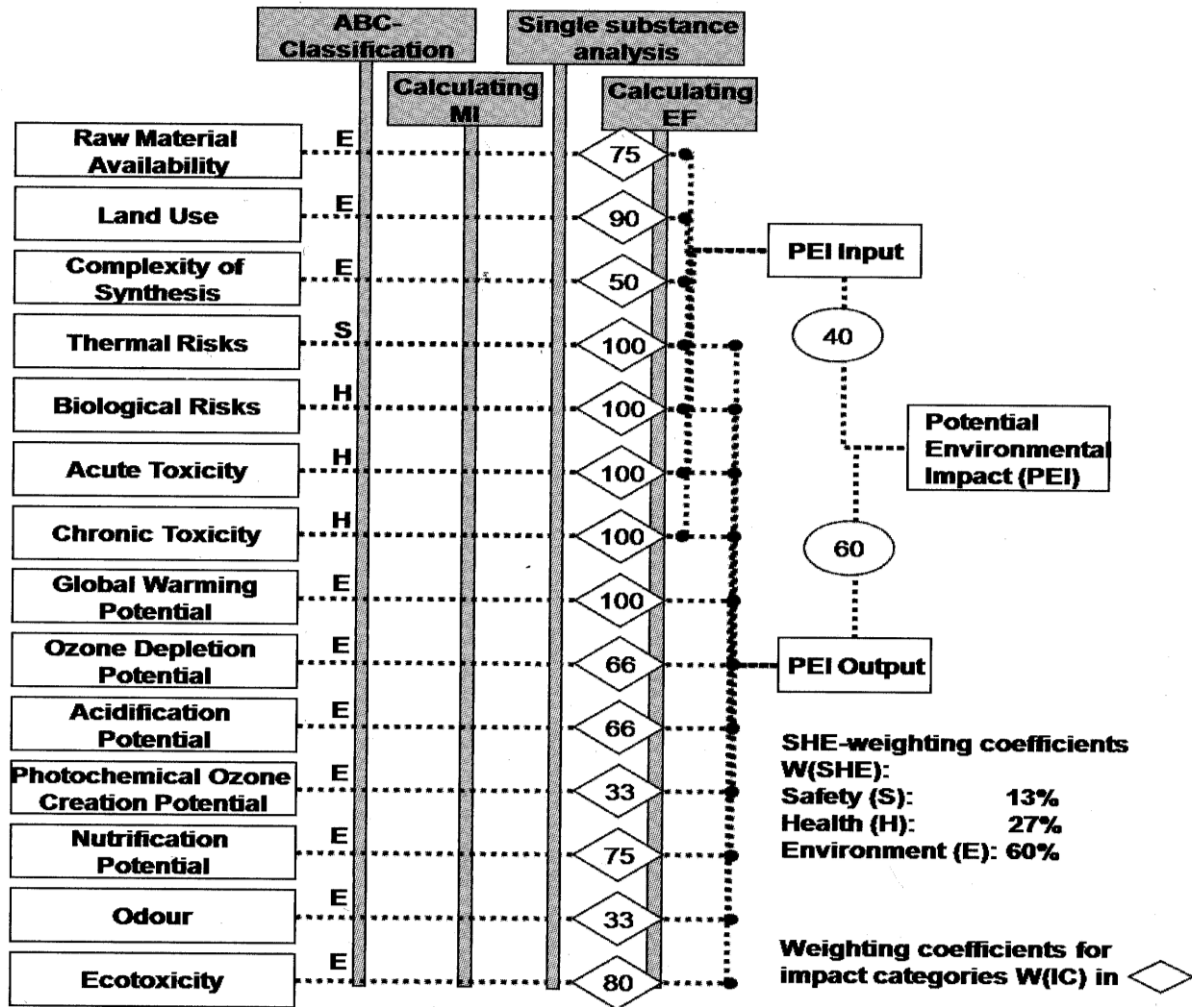


Abbildung 93: Ökologisches Bewertungssystem von Sabento (aus Brinkmann *et al.* 2010, nach Heinzle *et al.* 2006). Hiernach wird jeder Stoff bezüglich 14 Wirkungskategorien (wie z.B. Rohstoffverfügbarkeit, Landverbrauch) jeweils einer von 3 Bewertungsklassen nach einer qualitativen ABC Klassifizierung (problematisch, wenig problematisch, unproblematisch) zugeordnet. Über Wichtungskoeffizienten (W(IC)) werden die einzelnen Wirkungskategorien untereinander gewichtet, mit dem Ziel, einen Gesamtindikator zur Umweltbewertung zu erhalten. Hiernach erhält das thermische Risiko mit einem Wichtungskoeffizienten von 100 eine doppelt so hohe Bedeutung wie z.B. die Komplexität der Synthese mit 50. In einem arithmetischen Verfahren wird mit diesen Angaben für jeden Stoff nun jeweils für die sieben Bewertungskategorien der Input- und jeweils elf Kategorien der Outputseite ein Umweltfaktor (EF) berechnet. Für jeden Stoff ist in Sabento zudem auch der Massenindex (MI) ermittelt worden, der aussagt, wieviel kg eines Stoffs pro kg Produkt verbraucht werden. Durch Multiplikation des Umweltfaktors mit dem Massenindex jedes einzelnen Stoffes und anschließender Addition der Werte aller Stoffe der Input- bzw. der Outputseite ergeben sich die Umweltbewertungszahlen für den Input (PEI Input) und Output (PEI Output). Mit einem Wichtungsverhältnis von Input zu Output von 40:60 werden die beiden Werte zu einer Gesamtbewertungszahl (PEI) für einen Prozess zusammengefasst. Diese bezieht sich immer auf die Herstellung von 1 kg Produkt. Bei der Ermittlung des Umweltfaktors (EF) kann jede Bewertungskategorie zusätzlich nach SHE-Kriterien (Safety 13%, Health 27% und Environment 60%) gewichtet werden, so dass sich eine SHE-gewichtete Bewertungszahl ergibt.

Zum Vergleich der Nachhaltigkeit der beiden Verfahren wurden die Software Umberto (Berechnung der Materialflüsse/Kosten) sowie Sabento (Umweltbewertung) (jeweils ifu Hamburg GmbH) eingesetzt. Mit Hilfe einer einfachen, mit wenig Aufwand zu erreichenden Klassifizierung der verwendeten Stoffe nach ihrem Gefährdungspotential für die Umwelt (Abbildung 93) lassen sich durch Sabento kritische Punkte gut identifizieren und daraus fundierte Hinweise zur Optimierung der Nachhaltigkeit der Produktion ableiten (Brinkmann *et al.* 2010).

Die ökologische Betrachtung mit Sabento ergab, dass die verwendeten Stoffe bei beiden Verfahren erneuerbar bzw. nicht limitiert sind und von ihnen vergleichsweise geringe Gefahren für die Umwelt und den Menschen ausgehen. Dies findet seinen Niederschlag in den durch Sabento berechneten Gesamt-Umwelt-Bewertungszahlen von 177 für das enzymatische und 37 für das chemisch-thermische Verfahren (Tabelle 17). Je niedriger hierbei die Umwelt-Bewertungszahl ist, desto umweltfreundlicher ist ein Prozess. Das enzymatische Verfahren erfordert mit einem Abfallindex von 91 gegenüber 77 einen höheren Materialeinsatz und hat dadurch eine höhere Gesamt-Bewertungszahl als das chemische Vergleichsverfahren. Der Wasseranteil am Abfallindex ist hierbei in beiden Verfahren vergleichbar (enzymatisch: 84%, chemisch: 86%).

Tabelle 17: Vergleich des Abfallindex (kg Abfall/ kg Lignin) und der Nachhaltigkeit der beiden Verfahren zur Gewinnung der Ligninfraktion anhand der mit Sabento ermittelten Gesamt-Umwelt-Bewertungszahl (UBZ). Diese Zahl bewertet die für ein Kilo Produkt benötigten/anfallenden Stoffe.

Verfahren	Abfallindex		UBZ
	Mit Wasser	Ohne Wasser	
enzymatisch	91	15	177
Organosolv	77	11	37

Bei der Analyse, welche der im Verfahren verwendeten Stoffe sich besonders negativ auf die Umweltbetrachtung auswirken, fällt beim enzymatischen Verfahren das Ethanol - auch aufgrund der großen zum Ausfällen verwendeten Menge - mit Abstand am stärksten ins Gewicht (Abbildung 92). Ethanol kommt in der Wirkungskategorie thermisches Risiko zum tragen, welche die Zündfähigkeit, Brandgefährdung, thermische Stabilität, Explosionsgefährdung und die Inkompatibilität mit Luft, Wasser und anderen Stoffen

(Biwer 2003) berücksichtigt. Aus ökologischer Sicht ist beim Ethanol das Optimierungspotential des Verfahrens am größten.

Beim chemisch-thermischen Organosolv-Verfahren sind die kritischen Stoffe Ethanol und Schwefelsäure, die beide zur Wirkungskategorie thermisches Risiko beitragen. Schwefelsäure fällt zudem in die Kategorie akute Toxizität, wirkt sich jedoch aufgrund der geringen verwendeten Menge nur gering auf die Gesamt-Umwelt-Bewertungszahl aus.

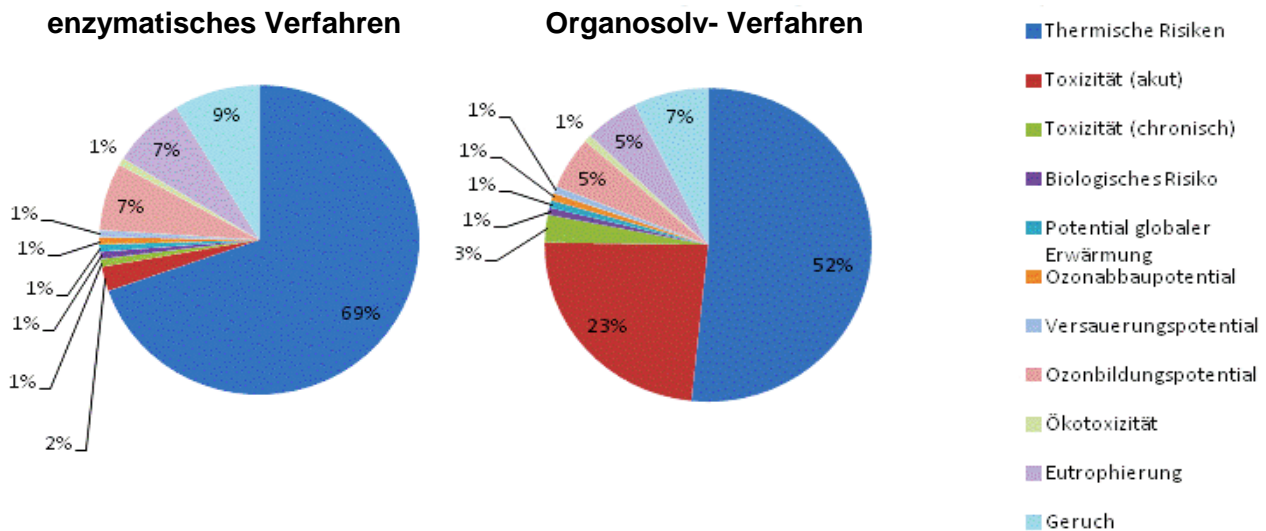


Abbildung 94: Vergleich der Wirkungspotenziale der Wirkungskategorien (Outputseite) auf die Gesamtbewertungszahl

Im Anschluss an die ökologische Betrachtung wurde für beide Verfahren eine ökonomische Betrachtung durchgeführt, wobei aufgrund der hohen Bedeutung der Materialkosten mit 45,4% (Abbildung 95) hierin der Fokus auf die Berechnung der Materialpreise gelegt wird. Die Produktionskosten lassen sich daher näherungsweise über die Verdopplung dieses Wertes abschätzen.

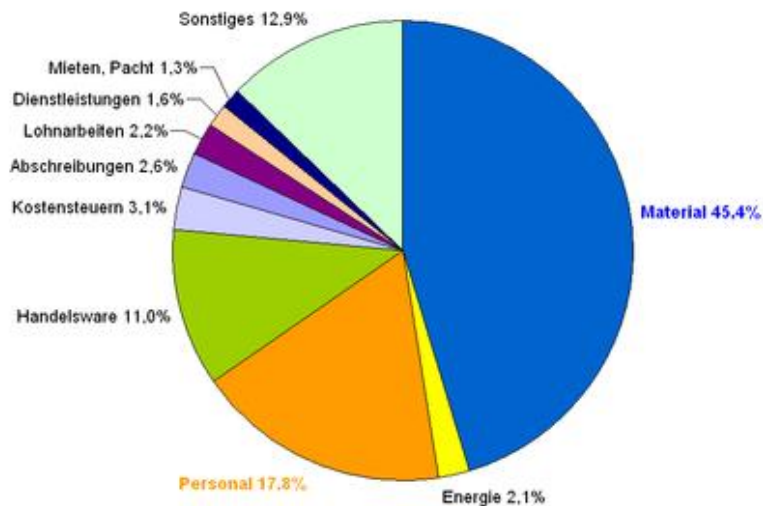


Abbildung 95: Kostenstruktur im verarbeitenden Gewerbe in Deutschland.
Quelle: statistisches Bundesamt 2009

Bei der Gewinnung des reinen Lignins als Hauptprodukt fällt als Nebenprodukt in beiden Verfahren Faserstoff an, der überwiegend aus Cellulose besteht und mit ungebleichtem Zellstoff vergleichbar ist (Tabelle 18). Zusätzlich befinden sich im Permeat nach dem Ausfällen des Lignins nicht unerhebliche Mengen Hemicellulosen. Beim enzymatischen Verfahren wurden dort zusätzlich - bezogen auf die Substratmenge - 5% reduzierende Zucker (davon 1% Glucose) gefunden (2.10.1). Da die realen branchenüblichen Marktpreise für die jeweiligen Substanzen nicht in Erfahrung zu bringen waren, wurde der niedrigste Preis (auch für die Produkte) aus üblichen Chemikalienkatalogen entnommen. Der Preis für das im Moment nicht mehr käuflich zu erwerbende Organosolv-Lignin war zuletzt 110 € pro 100 g (Fluka). Als Erlös für die reduzierenden Zucker wurde der Preis für die entsprechende Menge Glucose veranschlagt. Für das Substrat wurde ein Hackschnitzelpreis von 0,12 € pro kg zugrunde gelegt.

Der Erlös für beide Verfahren ist mit 1108 € (enzymatisch) sowie 1105 € (chemisch) nahezu identisch. Durch die hohen Materialkosten von 356 € beim enzymatischen Verfahren gegenüber lediglich 21 € beim chemisch-thermischen Verfahren fällt hier der Bruttogewinn deutlich niedriger aus. Bei der Zusammensetzung der Materialkosten fällt auf, dass 300 € von 356 €, also 84% dieser Kosten im enzymatischen Verfahren durch die eingesetzten Enzyme verursacht werden. Zusätzlich wird im enzymatischen Verfahren für 1 kg Lignin fast 10x soviel Ethanol verbraucht wie im chemisch-thermischen Verfahren. (Abbildung 96) .

Tabelle 18: Produkte und Erlöse des Holzaufschlusses der beiden Verfahren im Vergleich (Bezugsgröße 1 kg Lignin)

Produkt	enzymatisches Verfahren		Organosolv-Verfahren	
	Menge [kg]	Gewinn [€]	Menge [kg]	Gewinn [€]
Lignin	1	1100	1	1100
Zellstoff ungebleicht	5,35	4	7,22	5
Hemicellulosen	0,7	0	2,62	0
reduzierende Zucker	0,38	4	-	-
Summe Erlös		1108		1105
Summe Materialkosten		-356		-21
Bruttogewinn		752		1084

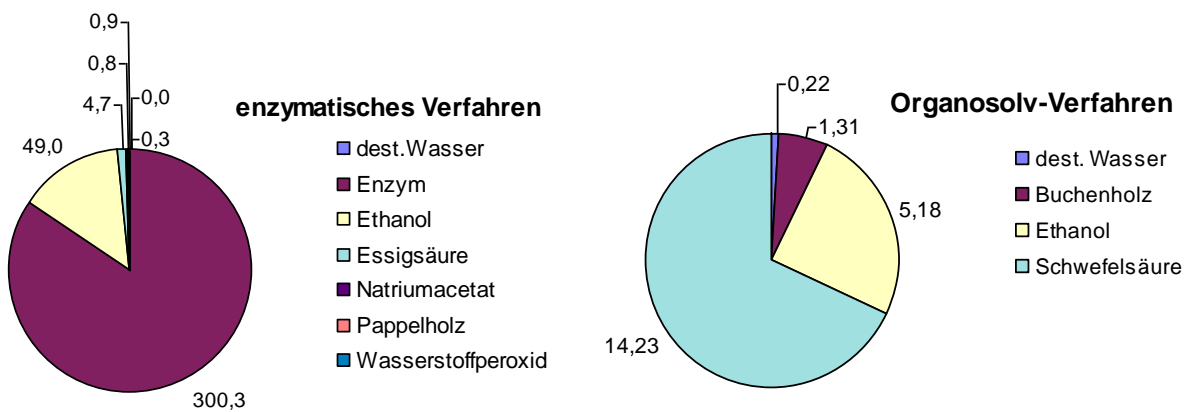


Abbildung 96: Kosten der eingesetzten Materialien zur Gewinnung eines Kilogramms Lignin in Euro

4 Zusammenfassung

Obwohl die Mechanismen der Holzersetzung durch lignocellulolytische Pilzenzyme seit über drei Jahrzehnten intensiv untersucht werden, fehlten bislang systematische Studien zur Analyse des komplexen Sekretoms von Asco- und Basidiomyceten. Mit Abschluss des Projektes stehen nun erstmals umfassende Datensätze zu den Sekretomen des Ascomyceten *Xylaria polymorpha* und des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* bei Kultur auf dem nachwachsenden Rohstoff Rapsstroh zur Verfügung. Wildtypenzyme wurden aus Kulturen beider Organismen präpariert und erfolgreich zur Umsetzung von Modellsubstraten eingesetzt. Mehrere sekretierte Enzyme aus *P. sapidus* wurden in heterologe Wirte kloniert und in aktiver Form exprimiert. Nach abschließender bioinformatischer Auswertung der generierten Daten wurden optimierte Enzymcocktails zum Aufschluss von Rapsstroh eingesetzt und dabei Ligninfraktionen freigesetzt. Über die von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt bewilligten Finanzmittel hinaus haben alle beteiligten Partner das Projekt mit Haushaltsmitteln und der Einbindung von zusätzlichem Personal unterstützt. Auf diese Weise konnten die gesetzten Meilensteine erreicht und darüber hinaus zahlreiche weitere Resultate erzielt werden:

Analysen der extrazellulären Enzyme in Kulturen eines Asco- und Basidiomyceten wurden durchgeführt und ausgewertet. →

Xylaria polymorpha, ein Ascomycet und *Pleurotus sapidus*, ein Basidiomycet wurden submers und emers auf Rapsstroh als Kohlenstoffquelle kultiviert. Während der Kultivierung wurden in beiden Vertretern oxidative und hydrolytische Enzymaktivitäten detektiert.

X. polymorpha produzierte überwiegend Hydrolasen, mit maximalen Aktivitäten von 53 U L^{-1} und Laccasen mit 81 U L^{-1} .

In Kulturen von *P. sapidus* wurden verschiedene Peroxidasen, unter anderem polyvalente Peroxidasen mit bis 8 U L^{-1} detektiert. Daneben wurden Laccasen, Arylalkoholoxidasen, Lipasen und Esterasen detektiert.

Übersichtssekretomanalysen (2D-elektrophoretisch) wurden für beide Pilze durchgeführt und bioinformatisch ausgewertet. →

Das Sekretom (lignolytisches System) zweier Vertreter aus unterschiedlichen Pilzklassen wurde eingehend untersucht. In beiden Kultursystemen wurden relevante enzymatische Aktivitäten nachgewiesen. Im Sekretom von *X. polymorpha* wurden u.a. Laccase-, α -1,2-Mannosidase-, β -1,4-Glucosidase, sowie Esteraseaktivität detektiert. 346 Proteinspots aus

der 2D-elektrophoretischen Trennung wurden massenspektrometrisch analysiert. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden nur zu einem geringen Teil zu bereits sequenzierten Proteinen zugeordnet. Die Analyse der Expressionskinetik der einzelnen Proteinspots ergab zwölf unterschiedliche Expressionsmuster.

Im Sekretom von *P. sapidus* wurden sowohl zahlreiche oxidative als auch hydrolytische Enzyme massenspektrometrisch analysiert und bioinformatisch identifiziert. 214 Proteinspots aus der 2D-elektrophoretischen Trennung wurden massenspektrometrisch analysiert und identifiziert. Ca. 10% der Proteine wurde auf diesem Weg nicht identifiziert. Die in der Probe enthaltenen und identifizierten Proteine gehörten zu 80% der Proteinfamilie der Glycosidasen an. Esterasen und Peptidasen waren mit je 3,4% und Lipasen und Oxidoreduktasen mit je 4,4% vertreten. Identifiziert wurden daneben Lyasen und zelluläre Hilfsenzyme wie zum Beispiel Ubiquitin oder Cyclophilin. Die Analyse der Expressionskinetik der einzelnen Proteinspots ergab sieben unterschiedliche Expressionsmuster.

Nach 12 Projektmonaten standen in Wildtypfermentationen produzierte Enzympräparationen aus den beiden Modellspezies zur Verfügung. →

Durch die Verwendung von großvolumigen Wildtypkulturen (~ 4 - 6 L) und anschließender chromatographischer Reinigung der Enzympräparationen ist es den Projektpartner LCB und IHI Zittau gelungen, sekretierte Proteine aus beiden Modellspezies zu isolieren und zur Umsetzung von Modellsubstraten bereit zu stellen.

Aus dem Sekretom von *X. polymorpha* ist es erstmals gelungen, eine Feruloyl-Esterase eines holzzersetzenden Ascomyceten zu isolieren und charakterisieren. Innerhalb dieses Projektes ist es erstmals gelungen, eine Esterase aus *X. polymorpha* zu charakterisieren, die eine Ester spaltende Hydrolase mit Rhamnosidase-ähnlicher Peptidsequenz darstellt. Darüber hinaus besitzt diese Esterase die katalytischen Eigenschaften einer Naringinase (EC 3.2.1.40); auch dies wurde bisher noch nicht beschrieben. Zusätzlich wurden aus *X. polymorpha* eine Laccase und eine α -1,2-Mannosidase isoliert und charakterisiert.

Aus Sub- und Emerskulturen von *P. sapidus* wurde eine polyvalente Peroxidase isoliert und biochemisch charakterisiert.

Beide Enzyme standen für weitergehende Untersuchungen an Rapsstroh in hinreichenden Mengen zur Verfügung.

Mit diesen Enzympräparaten (polyvalente Peroxidase, extrazelluläre Esterase) wurde die Umsetzung von niedermolekularen Modellverbindungen gezeigt und diese qualitative und quantitative ausgewertet. →

Mit der extrazellulären Esterase aus *X. polymorpha* wurde die Umsetzung von verschiedenen aromatischen Estern und Glykosiden, einschließlich Naringin qualitativ und quantitativ gezeigt. Kinetische Konstanten (K_m/k_{cat}) wurden für die aromatischen Ester umfassend bestimmt. Die Umsetzung von Naringin wurde mittels Chromatographie und MS Analyse nachgewiesen.

Mit der polyvalenten Peroxidase gelang die Umsetzung von Veratrylalkohol (quantitative Oxidation von 0,6 μ mol Substrat in 48 h). Coniferylalkohol wurde nach 6 h vollständig umgesetzt. Reaktionsoptima und kinetische Konstanten (K_m/k_{cat}) wurden für verschiedene Substrate bestimmt.

Klonierung und heterologe Expression in E. coli. →

Die cDNA der Feruloyl-Esterase aus *X. polymorpha* wurde kloniert und das Gen vollständig sequenziert.

Die cDNA einer Arylalkoholoxidase aus *P. sapidus* wurde kloniert und sequenziert. Die heterologe Expression als Fusionsprotein in *E. coli* verlief nach Rückfaltung erfolgreich.

Zwei weitere cDNAs lignolytischer Enzyme aus *P. sapidus* wurden kloniert und sequenziert.

Für die heterologe Expression in *H. polymorpha* oder *T. reesei* wurden folgende Enzyme ausgewählt: eine Esterase, eine polyvalente Peroxidase, eine Dyp-Typ Peroxidase und eine Lipase aus *P. sapidus*.

Heterologe Expression in H. polymorpha. →

Die polyvalente Peroxidase aus *P. sapidus* wurde erfolgreich in *H. polymorpha* kloniert. Für die unterschiedlichen Konstrukte wurden in ungepufferten Medien positive Klone identifiziert.

Es wurden Studien zur heterologen Expression der Esterase 1 aus *P. sapidus* in *H. polymorpha* durchgeführt. Es wurden rekombinante Stämme generiert, bei denen die Gene für sekretorische oder intrazelluläre Varianten dieser Esterase genomisch integriert wurden. Dabei wurden Stämme identifiziert, welche die Esterase 1 intrazellulär exprimieren, wobei das Produkt in der unlöslichen Fraktion vorlag. Für die sekretorische Expression wurden mit vier unterschiedlichen Ansätzen keine stabilen rekombinanten Stämme erzeugt.

Heterologe Expression in T. reesei. →

Die Peroxidase- und Lipase Gene aus *P. sapidus* wurden unter Anwendung der *T. reesei* Codon Nutzung synthetisiert. Die Expression der Peroxidase und Lipase Gene in *T. reesei* RF6651 erfolgte unter der Kontrolle des *cbhl*-Promotors und *cbhl*-Terminators. Die effiziente Enzymproduktion wurde weiter durch Optimierung der Fermentationsprozesse im 0.5-L Fermenter erzielt. Auf dieser Grundlage verlief die Peroxidase Produktion in 30 L Fermenter erfolgreich.

In-vitro Umsetzungen von Rapsstroh, Buchen- und Pappelholz mit heterolog exprimierten Enzymen →

Der synergistische Effekt der katalytischen Aktivitäten verschiedener Pilzenzyme aus *X. polymorpha* bei der Fermentation von Lignocellulose wurde durch die quantitative Bestimmung der einzelnen Holzzucker nachgewiesen. Es wurde deutlich, dass die höchsten Freisetzungen durch Enzymcocktails bewirkt werden, die entweder aus den Hydrolasen XpoFAE & Cell/Xyl (z.B. Glucose 5,5 bzw. 2,8 mg g⁻¹), oder zusätzlich mit der Laccase von *X. polymorpha* (z.B. Glucose 5,9 bzw. 3,6 mg g⁻¹) ergänzt, bestehen. Erwartungsgemäß wurden aus Rapsstroh größere Mengen an Holzzuckern freigesetzt als aus Buchenholz, das mehr Lignin enthält und dadurch schwerer hydrolysierbar ist. Ebenso wurde die Freisetzung von Biomethanol aus den enzymatischen Umsetzungen nachgewiesen. Auch die Freisetzung wasserlöslicher, aromatischer Fragmente aus Holz wurde in diesem Projekt eindeutig gezeigt.

Der synergistische Effekt der katalytischen Aktivitäten verschiedener Pilzenzyme aus *P. sapidus* bei der Fermentation von Lignocellulose wurde durch die quantitative Bestimmung von reduzierenden Zuckern und Phenol nachgewiesen. Die höchste Effizienz wurde bei einer wechselnden Inkubation von hydrolytischen und oxidativen Enzymaktivitäten erreicht. Durch Optimierung der Inkubationsbedingungen wurden ~30% des eingesetzten Rapsstroh in eine lösliche Form überführt. Auch ein Up-scaling der Reaktion um den Faktor 15 wurde erfolgreich durchgeführt.

Ökoeffizienzanalyse →

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in dieser Analyse trotz der 1,5-fach besseren Ligninausbeute des enzymatischen Verfahrens das chemisch-thermische Organosolv-Verfahren aus ökologischer Sicht besser abschneidet. Dies liegt überwiegend am höheren Ethanolverbrauch des enzymatischen Verfahrens. Hierzu ist anzumerken, dass bisher keine Anstrengungen unternommen wurden, das enzymatische Verfahren hinsichtlich des Ethanolverbrauchs zu optimieren, da dies ja ein Ergebnis dieser Analyse ist.

Aus ökonomischer Sicht ist festzustellen, dass die Enzyme im Moment noch 84% der Materialkosten des enzymatischen Verfahrens ausmachen. Es ist davon auszugehen, dass die Enzympreise in den kommenden Jahren weiter sinken werden. Möglicherweise ist das gleiche Ergebnis auch mit dem Einsatz einer deutlich geringeren Enzymmenge und/oder durch eine Verlängerung der Inkubationszeit zu erreichen. Auch dahingehend steht eine Optimierung des enzymatischen Verfahrens bislang aus.

Grundsätzlich setzt die durchgeführte ökologisch-ökonomische Analyse hierbei die Gleichwertigkeit der Produkte voraus – und greift hiermit vermutlich deutlich zu kurz: Das enzymatische Verfahren hat gegenüber dem Organosolv-Verfahren - und insbesondere auch gegenüber allen übrigen chemisch-thermischen Verfahren zum Pflanzenaufschluss einen gar nicht hoch genug einzuschätzenden Vorteil: Sowohl der hierdurch gewonnene Zellstoff als auch das nach der Ligningewinnung verbleibende Permeat sind frei von die Fermentation beeinträchtigenden Salzen (z.B. Sulfaten) und toxischen Stoffen, wie sie bei der chemisch-thermischen Vorbehandlung des Pflanzenmaterials aus Pentosen entstehen (z.B. Furfurale). Dies bedeutet, dass die Nebenprodukte des enzymatischen Pflanzenaufschlusses als C-Quelle vollständig wertschöpfend z.B. zu Bioethanol aus Lignocellulose weiterverarbeitet werden können, sobald die Entwicklung von pentosevergärenden Hefestämmen weit genug vorangeschritten ist. Dies wird bei den Rückständen der chemisch-thermischen Verfahren – zumindest ohne vorherige, aufwändige Abtrennung der Inhibitoren - nicht möglich sein. In Zukunft kann daher ein enzymbasiertes Holzaufschlussverfahren bei der ökoeffizienten, ganzheitlichen Betrachtung deutlich besser abschneiden als heute.

Die Analytik für das komplexe Substrat Rapsstroh wurde etabliert. →

Analytische Verfahren (HPLC-DAD, HPLC-MS, GC-MS, FPLC) zur Charakterisierung der Substrate (niedermolekulare Modellverbindungen, organosolv Lignin, Rapsstroh) und zur Erfassung der Umsetzungsprodukte wurden etabliert (2 Ergebnisse). Ligninfraktionen aus Rapsstroh wurde hergestellt.

5 Geplante Veröffentlichungen

Nghi D. H., Bittner, B. Kellner, H., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Nousiainen, P., Sipilä, J., Huong, L. M., Hofrichter, M., Liers, C. (2011a) A Novel GH 78 Glycoside Hydrolase of the Wood-Rot Ascomycetes *Xylaria polymorpha* Exhibits Feruloyl Esterase Activity and Releases Hydroxycinnamic Acids from Native Lignocelluloses. *In Bearbeitung*

Nghi D. H., Arnstadt, T., Kehraus, S., Ullrich, R., Huong, L. M., Hofrichter, M., Liers, C. (2011b) Synergistic Action of Xylariaceous Hydrolases and Oxidases in Conversion of Rape Straw and Beech Wood Leads to Sugar and Methanol Release. *In Bearbeitung*

Schüttmann I., Bouws H., Zorn H. (2012) Gene Cloning, Purification and Characterisation of a Versatile Peroxidase form *Pleurotus sapidus*. *In Bearbeitung*

Schüttmann I., Wattenberg A., Müllner S., Zorn H. (2012) Secretom Analysis of *Pleurotus sapidus*. *In Bearbeitung*

6 Material und Methoden

6.1 Vorbehandlung des Substrats (Rapsstroh)

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

Zunächst erfolgte eine Aufarbeitung des frischen Strohschnitts durch das IHI Zittau. Ein primärer Zerkleinerungsschritt wurde 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 die Oberfläche des Strohs durch den Mahlprozess vergrößert. Dies verkürzte die Versuchsdauer und erleichterte die Zugänglichkeit der Lignocellulose während des enzymatischen Aufschlusses.

Um unerwünschte mikrobiologische und chemische Abbaureaktionen im gemahlene Stroh während der Lagerung zu vermeiden und eine einheitliche Qualität des Ausgangsmaterials zu gewährleisten, wurde das Stroh zwei Wochen im Trockenschrank 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) chemisch 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.

6.2 Kulturführung

Die Bildung extrazellulärer lignocellulolytischer Enzyme durch holzbesiedelnde Vertreter der Klassen Basidiomyceten (*Pleurotus sapidus*) und Ascomyceten (*Xylaria polymorpha*) wurde während des Wachstums auf Rapsstroh untersucht. Die Pilze wurden dazu submers in einem Minimalmedium kultiviert (Abbildung 97). Die besondere Eignung dieses Mediums bezüglich der Biomassebildung und der Enzymsekretion in Gegenwart lignocellulosehaltiger Substrate wurde in Voruntersuchungen ermittelt (Zorn *et al.* 2005). Das verwendete Medium enthielt 2% gemahlene Rapsstroh (Partikeldurchmesser 2 - 4 mm) und war wie folgt zusammengesetzt:

Minimalmedium (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 Biomassenbildung und Enzymsekretion durch die Pilzstämmen ist eine wesentliche Voraussetzung für einen optimalen enzymatischen Aufschluss des Substrates. Die Flüssigmedien (100 mL) wurden jeweils mit 10 mL Pilzhomogenisat inokuliert und bei 24 °C und 100 rpm geschüttelt (in Doppelbestimmungen). In Abhängigkeit von der Entwicklung der Pilzbiomasse wurden in regelmäßigen Abständen Proben (1 - 2 mL) entnommen, um den pH-Wert und die Enzymaktivitäten zu bestimmen. Für die Emerskulturen wurden 40 g geschnittenes Stroh (steril) mit 60 mL Wasser und 40 mL Pilzhomogenisat inokuliert und bei 24 °C in Doppelansätzen dunkel inkubiert.



Abbildung 97: Kulturen von *P. sapidus* auf Rapsstroh (oben, submers und emers); Submerskultur von *X. polymorpha* auf Rapsstroh (unten).

6.3 Gewinnung und Anreicherung extrazellulärer Proteine

Die Gewinnung der extrazellulären Enzyme der beiden holzzeretzenden Pilze für die Sekretomanalytik erfolgte aus den o.g. Submerskulturen. 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 3, 6, 9, 12) wurde der Kulturüberstand aus jeweils zwei Kolben geerntet. 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 Proteinfällung (Wessel und Flügge 1984) wurden die Proteine in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, getrocknet und bei -20 °C gelagert (Abbildung 98).

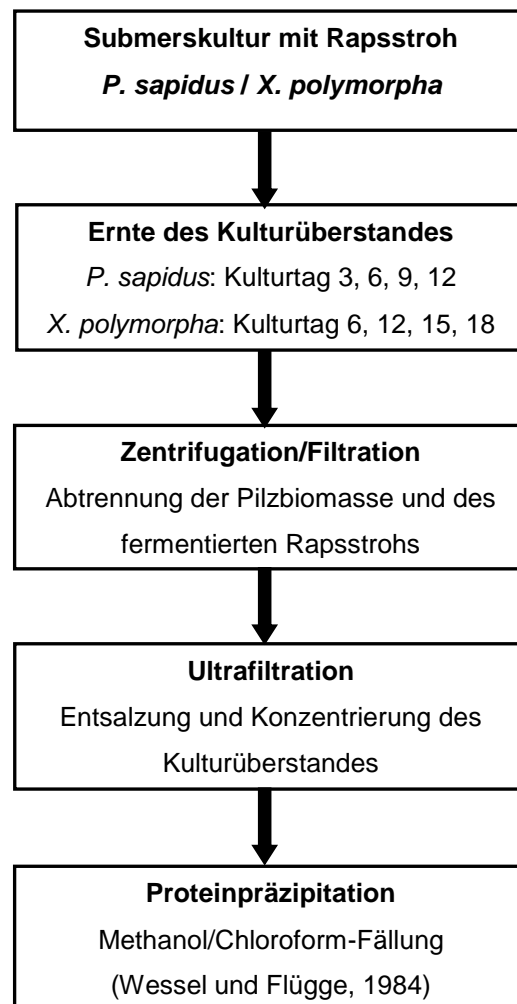


Abbildung 98: Schema zur Gewinnung und Anreicherung extrazellulärer Proteine aus Submerskulturen.

Die quantitative Erfassung der Proteinmengen im Kulturüberstand erfolgte mittels Bradford-Assay (Bradford 1976); am IHI Zittau wurde eine modifizierte Methode nach Bradford in 96-Loch-Mikrotiterplatten eingesetzt (Zor und Selinger 1997). Die Aufarbeitung der Emerskulturen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils in Doppelbestimmung. In Abständen von zwei Wochen (*P. sapidus*: Kulturwochen 4, 6, 8, 10,12) wurden jeweils zwei Kolben geerntet. Hierzu wurde den Kulturen 150 mL 50 mM Tris/Maleinsäurepuffer pH 6,0 (Pant und Adholeya 2007) zugefügt und 1 Stunde bei 24 °C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme für 10 min mittels Ultraschall extrahiert.

6.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten

6.4.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten: *P. sapidus*

Kulturbegleitend wurden verschiedene Enzymassays durchgeführt, wobei hydrolytische und oxidative Aktivitäten erfasst wurden (Tabelle 19). Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte bei 30 °C in einem 50 mM Natrium-Acetat Puffer pH 3,5.

Tabelle 19: 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)
Mn-Peroxidase	Syringol/Mn ³⁺ /H ₂ O ₂	Chinondimer	(Wariishi <i>et al.</i> 1992)
Polyvalente Peroxidase	β -Carotin/H ₂ O ₂	β -Carotinabbauprodukte	(Zorn <i>et al.</i> 2003)
Lipase	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat	<i>p</i> -Nitrophenol	(Winkler und Stuckmann 1979)
Esterase	<i>p</i> -Nitrophenylacetat	<i>p</i> -Nitrophenol	(Purdy und Kolattukudy 1973)
Arylalkoholoxidase	Veratrylalkohol	Veratraldehyd	(Tien und Kirk 1984)

6.4.2 Bestimmung der Enzymaktivität: *X. polymorpha*

Die Messung der Esterase-Aktivität erfolgte mittels Ferulasäure-Methylester, welcher zu Ferulasäure und Methanol hydrolysiert wird ((Faulds *et al.* 1997, Mathew und Abraham 2005). Die Produktbildung bzw. die Abnahme der Substratkonzentration wird mittels HPLC (Detektion bei 323 nm) verfolgt. Der Inkubationsansatz ist wie folgt zusammengesetzt:

MOPS-Puffer (pH 6,0)	100 mM
Ferulasäure-Methylester	1,0 mM
Enzymlösung	10 - 50 μ L

6.5 Proteinbiochemische und massenspektrometrische/kinetische Untersuchungen

6.5.1 2D Gelelektrophorese

Die gefällten Überstände der Submerskulturen (Wessel und Flügge 1984) wurden mittels Ultraschall in Gegenwart von Proteaseinhibitoren und 50 mM 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (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 bei 22.600 g bei 25 °C 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 2 - 4 versetzt.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgt nach einem modifizierten Protokoll (Klose 1999 modifiziert) unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen (NEPHGE) (Weingarten *et al.* 2005) unter Verwendung von 40 cm Röhrchengelen (9 M Harnstoff, 3,5% Acrylamid, 0,3% Bis-Acrylamid, 4% Trägerampholyte 2 - 11).

Nach Abbruch der Fokussierung wurden die IEF Gele auf SDS Gele (0,75 x 250 x 300 mm, 15% Acrylamid, 0,2% Bis-Acrylamid) gelegt und anschließend in einem kontinuierlichen Puffersystem (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS) nach ihrem apparenten Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Fixierung der getrennten Proteinspots dienten 50% Methanol und 2% Phosphorsäure; anschließend wurden die Proteine mittels Colloidal Coomassie gefärbt (Neuhoff *et al.* 1988). Die Bildanalyse wurde mit der Delta2D Software durchgeführt (Definiens, Deutschland).

6.5.2 Proteinidentifizierung

Nach dem Ausstechen der Proteinspots wurden die Gelstücke gewaschen und mit Trypsin versetzt. Nach Inkubation über Nacht wurde die generierten Peptide mittels 0.1% TFA extrahiert. Die Peptide wurden über eine Umkehrphasensäule (ZipTip™, Millipore, Bedford, MA, USA) gereinigt, bevor sie auf ein MALDI Target aufgegeben wurden. Als Matrix diente α -Cyanohydroxymethylsäure. 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 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™) (Chamrad *et al.* 2003).

6.6 Reinigung Extrazellulärer Enzyme

6.6.1 Reinigung der polyvalenten Peroxidase aus *P. sapidus*

Der Überstand von *P. sapidus* (Enzyminduktion: Minimalmedium, Substrat: Rückstand Biogasanlage, Kulturdauer: 8 Tage) mit der höchsten Aktivität der polyvalenten Peroxidase wurde konzentriert ($F = 30$). Das Konzentrat wurde auf den HIC Puffer B (Tabelle 20) umgepuffert und der Lösung 1 M Natriumchlorid zugefügt. Die Reinigung erfolgte über drei Stufen (Zorn *et al.* 2003, modifiziert). Die aktiven Fraktionen der vorherigen Stufe wurden jeweils gesammelt und umgepuffert. Der zweite Reinigungsschritt erfolgte über einen schwachen Anionentauscher und im dritten Schritt wurde eine Gelfiltration durchgeführt.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Bedingungen für die chromatographische Reinigung der polyvalenten Peroxidase.

Bedingungen	HIC	DEAE	Gelfiltration
Säulenmaterial	HiPrep Phenyl FF high sub	HiPrep DEAE FF	Superdex 200 10/300
Fluss	4 mL min ⁻¹	4 mL min ⁻¹	0,5 mL min ⁻¹
Puffer A	7 mM Citronensäure; 6 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 3,5; 1M Natriumchlorid	7 mM Citronensäure; 6 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 4,5	35 mM Citronensäure; 30 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 3,5; Je 0,3 µmol L ⁻¹ :
Puffer B	7 mM Citronensäure; 6 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 3,5	7 mM Citronensäure; 6 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 3,0	Fe(II)SO ₄ ; ZnSO ₄ ; Mn(II)SO ₄ ; Cu(II)SO ₄
Anzahl der Läufe	25	4	3
Anzahl d. ges. Fraktionen	34 a 4 mL	48 a 4 mL	110 a 0,5 mL
Gradient	20 min 100% A in 2 min auf 100% B 35 min 100% B	25 min 100% A in 2 min auf 100% B 65 min 100% B	110 min 100% A

6.6.2 Reinigung der Feruloyl-Esterase aus *Xylaria polymorpha*

Während des enzymatischen Aufschlusses von lignocellulosehaltigen Substraten wie z.B. Buchenholz, Weizen- oder Rapsstroh wurde die Bildung einer extrazellulären Feruloyl-Esterase (bis zu 60 U L^{-1}) durch den holzzersetzenden Ascomyceten *Xylaria polymorpha* erstmals beobachtet.

Die Gewinnung größerer Mengen dieses Enzyms erfolgte aus Kulturen auf Rapsstroh. Dazu wurden 200 g lufttrockenes, zerkleinertes Stroh mit 800 mL Leitungswasser versetzt, 30 min bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ sterilisiert und mit 25 mL homogenisiertem Impfmateriale inokuliert. Nach ca. 4 Wochen Inkubation bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Kultur geerntet und in ein passendes Plastikgefäß (10 Liter) überführt.

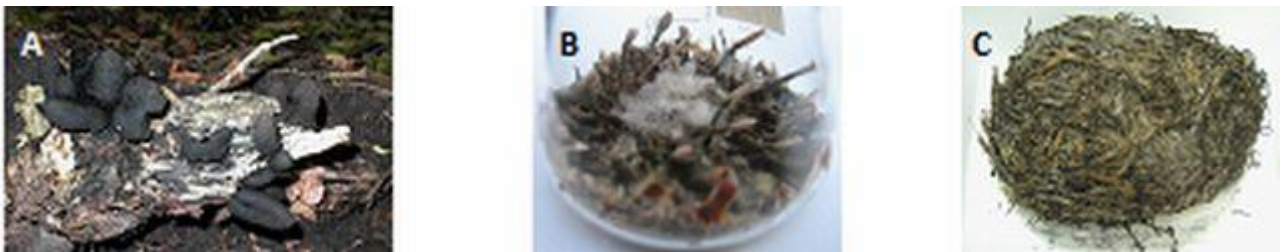


Abbildung 99: Fruchtkörper von *Xylaria polymorpha* (A) in seinem natürlichen Habitat auf einem morschen Buchenholzstamm; (B) in einer Reinkultur im Labormaßstab auf Rapsstroh und (C) während der Enzymproduktion mittels Fermentation von Rapsstroh.

Zur Extraktion des Enzyms wurde das Stroh mit 6.000 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ versetzt, sorgfältig gemischt und für 3 h bei $11 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Rotationsschüttler (Certomat, BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL GmbH, Melsungen) bei 100 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der dekantierte wässrige Extrakt über einen Glasfaserfilter (GF6, WHATMAN, Dassel) gegeben und von gröberen Partikeln befreit (Liers *et al.*, 2007)

Die Reinigung der Feruloyl-Esterase erfolgte mittels FPLC (Ionenaustausch- bzw. Größenausschluss-Chromatographie). Die Elution der Feruloyl-Esterase an einem schwachen Anionenaustauscher erfolgte mit einem linearen Gradienten des Fließmittels B von 0 auf 70% (1,4 M NaCl) innerhalb von 10 Säulenvolumina (SV). Die Elution der Esterase wurde mittels eines Gradienten von 0 auf 40% (0,8 M NaCl) innerhalb von 10 SV realisiert. Das für die SEC-FPLC verwendete Fließmittel enthielt 0,1 M NaCl in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 6,5). Die Trennung erfolgte über 90 min bei einem isokratischen Fluss von 1 mL min^{-1} und einer Fraktionsgröße von 2 mL. Der letzte Reinigungsschritt erfolgte an einem starken Anionenaustauscher mit einem linearen Gradienten des

Fließmittels B von 0 auf 40% (0,4 M NaCl) innerhalb von 30 SV. Die aktiven Fraktionen des Enzyms wurden vereinigt und gegen 10 mM Natriumacetatpuffer dialysiert.

6.7 Enzymatische Umsetzungen

6.7.1 Zellfreie Umsetzung von Modellsubstraten mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *P. sapidus*

Die gereinigte polyvalente Peroxidase wurde für die Untersuchungen zum zellfreien Aufschluss (*in vitro*) von Lignin-Modellsubstraten verwendet. Analytisch begleitet wurden die Umsetzungen durch das Institut für Pharmazeutische Biologie, Bonn. Die Bestimmung des Umsetzungsgrades erfolgte mittels HPLC-DAD.

Jeder Assay enthielt 0,1 mg mL⁻¹ der Modellsubstanz, 0,8 mU der gereinigten polyvalenten Peroxidase, 2 mM Wasserstoffperoxid in 50 mM Natrium-Acetatpuffer (pH 4,5). Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 500 rpm im Inkubationsschüttler (Eppendorf). In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und mittels HPLC-DAD untersucht. Analog zur gereinigten Peroxidase wurden die Überstände von *P. sapidus* unverdünnt eingesetzt.

6.7.2 Zellfreie Umsetzungen von Substraten mit gereinigter Esterase aus *X. polymorpha*

Jeweils 3 g des feingemahlene Substrates wurden in einem Gesamtvolumen von 30 ml in Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 6.0) 72 h bei 23 °C auf einem Rotationsschüttler bei 200 rpm inkubiert und geschüttelt. Es wurden Einzelumsetzungen mit den jeweiligen Enzymen durchgeführt; d.h. jeweils Ansätze mit ausschließlich Esterase (*XpoFAE*), Laccase (*XpoLac*) sowie dem Enzymcocktail von AB Enzymes (Cell/Xyl) und Kombinationsumsetzungen mit jeweils allen Enzymen (*XpoFAE*; Cell/Xyl; *XpoLac*) bzw. ausschließlich den Hydrolasen (*XpoFAE*; Cell/Xyl). Zu Vergleichszwecken dienten Kontrollen mit entsprechendem Substrat und entweder denaturierten Enzymen (95°C; 30 min) und jeweils einer Kontrolle ohne Enzyme. Anschließend wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert (12.000 g), der Überstand abgenommen, eingefroren (-20°C) und für entsprechende Analysen bezüglich freigesetzter Metabolite (z.B. „Holzzucker“) verwendet.

6.7.3 Umsetzungen von Lignin organosolv durch eine Dyp-Typ Peroxidase

Je 12 mg Lignin (organosolv) wurden in 1 mL 30% EtOH über Nacht bei 20 °C suspendiert. Das ungelöste Lignin wurde bei 21.000 g für 10 min abzentrifugiert und der

Überstand (Probe Ü) entnommen. Das Lignin wurde nochmals mit 1 mL 30% EtOH (Probe L) überschichtet. In je drei Proben des Überstands und des Lignins wurden verschiedene pH-Werte mit Essigsäure bzw. Na-Acetat eingestellt. Eine Blindprobe enthielt Enzym aber kein H₂O₂, eine zweite die Startkonzentration an H₂O₂ aber kein Enzym. Die H₂O₂-Konzentration wurde kontinuierlich gemessen, wenn kein H₂O₂ mehr vorhanden war, wurde 1 µmol H₂O₂ zugefügt. Nach 6 h war noch H₂O₂ vorhanden, so dass die Inkubation über Nacht ohne weitere H₂O₂-Zugabe weiter geführt wurde. Zum Inaktivieren des Enzyms wurden 50 µL einer 0,5 M EDTA Lösung zugegeben.

6.7.4 In-vitro Umsetzungen von Rapsstroh und Pappelholz mit isolierten Enzymen

Jeder Ansatz der „*in vitro*“-Umsetzungen enthielt 100 mg mL⁻¹ feingemahlene Rapsstroh (~3 mm) in 50 mM Natrium-Acetatpuffer pH 3,5, pro Ansatz wurden 2 g Substrat verwendet. Von den Enzymen wurden 50 U pro Ansatz verwendet, von der Cellulase wurden 10 U eingesetzt. Bei Peroxidasen wurde eine Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,5 mM während des gesamten Versuchs eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen und 150 rpm im Wasserbad. Bei den Inkubationen wurden die Ansätze alle 24 Stunden zentrifugiert, das Pellet zweimal mit Reinstwasser gewaschen und erneut Enzym, Puffer und eventuell Wasserstoffperoxid zugefügt. Die gesamte Versuchsdauer betrug 3-4 Tage. Alle Überstände wurden gesammelt und der Phenolgehalt sowie der Glucosegehalt bestimmt.

6.7.5 Upscaling der in-vitro Umsetzungen

Für die Maßstabvergrößerung wurden 500 U je Enzym (Cellulase 100 U) und die 15fache Menge an Substrat eingesetzt. Zusätzlich zum Rapsstroh wurde in diesem Versuch noch fein gemahlene Pappelholz (2 mm) verwendet. Pro Gramm Substrat wurden 10 mL 50 mM Na-Acetat-Puffer pH 3,5 eingesetzt.

Die Enzyme wurde jeweils einzeln für 24 Stunden bei 40 °C inkubiert, der Feststoff nach jeder Inkubation abgetrennt (Filtration) und die Enzyme durch Ultrafiltration (MWCO 30 kDa) rückgewonnen. Das Permeat wurde im nächsten Schritt mit neuem Enzym versetzt und erneut mit dem Feststoff der vorherigen Inkubation inkubiert. Dem Ansatz der Peroxidase enthielt, wurde noch 0,5 mM Wasserstoffperoxid zugefügt und die Zugaben alle zwei Stunden wiederholt.

6.7.6 Reduzierende Zucker (Bailey 1988)

Zur Herstellung der Glucose-Kalibrierreihe wurden 0,18 g Glucose in 100 mL 0,01 M Natriumcitratpuffer pH 4,8 gelöst und Verdünnungen im Bereich von 1 bis 4 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ angesetzt.

Zur Herstellung der Dinitrosalicylsäure(DNS)-Stopplösung wurden 80 g Natriumhydroxid (4 mol L^{-1}) und 112 g Kaliumhydroxid (4 mol L^{-1}) in Reinstwasser gelöst und auf 500 mL aufgefüllt. 5,0 g Dinitrosalicylsäure wurden in 300 mL Reinstwasser bei 50 °C gelöst und tropfenweise 50 mL Natrium/Kalium-Hydroxid-Lösung hinzugefügt. Zusätzlich wurden 150 g Natrium-Kalium-Tartrat (Rochelle Salz) zugefügt und nach Abkühlung mit Reinstwasser auf 500 mL aufgefüllt. Die Lösung war bei Raumtemperatur im Dunklen über 3 Monate haltbar.

Für die Messung wurden 360 μL 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 4,8 mit 40 μL Kulturüberstand versetzt, und 600 μL DNS-Lösung wurden zugegeben, gemischt und 5 Minuten gekocht. Nach exakt 5-minütiger Abkühlung auf Eis wurde die Extinktion spektrophotometrisch bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ bestimmt.

Die ermittelten Extinktionswerte der Proben wurden mit einem Blindwert korrigiert. Hierzu wurde der Überstand vor der Reaktion durch zwanzig-minütiges Kochen inaktiviert. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mittels einer Kalibriergeraden.

6.7.7 Gesamtphenolgehalt (Gutfinger 1981)

Die Quantifizierung der Gesamtphenole erfolgte mittels Folin-Ciocalteu Reagenz und einer Natriumcarbonatlösung. Phenole wurden so zu einem blauen Farbstoff umgesetzt.

Der Ansatz

80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5	50 μL
Folin-Ciocalteu Reagenz (Merck, 1.09001.0100) 1:4 verdünnt	65 μL
Kulturüberstand	50 μL

wurde für 3 Minuten inkubiert, und

gesättigte Natriumcarbonatlösung 3:4 verdünnt 90 μL zugefügt.

Der Ansatz wurde für 1 Stunde inkubiert und die Extinktion bei $\lambda = 725 \text{ nm}$ bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Kalibriergerade. Es wurde Gallussäure im Konzentrationsbereich von 1 bis 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ verwendet.

6.7.8 Glucosegehalt

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte enzymatisch im Spektralphotometer, als Referenz wurde Reinstwasser verwendet.

Herstellung der Salzlösung (20fach konzentriert):

NADP	200 mg
ATP	140 mg
Magnesiumsulfat	150 mg

Die Salze wurden in 20 mL 1 M TRIS/HCl Puffer pH 7,6 gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Herstellung der Enzymlösung (20fach konzentriert):

Hexokinase 449 U mg ⁻¹	1,1 mg
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase 158 U mg ⁻¹	3 mg

Die Enzyme wurden in 20 mL 0,05 M TRIS/HCl Puffer pH 7,6 gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Versuchsansatz:

Salzlösung	50 µL
Probe oder Reinstwasser	900 µL

Die Extinktion (Nullwert der Probe) wurde bei $\lambda = 340$ nm bestimmt und

Enzymlösung	50 µL
-------------	-------

hinzugefügt. Der Versuchsansatz wurde für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion (Messwert 1) bei $\lambda = 340$ nm bestimmt. Als Blindwert wurde Reinstwasser eingesetzt.

Berechnung:

$$\Delta E_{340 \text{ nm}} = (\text{Messwert 1} - \text{Nullwert})_{\text{Probe}} - (\text{Messwert 1} - \text{Nullwert})_{\text{Blindwert}}$$

$$c = \frac{\Delta E_{340 \text{ nm}} \cdot V_{\text{gesamt}} \cdot F \cdot \text{MW}}{V_{\text{Kulturüberstand}} \cdot \epsilon_{\text{NADPH}340 \text{ nm}} \cdot d \cdot 1000}$$

$$c = [\text{g L}^{-1}]$$

$$V_{\text{gesamt}} = 1,0 \text{ mL}$$

$$V_{\text{Kulturüberstand}} = \text{variabel, maximal } 900 \text{ µL}$$

$$d = 1,0 \text{ cm}$$

$$\epsilon_{\text{NADPH, } 340 \text{ nm}} = 0,0063 \text{ L µmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$F = \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{MW} = \text{Molekulargewicht von Glucose } 180,16 \text{ g mol}^{-1}$$

6.7.9 HPLC Analytik der Umsetzungen

Zur Probenvorbereitung wurden die Enzyme aus den Ansätzen mittels Ultrafiltration (Pall, Nanosep® 10 kDa cut-off) abgetrennt. Zur Trennung der Produkte an einer CC125/3 Nucleosil 100-5 RP Säule (Macherey & Nagel) diente ein Acetonitril/Wasser Gradient (5% ACN, 95% Wasser auf 95% ACN, 5% Wasser in 20 min, 5 min halten, zurückspülen zu 5% ACN, 95% Wasser in 5 min, 5 min equilibrieren); das Injektionsvolumen betrug 10 µL. Substratumsetzung bzw. Produktbildung wurden bei 230, 270 und 310 nm verfolgt.

6.7.10 HPSEC

Die Molekulargewichtsverteilung wässriger Strohextrakte wurde mittels einer speziellen HPLC-Methode untersucht (Hofrichter *et al.* 1999a, Hofrichter *et al.* 1999b). Die Analyse erfolgte unter Verwendung einer linearen HEMA-Bio-Säule (Polymer Standard Service, Mainz, Deutschland). Der Messbereich des DAD wurde auf 200 bis 500 nm eingestellt. Die mobile Phase bestand aus 20% Acetonitril und 80% eines wässrigen Puffers (0,34% NaCl, 0,2% K₂HPO₄, pH 10), der die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen minimieren sollte (Hofrichter und Fritsche 1997, Hofrichter *et al.* 2001); die Flussrate betrug 1 mL min⁻¹. Die Säule wurde mit verschiedenen Natriumpolystyrolsulfonaten als Molekulargewichtsstandards (*sodium polystyrene sulphonates*, 0,8 - 150 kDa, Polymer Standard Service, Mainz, Deutschland) kalibriert (Hofrichter und Fritsche 1997).

6.7.11 LC/MS-Messungen

Für die LC/MS- Analysen wurde zunächst eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt, um Salze und Enzyme vor der Analyse zu entfernen. Dafür wurde zu den wässrigen Proben jeweils die doppelte Menge an Ethylacetat zugegeben. Die Proben wurden 10 min auf einem Schüttler gemischt und anschließend für 5 min bei 3.000 g zentrifugiert. Danach wurde die organische Phase entnommen und unter Stickstoff zur Trockene eingedampft. Anschließend wurden die Proben in Methanol gelöst, um eine Konzentration von 1 - 5 mg mL⁻¹ zu erhalten. Als Laufmittel wurden Methanol und Wasser in LC/MS-Qualität verwendet. Beiden Laufmitteln wurden entweder 2 mM NH₄Ac (Sigma-Aldrich) oder 1% Ameisensäure (Merck) zugesetzt. Für die Chromatographie wurde eine Nucleodur 100-5 (125 mm x 2 mm) C18-Säule der Firma Macherey-Nagel verwendet. Bei der HPLC-Anlage handelte es sich um ein Gerät der Firma Agilent der Serie 1100, beim Triple Quadrupol Massenspektrometer API2000 um ein Gerät von Applied Biosystems. Die LC/MS-Methode zur Messung der Umsetzungen der Modellverbindungen von Lignin beinhaltet einen Scanlauf im Massenbereich m/z = 150 – 700. Im Falle von Lignin Organosolv wurde im

einem Massenbereich von $m/z = 200 - 1600$ gemessen. Die Declustering Potentiale (DP) betragen + 40 Volt bzw. – 50 Volt. Die weiteren Parameter waren in beiden Modi gleich (Tabelle 21).

Tabelle 21: Parameter zur LC/MS-Messung

Parameter	
Curtain gas (CUR)	40 V
Ion Spray (IS)	-4200 V
Temperature (TEM)	400 °C
Ion source gas 1 (GS1)	30 V
Ion source gas 2 (GS2)	60 V
Focussing Potential (FP)	-360 V
Entrance Potential (EP)	-12 V

Die Flussrate betrug $250 \mu\text{L min}^{-1}$ und das Injektionsvolumen betrug $10 \mu\text{L}$.

6.7.12 GC/MS-Messungen

Für die GC/MS-Analysen wurde zunächst eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt, um Salze und Enzyme vor der Analyse zu entfernen. Dafür wurde zu den wässrigen Proben jeweils die doppelte Menge an Ethylacetat zugegeben. Die Proben wurden 10 min auf einem Schüttler gemischt und anschließend für 5 min bei 3.000 g zentrifugiert. Danach wurde die organische Phase entnommen und unter Stickstoff zur Trockene eingedampft. Für die GC/MS-Analyse wurden die Proben nach dem Einengen mit $50 \mu\text{L}$ BSTFA versetzt und 30 Minuten bei 70 °C gehalten. Die gaschromatographische Trennung erfolgte an einer PE-1-Säule ($30 \text{ m} \times 0,32 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$, Perkin Elmer). Für die Messungen kam ein GC/MS-Gerät der Firma Perkin Elmer mit einem „Turbo Mass“-Massenspektrometer zum Einsatz.

6.7.13 NMR/ MALDI-TOF Messungen

Die NMR-spektroskopischen Experimente wurden in Aceton- d_6 und Dimethylsulfoxid (DMSO)- d_6 der Firma Deutero GmbH durchgeführt. Die Messungen wurden an einem Bruker Avance 300-DPX Spektrometer bei einer Messfrequenz von 300 MHz (^1H) und 75 MHz (^{13}C) durchgeführt.

Für die MALDI-TOF-Messungen wurde α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA) der Firma Sigma-Aldrich als Matrix verwendet. Bei dem MALDI-TOF Messgerät handelt es sich um ein Voyager STR-DE der Firma Applied Biosystems.

6.8 Synthese von Adlerol

Folgende Syntheseroute führte über vier Schritte (Abbildung 100) zur gewünschten Verbindung 1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)-propan-1,3-diol. Als Ausgangsprodukte wurden Chloressigsäure **6** und Guajacol **7** verwendet, welche kommerziell erhältlich sind.

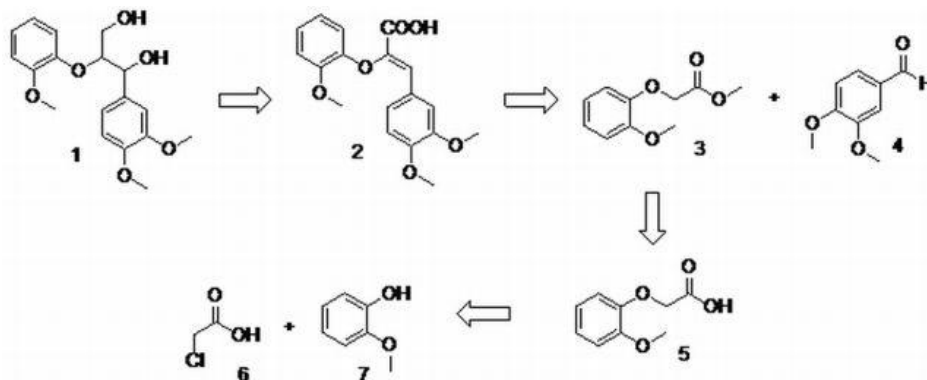


Abbildung 100: Retrosyntheseroute zur Darstellung der Verbindung 1.

Im ersten Schritt wurde Verbindung **5** mittels nucleophiler Substitution erzeugt (Abbildung 101). **6** und **7** wurden in Wasser mittels NaOH zu Verbindung **5** umgesetzt. Nach einer Säure-Base-Wäsche wurde das Produkt sauber und in guter Ausbeute (80%) erhalten.

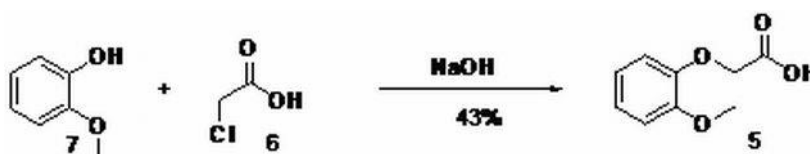


Abbildung 101: Darstellung der Verbindung 5.

Im zweiten Schritt musste die Carbonsäure säurekatalysiert in Methanol verestert werden (Abbildung 102). Dabei wurde H_2SO_4 als Katalysator verwendet. Das Produkt wurde ebenfalls mittels Säure-Base-Wäsche gereinigt. Der Methyl ester **3** wurde mit einer Ausbeute von 88% synthetisiert.

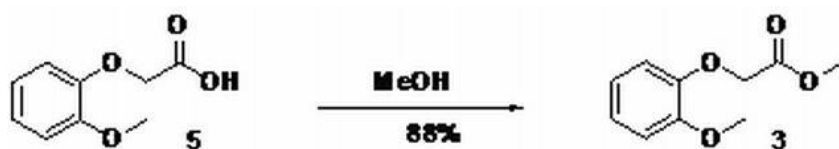


Abbildung 102: Darstellung der Verbindung 3.

Verbindung **2** wurde mit Hilfe einer Claisen-Reaktion hergestellt (Abbildung 103). Der Ester **3** wurde mit Dimethoxybenzaldehyd **4** und NaH in Toluol umgesetzt. Das Alken **2** wurde mit 43%iger Ausbeute synthetisiert.

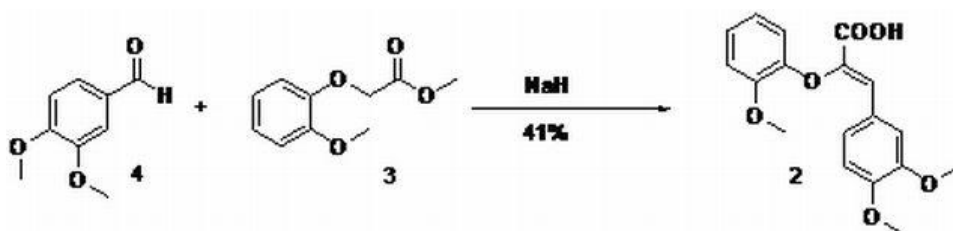


Abbildung 103: Darstellung der Verbindung 2.

Adlerol (**1**) wurde mittels Hydroborierung mit B_2H_6 , H_2O_2 und NaOH aus der Verbindung **2** als Diastereomerengemisch mit 35%iger Ausbeute dargestellt (Abbildung 104).

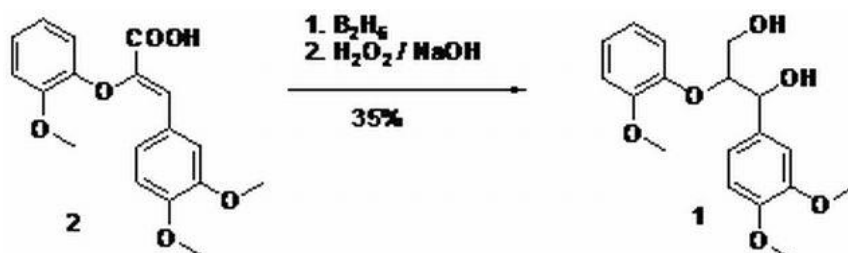


Abbildung 104: Darstellung der Verbindung 1.

Abbildung 105 zeigt das Massenspektrum von Adlerol. Die hochaufgelöste Masse von Adlerol stimmt mit dem berechneten Wert ($M + Na^+ = 357,1309$) gut überein. Das Nebenprodukt mit der Masse $m/z = 339,1201$ wurde mittels Säulenchromatographie abgetrennt.

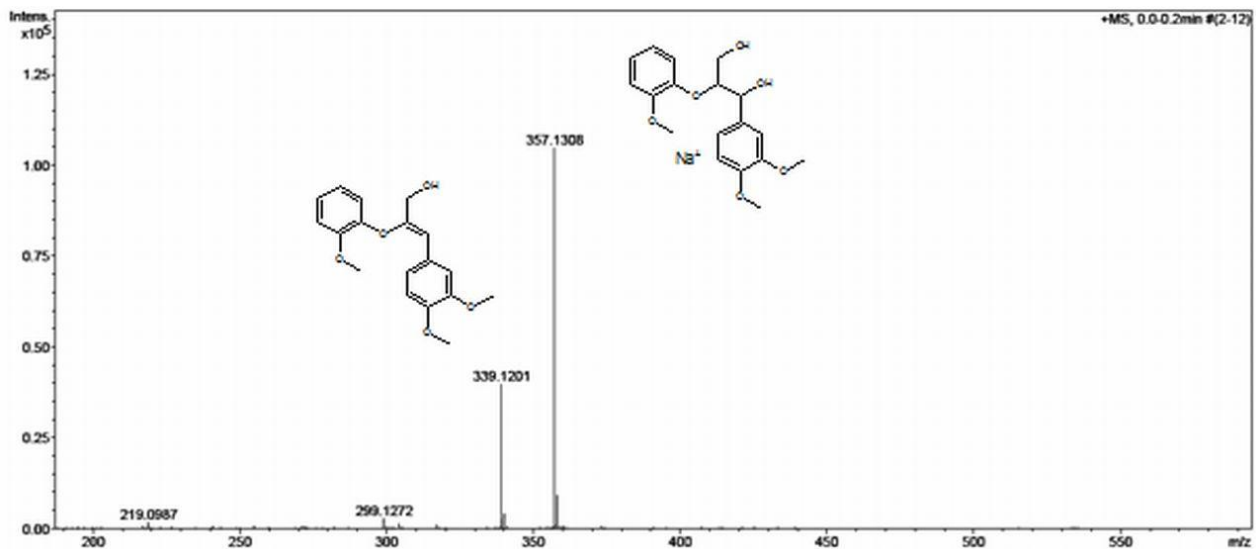


Abbildung 105: Massenspektrum von Adlerol in Hochoauflösung

6.9 Klonierung verschiedener Enzyme aus *P. sapidus*

6.9.1 Isolierung der Gesamt-RNA

Die Kulturen wurden 18 Tage inkubiert. Das Myzel wurde 3x mit destilliertem Wasser gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C eingefroren. Der Zellaufschluss erfolgte durch Mörsern des gefrorenen Myzels (ca. 100 mg) unter flüssigem Stickstoff. Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde das „RNeasy®Plant Mini Kit“ (Qiagen) verwendet.

6.9.2 Primerableitung

Die Primer für die Amplifizierung der Gesamtsequenz der AAO wurden von den AAO-DNA-Sequenzen der nahen Verwandten *P. eryngii*, *P. pulmonarius* und *P. ostreatus* abgeleitet. Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass das amplifizierte Fragment sowohl das Start- als auch das Stopcodon der AAO enthielt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Primer zur Amplifizierung der Gesamtsequenz der AAO.

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Schmelztemperatur [°C]
AAO1 for 58	5'-ATGTCGTTTAGTGCACTTCG-3'	58
AAO2 rev 58	5'-ATCATATTGAATTGAAAGACTAC-3'	58

Die Primer für die Amplifizierung der Gesamtsequenz der GDS(L)-Lipase wurden von einer DNA-Sequenz für eine GDS(L)-Lipase des nahen Verwandten *P. ostreatus* abgeleitet. Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass das amplifizierte Fragment sowohl das Start- als auch das Stopcodon der GDS(L)-Lipase enthielt (Tabelle 23).

Tabelle 23: Primer zur Amplifizierung der Gesamtsequenz einer GDS(L)-Lipase

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Schmelztemperatur [°C]
GDSL-like Lipase for1 58	5'- ATGCTCCGATCCTTTGTCG -3'	58
GDSL-like Lipase rev1 58	5'- TCAGCATGTTGTCAGCACC -3'	58

Die Primer wurden wegen der großen Homologie von *P. sapidus* zu *P. ostreatus* von der Dyp-Typ Peroxidase-Gensequenz aus dem *P. ostreatus*-Genomprojekt abgeleitet.

Tabelle 24: Primer zur Amplifizierung der Gesamtsequenz der Dyp-Typ-Peroxidase

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Schmelztemperatur [°C]
DTP_for58	5'- ATGCGCTGGTGGACTACC -3'	58
DTP_rev54	5'- TTAAGCAGCGATTTTGTGC -3'	54

6.9.3 Herstellung der Klonierungsvektoren

Für die reverse Transkription und cDNA-Synthese wurde das „SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit“ (Clontech) verwendet. Anstelle der vom Hersteller angegebenen „PowerScript Reverse Transcriptase“ wurde die „SuperScript® II Reverse Transcriptase“ (Invitrogen) verwendet.

Die Amplifizierung der Ziel-DNA erfolgte mittels PCR. Kontroll-PCRs wurden mit der HotStar Taq DNA Polymerase durchgeführt.

PCR-Ansatz (30 µL):

cDNA	3 µL
10 x PCR-Puffer	3 µL
dNTPs (je 10 mM)	0,6 µL
Primer a (10 mM)	1,2 µL
Primer b (10 mM)	1,2 µL
HotStar Taq (5 U µL ⁻¹)	0,15 µL
H ₂ O (steril) ad Endvolumen	30 µL

PCR mit 40 Zyklen mit 53 °C Annealingtemperatur und 120 s Elongationszeit.

Tabelle 25: Primer zum Anfügen der Erkennungssequenzen an die cDNA der AAO.

Primer (Nummer/Name)	Sequenz
AAO-for-XbaI	TCTT CTAGAATGTCGTTT AGTGC ACTTCGTC
AAO-rev-SalI	CGAAG TCGACTACTGATCAGC

Die Analyse der RNA, PCR-Produkte, Plasmidpräparationen und Restriktionsspaltungen erfolgten mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurden die PCR-Produkte aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „PCR clean-up Gel Extraction Kits“, Macherey-Nagel, aus dem Gel nach Herstellerangaben (Handbuch April 2008/Rev.07) extrahiert.

Unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen XbaI und SalI (Fermentas) wurden die Expressionsvektoren asymmetrisch linearisiert und das Insert geschnitten. Anschließend wurde das Insert mit den linearisierten Vektoren ligiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei RT. Die Plasmide wurden dann in *E. coli* transformiert und die korrekte Lage des AAO-Gens mittels PCR verifiziert (Tabelle 26).

Tabelle 26: Primer zur Verifizierung des AAO-Gens im Expressionsplasmid.

Primer (Nummer/Name)	Sequenz
AAO-for-MBP	GTCAGACTGTCGATGAAGC
AAO-rev-AAO	TAGATCAGCTCCTCGTTTCG

6.9.4 Ligation mittels TA-TOPO-Cloning

Die Ligation von frisch isolierten DNA-Fragmenten in den pCR2.1-TOPO-Vektor erfolgte mittels TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Handbuch Version V, 7. April 2004, 25-0024).

Ligationsansatz	
DNA-Fragment	4 µL
Salzlösung	1 µL
pCR2.1-TOPO-Vektor	1 µL

Die Ligation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur. Die Ansätze wurden anschließend für die Transformation verwendet bzw. bei -20°C gelagert.

Für die anschließende Transformation in *E. coli* wurden 50 µL Aliquots kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 2 µL eines Ligationsansatzes vermischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock, indem die Zellen im Wasserbad 2 min auf 42°C erwärmt wurden. Anschließend wurden die Zellen sofort wieder für ca. 5 min auf Eis gestellt. Daraufhin wurden jeweils 150 µL LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert (Erholungsphase/Proteinsynthese). Abschließend wurden 170 µL der Transformationsansätze auf LB_{amp}-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.9.5 Heterologe Expression einer AAO aus *P. sapidus*

Bei den Vektoren pMAL-c4X und pMAL-p4X der Firma New England Biolabs wird die DNA-Sequenz des zu exprimierenden Proteins hinter das *malE*-Gen von *E. coli* kloniert, welches für das Maltosebindeprotein (MBP) kodiert. Bei der Expression wird das gewünschte Protein als MBP-Fusionsprotein exprimiert.

Für die Expression wurde eine 3 mL Kultur angelegt und die Kulturen bei 37 °C und 225 rpm im Schüttler inkubiert, bis eine Zelldichte (OD_{600 nm}) von 0,5 - 0,8 erreicht war. Von der Kultur wurden 500 µL Zellsuspension entnommen (Vorinduktion). Anschließend erfolgte die Induktion der Überexpression des Fusionsproteins durch Zugabe von 0,3 mM IPTG. Die Kulturen wurden weiter für 3 h bei 37 °C geschüttelt. Von den Kulturen wurden erneut 500 µL Probenvolumen abgenommen (Nachinduktion). Die Proben wurden zentrifugiert (14.000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 20 µL LAP resuspendiert und die Proben für 2 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Um eine Reinigung des rekombinanten Enzyms unter denaturierenden Bedingungen zu erreichen wurde die codierende AAO-Sequenz in den pET-15b Vektor (Novagen) mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI umklont und als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-Tag in *E.coli* BL21(DE3)-Zellen exprimiert.

Für die Rückfaltung wurden folgende Puffer verwendet:

Solubilisierungspuffer:

Tris-HCl, pH 8,0	20 mM
EDTA	2 mM
DTT	30 mM
Harnstoff	8 M

Rückfaltungspuffer

Tris-HCl, pH 9,0	20 mM
Glycerol	35%
Harnstoff	0,6 M
Glutathion (GSSG/GSH molares Verhältnis 2:1)	2,5 mM
DTT	1 mM
FAD	0,08 mM

6.10 Heterologe Expression der polyvalenten Peroxidase aus *P. sapidus* in *H. polymorpha* (Artes Biotechnology)

6.10.1 Fusionsgendesign

Die polyvalente Peroxidase (VP) aus *P. sapidus* besteht natürlicherweise aus 361 Aminosäuren, in denen ein N-terminales Signalpeptid enthalten ist. Über Edman-Abbau des reifen Proteins wurde eine Länge des Signalpeptids von 30 AS bestimmt. Analysiert man die Primärsequenz der polyvalenten Peroxidase mit Signal P, erhält man ein Signalpeptid von 22 AS. Für beide Annahmen wurde je ein Fusionsprotein designed, bei dem der jeweilige Zielproteinanteil mit einer N-terminalen Präprosequenz und einem C-terminalen His Tag fusioniert wurde. Bei der Präprosequenz handelt es sich um eine Variante der MF α Präprosequenz, bei der D83 gegen E ausgetauscht wurde. Diese Fusionsproteine wurden als MF α E-VP(331)-H6 (331 C-terminale AS der Peroxidase; Annahme, dass das natürliche Signalpeptid 22 AS entspricht) und MF α E-VP(339)-H6 (339 C-terminale AS der Peroxidase; Annahme, dass das natürliche Signalpeptid 30 AS entspricht) bezeichnet.

Bei der 525 AS langen DyP-Typ Peroxidase (DTP) aus *P. ostreatus* ist über das natürliche Signalpeptid nichts bekannt. Eine Analyse der Primärsequenz mit Signal P ergab einen möglichen Start in das reife Protein bei A72, was einem Signalpeptid von 71 AS entspräche. In diesem Fall wurde ein Konstrukt designed, bei dem die 454 C-terminalen Reste der Peroxidase (entspricht einem Start bei A72) wie bei den VP-Konstrukten mit der MF α -Präpro-Sequenz mit D83E sowie einem C-terminalen His Tag fusioniert wurde. Bei dem zweiten Konstrukt sollte getestet werden, ob die (bisher unbekannt) natürliche Signalsequenz in *H. polymorpha* funktionell ist; hier wurde die gesamte DTP-Sequenz (DTP525) mit einem C-terminalen His Tag versehen.

6.10.2 Gensynthesen

Für die o. g. Fusionsproteine wurden entsprechende synthetische Gene bei der Firma GeneArt (Regensburg) generiert. Dabei wurden die Kodons für eine Expression in *H. polymorpha* optimiert. Die Sequenzen wurden mit flankierenden Restriktionsschnittstellen versehen, die eine Klonierung in das *H. polymorpha*-Expressionsplasmid pFPMT121 erlauben.

6.10.3 Konstruktion von *H. polymorpha*-Expressionsplasmiden

a) Peroxidasen aus *Pleurotus sapidus*

Die vier verschiedenen Ligationen sind in Tabelle 27 zusammengefasst. *Escherichia coli* DH10 α wurde mit den Ligationsansätzen transformiert, und je 10 Ampicillin-resistente Einzelklone wurden bezüglich ihrer Plasmid-DNA analysiert. Bei je zwei restriktionspositiven Plasmidklonen wurde die Insertsequenz sequenziert (Firma Qiagen, Hilden). In allen Fällen zeigte mindestens einer der beiden Plasmidklone eine korrekte Insertsequenz. In Tabelle 27 ist jeweils der Plasmidklon angegeben, mit dem die anschließende Stammgenerierung durchgeführt wurde.

Tabelle 27: Zusammenfassung der Konstruktion der verschiedenen Expressionsplasmide für eine Peroxidase aus *P. sapidus*.

Fusionsprotein	Ligierte Fragmente	Plasmidklon mit sequenziertem Insert
MF α E-VP(331)-H6	pFPMT121 <i>EcoRI/BamHI</i> 6,968kb + GeneArt-Plasmid 0926084_MF α E- VP(331)-H6_pMA <i>EcoRI/BamHI</i> 1,278kb	pFPMT-MF α E-VP(331)-H6 # 8
MF α E-VP(339)-H6	pFPMT121 <i>EcoRI/BamHI</i> 6,968kb + GeneArt-Plasmid 0926083_MF α E- VP(339)-H6_pMK-RQ <i>EcoRI/BamHI</i> 1,302kb.	pFPMT-MF α E-VP(339)-H6 # 1
MF α E-DTP(454)- H6	pFPMT121 <i>EcoRI/BamHI</i> 6,968kb + GeneArt-Plasmid 0926082_MF α E- DTP(454)-H6_pMK-RQ <i>EcoRI/BamHI</i> 1,647kb.	pFPMT-MF α E-DTP(454)-H6 # 13
DTP(525)-H6	pFPMT121 <i>EcoRI/BamHI</i> 6,968kb + GeneArt-Plasmid 0926081_DTP(525)- H6_pMK-RQ <i>EcoRI/BamHI</i> 1,605kb.	pFPMT-DTP(525)-H6 # 17

b) Esterase aus *Pleurotus sapidus*

Sekretorische Varianten

Es wurde zunächst ein DNA-Fragment designed und synthetisiert, welches die terminalen Aminosäuren der MF α -Präprosequenz inklusive einer singulären, klonierungsrelevanten *Hind*III-Schnittstelle, die reife Esterase 1, einen His-Tag und ein Stopkodon kodiert und am 3'-Ende von einer *Bam*HI-Schnittstelle flankiert wurde. Dieses Fragment erlaubte die Insertion in vier verschiedene *H. polymorpha*-Vektoren, welche jeweils formal dem pFPMTH1-Vektorgerüst (Abbildung 106F) mit einem Fusionsleseraster kodierend für eines der in Abbildung 106A-D gezeigten Proteine entsprechen. Die resultierenden Fusionsproteine sowie das Vektorgerüst sind in Abbildung 106A-D und F gezeigt.

Cytosolische Variante

Desweiteren wurde ein von *Eco*RI- und *Bam*HI-Schnittstellen flankiertes Leseraster synthetisiert, welches die mit einem Startmethionin versehene Sequenz der Esterase 1 gefolgt von einem His-Tag kodiert (Abbildung 106E). Auch dieses Fragment wurde in pFPMTH1 inseriert.

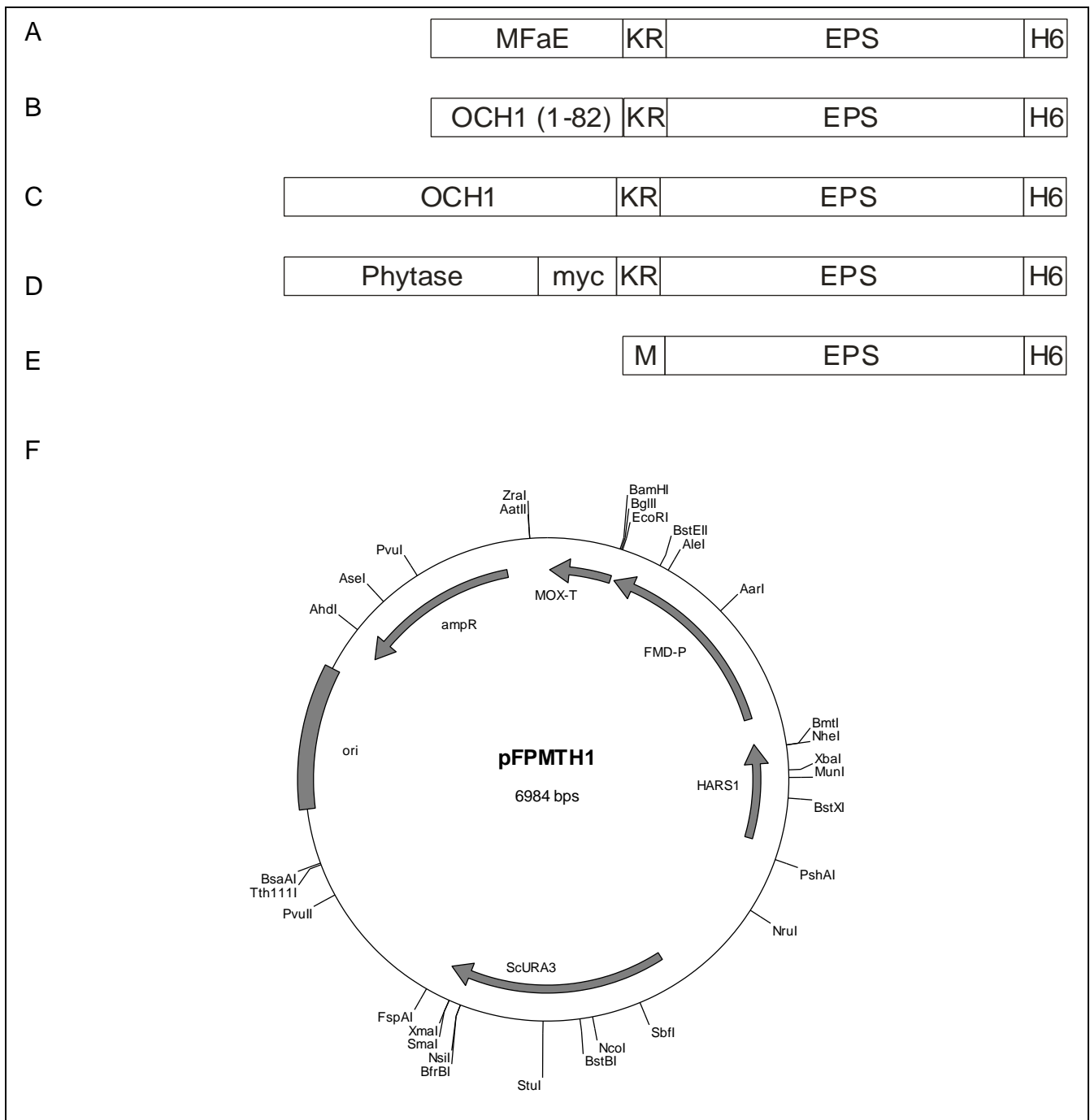


Abbildung 106: Fusionsproteine für sekretorische Expression der Esterase 1, schematisch und Karte des Expressionsvektors. A-D zeigt die sekretorischen Fusionsproteine, in E ist das cytosolische Konstrukt dargestellt. Abkürzungen: MFaE: Präprosequenz des Mating Factor α mit D83E-Austausch; KR: dibasisches Motiv (Schnittstelle für die Kex2-Protease); EPS: Esterase 1 aus *Pleurotus sapidus*; myc: myc-Tag; H6: His-Tag. Die Karte des Multi Copy-Expressionsvektors pFPMTH1 ist in F gezeigt. In den verschiedenen Expressionsplasmiden befinden sich die Fusions-ORFs zwischen den EcoRI- und BamHI-Schnittstellen von pFPMTH1 unter der Transkriptionskontrolle des FMD-Promotors und des MOX-Terminators. Abkürzungen: ori: origin of replication von pBR322; ScURA3: URA3 aus *Saccharomyces cerevisiae*; HARS1: autonom replizierende Sequenz 1 aus *H. polymorpha*; FMD-P: FMD-Promotor aus *H. polymorpha*; MOX-T: MOX-Terminator aus *H. polymorpha*; ampR: Ampicillin-Resistenzgen aus pBR322.

Die insgesamt fünf Klonierungen sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Die Insertsequenzen wurden mittels Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung verifiziert.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Konstruktionen der verschiedenen Expressionsplasmide für eine Esterase aus *P. sapidus*.

Fusionsprotein	Ligierte Fragmente	Plasmidklon mit sequenziertem Insert
MF α E-EST-H6	pFPMTMF α HindIII/BamHI 7,217kb + GeneArt-Plasmid 1025995_MF α E-mEPS-H6 HindIII/BamHI 1.645kb	pFPMT-MF α E-mEST-H6 # 9
OCH1-EST-H6	pFPMT01flm HindIII/BamHI 8,341kb + pFPMT-MF α E-EST-H6 # 9 HindIII/BamHI 1,645kb	pFPMT-O1flm-EST-H6 # 19
OCH1 (1-82)-EST-H6	pFPMT01A82HA HindIII/BamHI 7,300kb + pFPMT-MF α E-EST-H6 # 9 HindIII/BamHI 1,645kb	pFPMT-O1A82HA-EST-H6 # 10
Phytase-EST-H6	pFPMT-MF α E-EST-H6 # 9 HindIII/BamHI 1,645kb + pFPMT-ConKex EcoRI/BamHI 7,007kb + pFPMT-ConKex EcoRI completely/HindIII partial 1,445kb	pFPMT-Phytase-EST-H6 # 17
EST-H6	pFPMT121-H1 EcoRI/BamHI 6.972kb + GeneArt plasmid 1025994_EPS-H6 EcoRI/BamHI 1.692kb	pFPMT-EST-H6 # 12

6.10.4 Generierung von rekombinanten *H. polymorpha*-Stämmen

a)

Als Wirtstamm für die Peroxidase-Genexpression wurde *H. polymorpha* RB11 (relevanter Genotyp *ura3*) ausgewählt, dessen Auxotrophie über das auf den pFPMT-Plasmiden enthaltene *URA3* aus *Saccharomyces cerevisiae* komplementiert werden kann. Nach erfolgter Transformation mittels Elektroporation wurden die Ansätze auf YNB/Glucose-Platten ausgestrichen. Je 36 Uracil-prototrophe Kolonien wurden für die Stammgenerierungen ausgewählt. Zu diesem Zweck wurden je 3 mL YNB/Glucose-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie angeimpft und für 48 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert (1. Passagierungsschritt). Je 20 μ L dieser Kulturen wurden erneut in je 3 mL YNB/Glucose-Medium überführt und wie zuvor inkubiert (2. Passagierungsschritt). Nach einem 3. Passagierungsschritt wurden je 20 μ L Kultur zum Beimpfen von 3 mL YPD-Medium eingesetzt. Es wurden zwei dieser sog. Stabilisierungsschritte durchgeführt, dabei wurde je 24 h wie oben beschrieben inkubiert. 20 μ L-Aliquots der Kulturen des 2. Stabilisierungsschritts wurden zum Beimpfen von je 3 mL YNB/Glucose-Medium eingesetzt. Nach Inkubation für 24 h bei 37 °C und 180 rpm wurden Aliquots der Kulturen auf YNB/Glucose-Platten ausgestrichen.

Diese Platten wurden bei 37 °C inkubiert, bis makroskopische Einzelklone sichtbar waren, die dann Einzelstämme repräsentierten. Pro Serie wurden 36 Einzelstämme für weitere Analysen ausgewählt.

Bei dieser Form der Stammgenerierung liegt das Plasmid während der Passagierungen zunächst episomal vor. Während der 2. und 3. Passage erfolgt in einigen Zellen pro Kultur die genomische Integration. Während der beiden Stabilisierungsschritte in Vollmedium (nicht-selektive Bedingungen) verlieren Zellen mit episomalem Plasmid ihr Plasmid. Bei der anschließenden Phase auf Selektionsmedium können dann nur noch Zellen wachsen, bei denen das Plasmid genomisch integriert vorliegt.

b)

Als Wirtstamm für die Expression der verschiedenen EPS-H6-Fusionsproteine wurde ebenfalls der bereits industriell angewandte, auxotrophe Stamm *H. polymorpha* RB11 (*ura3*) eingesetzt. Der Stamm wurde mit den charakterisierten Expressionsplasmiden (Tabelle 28) transformiert und für die Integration der Vektoren in das Genom für ca. 30 Generationen auf Selektivmedium angezogen (6.10.4a). Nach Stabilisierung in nicht-selektivem Medium lagen je 36 Transformanten-Pools für das weitere Screening vor. Diese wurden entweder zuerst analysiert und dann vereinzelt und nochmals analysiert (MFaE-EPS-H6, EPS-H6) oder sofort vereinzelt und analysiert (alle anderen).

6.10.5 Induktion und Screening rekombinanter Stämme

a)

Die Kultivierung der Stämme zwecks Produktbildung erfolgte im 500 µL-Mikrotiterplattenmaßstab bei 37 °C und 250 rpm. Zunächst wurden die Stämme für 16 Std als YPD-Kulturen inkubiert. Unter dieser Bedingung liegt der die Fremdgene steuernde *FMD*-Promotor Glucose-reprimiert vor. Je 20 µL dieser Kulturen wurden in YNB ungepuffert, YNB pH 6 oder YP mit je 2% Glycerol überführt. Die Inkubation erfolgte für 40 h. Während dieser sogenannten Derepressionsphase ist der *FMD*-Promotor bereits aktiv, da die Glucoserepression aufgehoben ist. Nach Ablauf der 40 h wurden die Kulturen auf 1% MeOH eingestellt und erneut für 24 Std kultiviert. Dieser Abschnitt stellt die MeOH-Induktion dar, während derer der *FMD*-Promotor i.d.R. maximale Aktivität zeigt. Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte aus solchen Kultivierungen wurden für Folgeexperimente eingesetzt.

b)

Sekretorische Variante: MF α E-EPS-H6

Das Screening auf Esterase erfolgte zunächst mittels Dot Blot Kulturüberstand (MF α E-EPS-H6) nach Kultivierung in unterschiedlichen Medien, wobei ein His-Tag-spezifischer Antikörper eingesetzt wurde. Bei diesen Vorversuchen erschien die Kultivierung in YNB/2% Glycerin (42 h) mit anschließender MeOH-Induktion (Zugabe von 1% MeOH; weitere Kultivierung für 24 h) am besten geeignet. Signal-positive Transformanten-Pools wurden vereinzelt, je fünf individuelle Kolonien wurden isoliert und als Stämme definiert. Diese Stämme wurden wie oben beschrieben kultiviert und analysiert. Zusätzlich wurden Kulturüberstände und Gesamtzellextrakte mittels Western Blot untersucht. Es konnten keine Produkt-positive Stämme identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Sekretorische Varianten: OCH1 (1-82)-EPS-H6 und OCH1-EPS-H6

Für diese Konstrukte wurden direkt Einzelstämme erzeugt. Die Passagierungs-/Stabilisierungsprozedur wurde durchgeführt wie in 3.1.1.1 beschrieben, jedoch wurden die generierten Transformanten-Pools direkt nach der Stabilisierung ohne vorherige Analyse vereinzelt. Je 36 Einzelstämme wurden bezüglich Produktbildung untersucht. Die Stämme wurden für 42 h bei 37°C in YNB/2% Glycerin kultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände mittels Dot Blot und die Gesamtzellextrakte mittels Dot Blot und Western Blot analysiert, wobei ein His-Tag-spezifischer Primärantikörper eingesetzt wurde. Es konnten keine Produkt-spezifischen Signale identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Sekretorische Variante: Phytase-EPS-H6

Bei der Phytase-EPS-H6-Serie wurde zunächst eine Transformanten-Poolgenerierung durchgeführt wie in Kapitel B.3.1.1 beschrieben. 23 der 36 generierten Transformanten-Pools wurden für 42 h in YNB/2% Glycerin/1% Peptone/0,1M MES pH 6,1 kultiviert und anschließend die Phytase-Aktivität in den Kulturüberständen bestimmt. Einige Pools zeigten deutliche Aktivität (Daten nicht gezeigt). Pools # 7 (stark), 8 (schwach), 21 (stark) und 22 (mittel) wurden für ein Medien-Screening-Experiment ausgewählt, um die in YNB/2% Glycerin/1% Peptone/0,1M MES pH 6,1 beobachteten Phytase-Aktivitäten eventuell zu verstärken. Dazu wurden die Pools in sechs verschiedenen Medien für je 42 h bei 37°C kultiviert:

- YP/2% Glycerin
- YNB/2% Glycerin
- YP/YNB-2% Glyc. + 0,1M Kaliumphosphat-Puffer pH 6

- YNB/2% Glycerin/1% Peptone/0,1M MES pH 6,1
- YNB/2% Glycerin/1% Pepton/0,1M Natriumphosphat-Puffer pH 5,5
- YNB/2% Glycerin/1% Pepton/0,1M Citrat-Puffer pH 5

6.10.6 Peroxidaseaktivitätstest

Für das Screening nach Produkt-positiven Stämmen wurde ein Peroxidaseaktivitäts-Assay eingesetzt (siehe 6.4.1, Tabelle 19, Eggert *et al.* 1996) Die Platten wurden für 2 Std bei 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung in einem Tekan Genios ELISA-Reader bei 420 nm. Als positiv wurden Kulturüberstände mit einer OD420 > 0,2 gewertet.

6.10.7 SDS-PAGE/Western Blot

Aliquots der Kulturüberstände oder Gesamtzellextrakte (mittels Glaskugeln aufgeschlossenes Zellpellet) wurden unter denaturierenden reduzierenden Bedingungen über 4 - 12%ige Bis/Tris-Gele (Criterion) nach Herstellerangaben aufgetrennt. Anschließend erfolgte der Semidry-Transfer auf einem Perfect Blue Semydry Electroblotter (Sedec M; PeqLab) auf Nitrocellulosemembranen (Protran; Whatman). Die Membranen wurden mit Ponceau Red angefärbt und eingescannt, um das transferierte Gesamtproteinmuster zu dokumentieren. Anschließend wurde die Rotfärbung abgewaschen und mit dem immunologischen Nachweis der Peroxidase-Banden fortgeföhren. Als Primärantikörper wurde ein His Tag-spezifisches polyklonales Kaninchenserum eingesetzt (AK-online; # ABIN 195461) eingesetzt, ein Ziege-anti-Kaninchen(H+L)-AP-Konjugat (BioRad; # 170-6518) diente als Sekundärantikörper. Zur Visualisierung spezifischer Produktbanden wurde NBT/BCIP als Chromogen eingesetzt.

6.11 Heterologe Expression einer Peroxidase und einer Lipase aus *P. sapidus* in *T. reesei*

6.11.1 Gensynthese

Die Synthese des Peroxidase- und Lipase-Gens aus *Pleurotus sapidus* erfolgte durch Entelechon (<http://www.entelechon.com/>). Zur Optimierung der Expression in *T. reesei* wurde die Gensequenz unter Anwendung der *T. reesei* Codon usage angepasst. Die synthetisierten Gene wurden im pCR4-Vektor subkloniert und erhielten die Bezeichnung DypK10 (Peroxidase) bzw. lipPS (Lipase).

6.11.2 Plasmidkonstruktion

Für die Konstruktion der verschiedenen Expressionssvektoren wurden das Gen mittels PCR aus dem entsprechenden Plasmid amplifiziert und anschließend nach der Hydrolyse mit der geeigneten Restriktionsendonuklease in das Expressionsplasmid eingebaut. Die Synthese der verwendeten Primer mit den passenden Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease erfolgte durch Eurofins MWG Operon (<http://www.eurofinsdna.com/>). Die PCR-Amplifikation wurde im Thermocycler PTC 200 (Biozym <http://www.biozym.com/>) durchgeführt. Die Überprüfung der Richtigkeit der Genkonstrukte erfolgte durch DNA-Sequenzierung in einem DNA Sequencer CEQ8000 Beckman Coulter (<http://www.beckmancoulter.de/>).

6.11.3 Protoplasten Transformation

Für die Transformation in *T. reesei* wurde der Stamm RF6651 verwendet. Aus den Expressionsvektoren wurden die Expressionskassetten mit NotI herausgeschnitten, in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels der β -Agarase bzw. mit Hilfe des PeqGold Extraction Kits gereinigt (PeqLab <http://www.peqlab.de/>). Die Protoplasten Transformation von *T. reesei* wurde nach der Methode von Penttilä *et al.* 1987 durchgeführt. Die Transformationsplatten wurden für 7 Tage bei 30°C inkubiert.

6.11.4 Enzymatische Plattenassay und Schüttelkolben-Kultivierung

Die enzymatische Plattenassays für Peroxidase erfolgten nach einer modifizierten Methode von Conesa *et al.* 2000. Hierfür wurden Transformanten auf PD-Platten (Potato Dextrose Agar) transferriert und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Zum Testen der Peroxidaseaktivität wurden kleine Agarstücke mit Mycel auf die Testplatte gesetzt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Testplatten enthalten PD-Medium, 0.025% Dianisidine, 2% Agar-agar. Die Testplatten wurden anschließend mit 500 μ M H₂O₂-Lösung überschichtet. Peroxidase-haltige Transformanten erschienen rotbraun (Abbildung 107a). Zur Untersuchung der Expression der Peroxidase im Schüttelkolben wurden die peroxidasehaltigen Transformanten (Mischkulturen) auf PD- Schrägagar-Röhrchen für 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Sporen wurden danach geerntet, hiermit Schüttelkolben beimpft und die Kultivierung für 144 h bei 28 °C durchgeführt. Für die Schüttelkolben-Kultivierung wurden zwei Medien (D und D5) mit unterschiedlichen Lactose-Konzentrationen getestet.

Die qualitative Bestimmung der Enzymaktivität der Mischkultur erfolgte durch Auftragen von 5 μ l Kulturfiltrat auf die Testplatte (Abbildung 107b).

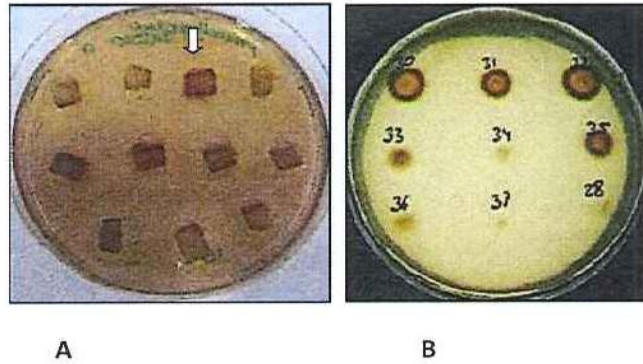


Abbildung 107: Peroxidase Plattenassay mit einem Agarstück-Mycel (A) oder mit Kulturfiltrat (B). Nach der Inkubation für 21 h bei 30 °C wurden die Platten mit 500 µM H₂O₂ überschichtet. Positive Peroxidase-Klone produzieren ein rotbraun gefärbtes Produkt.

Die gut produzierenden Peroxidase Transformanten wurden durch die Isolierung von Einzelsporen gereinigt. Die vereinzelt Sporen wurden auf Schrägagar-Röhrchen für 5 Tage bei 30 °C vermehrt und anschließend in Schüttelkolben kultiviert. Nach der Bestätigung durch den enzymatischen Plattentest wurden die zwei besten Peroxidase-haltige Klone für die weitere Untersuchung im 0.5L-Fermenter ausgewählt. Die Analyse der Enzymproduktion in Kleinfementern erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese und quantitative Enzymaktivitätsbestimmung. pAB500-DypK10 stellte sich als das beste Konstrukt für die Peroxidase Produktion in *T. reesei* heraus.

Für die Untersuchung der Lipase Produktion in *T. reesei* wurde die gleiche Prozedur durchgeführt. Die verwendeten Testplatten enthielten 1% Glucidex, 1% Triton-X-100, 2 mM MgSO₄, 3 mM CaCl₂, 1,7% Agar – Agar und als Substrat entweder 1 % Olivenöl oder 1% Glyceryl Tributyrat bei pH 7.5.

6.11.5 Optimierung der Expression im Fermenter

Die Produktion der Peroxidase und Lipase erfolgte durch die Prozessoptimierung im Kleinfementen.

7 Literatur

- Aderemi, B. O.; Abu, E.; Highina, B. K. (2008) The Kinetics of Glucose Production from Rice Straw by *Aspergillus niger*, *Afric J Biotechnol* **7**, 1745-1752.
- Adler, E. (1977) Lignin Chemistry - Past, Present and Future, *Wood Sci Tech* **11**, 169–218.
- Bailey, M. J. (1988) A Note on the Use of Dinitrosalicylic Acid for Determining the Products of Enzymatic Reactions, *Appl Microbiol Biotechnol* **29**, 494–496.
- Balat, M. (2011) Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials via the Biochemical Pathway: A Review, *Energy Conversion and Management* **52**, 858-875.
- Barreca, A. M.; Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P.; Ljunggren, S. (2003) Laccase/Mediated Oxidation of a Lignin Model for Improved Delignification Procedures, *J Mol Catal B Enzym* **26**, 105–110.
- Biwer, A. T. (2003) Modellbildung, Simulation und ökologische Bewertung in der Entwicklung biotechnologischer Prozesse, Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Brinkmann T.; Rubbeling H.; Fröhlich P.; Katzberg M.; Bertau M. (2010) Application of Material and Energy Flow Analysis in the Early Stages of Biotechnical Process Development – A Case Study, *Chem Eng Technol* **33**, 618-628.
- Bourbonnais, R.; Paice, M. G. (1990) Oxidation of Non-Phenolic Substrates: An Expanded Role for Laccase in Lignin Biodegradation, *FEBS Lett* **267**, 99–102.
- Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Chamrad, D. C.; Koerting, G.; Gobom, J.; Thiele, H.; Klose, J.; Meyer, H. E.; Blueggel, M. (2003) Interpretation of Mass Spectrometry Data for High-Throughput Proteomics, *Anal Bioanal Chem* **376**, 1014–1022.
- Conesa, A.; van den Hondel, CAMJJ; Punt, P. J. (2000) Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*, *Appl Environ Microbiol* **66**, 3016–3023.
- Demirbas, A. (2007) Progress and Recent Trends in Biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science* **33**, 1–18.

- Eggert, C.; Temp, U.; Dean, J. F.; Eriksson, K. E. (1996) A Fungal Metabolite Mediates Degradation of Non-Phenolic Lignin Structures and Synthetic Lignin by Laccase, *FEBS Lett* **391**, 144–148.
- Faulds, C. B.; deVries, R. P.; Kroon, P. A.; Visser, J.; Williamson, G. (1997) Influence of Ferulic Acid on the Production of Feruloyl Esterases by *Aspergillus Niger*, *FEMS Microbiol Lett* **157**, 239–244.
- Faulds, C. B.; Williamson, G. (1994) Purification and Characterization of a Ferulic Acid Esterase (FAE-III) from *Aspergillus Niger* - Specificity for the Phenolic Moiety and Binding to Microcrystalline Cellulose, *Microbiology -UK* **140**, 779–787.
- Grammel R. (1989) Forstbenutzung, Pareys Studentexte Nr. 67, *Verlag Paul Parey* (Hamburg/Berlin).
- Gutfinger, T. (1981) Polyphenols in Olive Oils, *J Am Oil Chem Soc* **58**, 966–968.
- Hammel, K. E.; Tien, M.; Kalyanaraman, B.; Kirk, T. K. (1985) Mechanism of Oxidative C_α-C_β Cleavage of a Lignin Model Dimer by *Phanerochaete-Chrysosporium* Ligninase - Stoichiometry and Involvement of Free-Radicals, *J Biol Chem* **260**, 8348–8353.
- Hatfield, R. D.; Ralph, J.; Grabber, J. H. (1999) Cell Wall Structural Foundations: Molecular Basis for Improving Forage Digestibilities, *Crop Sci* **39**, 27–37.
- Heinzle E.; Biber A.; Eissen M.; Abdul Kholiq M. (2006) Bewertung biotechnologischer Prozesse in frühen Phasen der Entwicklung hinsichtlich Risiken bezüglich Ökologie, Sicherheit und Gesundheit, *Chemie Ingenieur Technik* **78**, 301-305.
- Hofrichter, M.; Fritsche, W. (1997) Depolymerization of Low-Rank Coal by Extracellular Fungal Enzyme Systems. III. *In-Vitro* Depolymerization of Coal Humic Acids by a Crude Preparation of Manganese Peroxidase from the White-Rot Fungus *Nematoloma Frowardii* B19, *Appl Microbiol Biotechnol* **47**, 566–571.
- Hofrichter, M.; Scheibner, K.; Schneegaß, I.; Ziegenhagen, D.; Fritsche, W. (1998) Mineralization of Synthetic Humic Substances by Manganese Peroxidase from the White-Rot Fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**, 584-588.
- Hofrichter, M.; Vares, K.; Scheibner, K.; Galkin, S.; Sipila, J.; Hatakka, A. (1999a) Mineralization and Solubilization of Synthetic Lignin by Manganese Peroxidases from *Nematoloma Frowardii* and *Phlebia Radiata*, *J Biotechnol* **67**, 217–228.
- Hofrichter, M.; Lundell, T.; Hatakka, A. (2001) Conversion of Milled Pine Wood by Manganese Peroxidase from *Phlebia Radiata*, *Appl Environ Microbiol* **67**, 4588–4593.

- Hofrichter, M.; Vares, T.; Kalsi, M.; Galkin, S.; Scheibner, K.; Fritsche, W.; Hatakka, A. (1999b) 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.
- Iiyama, K.; Lam, T. B.; Stone, B. A. (1994) Covalent Cross-Links in the Cell-Wall, *Plant Physiol* **104**, 315–320.
- Kenzie, C. R. Mac; Bilous, D. (1988) Ferulic Acid Esterase-Activity from *Schizophyllum-Commune*, *Appl Environ Microbiol* **54**, 1170–1173.
- Kinne, M.; Poraj-Kobielska, M.; Ralph, S. A.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Hammel, K. E. (2009) Oxidative Cleavage of Diverse Ethers by an Extracellular Fungal Peroxygenase, *J Biol Chem* **284**, 29343–29349.
- Kirk, T. K.; Farrell, R. L. (1987) Enzymatic Combustion - The Microbial-Degradation of Lignin, *Annu Rev Microbiol* **41**, 465–505.
- Kirk, T. K.; Tien, M.; Kersten, P. J.; Mozuch, M. D.; Kalyanaraman, B. (1986) Ligninase of *Phanerochaete Chrysosporium*- Mechanism of its Degradation of the Nonphenolic Arylglycerol Beta-Aryl Ether Substructure of Lignin, *Biochem J* **236**, 279–287.
- Klose, J. (1999) Large-Gel 2-D Electrophoresis, *Methods Mol Biol*, 147–172.
- Kottmeier, K.; Muller, C.; Huber, R.; Buchs, J. (2010) Increased Product Formation Induced by a Directed Secondary Substrate Limitation in a Batch *Hansenula Polymorpha* Culture, *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 93–101.
- Kovacs, K.; Macrelli, S.; Szakacs, G.; Zacchi, G. (2009) Enzymatic Hydrolysis of Steam-pretreated Lignocellulosic Materials with *Trichoderma atroviride* Enzymes Produced *in-house*. *Biotechnol Biofuel* **2**, 1-11.
- Kroon, P. A.; Williamson, G.; Fish, N. M.; Archer, D. B.; Belshaw, N. J. (2000) A Modular Esterase from *Penicillium Funiculosum* which Releases Ferulic Acid from Plant Cell Walls and Binds Crystalline Cellulose Contains a Carbohydrate Binding Module, *Eur J Biochem* **267**, 6740–6752.
- Li, K. C.; Helm, R. F. (1995) Synthesis and Rearrangement Reactions of Ester-Linked Lignin-Carbohydrate Model Compounds, *J Agric Food Chem* **43**, 2098–2103.
- 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*. *Enzym Microb Technol* **41**, 785-793.

- Liers, C.; Ullrich, R.; Steffen, K. T.; 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. (2007) Das Lignocellulose Abbauende Enzymsystem des Holzbesiedelnden Schlauchbilzes *Xylaria polymorpha*, Dissertation,
- Liers, C.; Bobeth, C.; Pecyna, M.; Ullrich, R.; Hofrichter, M. (2010) Dyp-Like Peroxidases of the Jelly Fungus *Auricularia Auricula-Judae* Oxidize Nonphenolic Lignin Model Compounds and High-Redox Potential Dyes, *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 1869–1879.
- Liers, C.; Arnstadt, T.; Ullrich, R.; Hofrichter, M (2011) Patterns of Lignin Degradation and Oxidative Enzyme Secretion by Different Wood- and Litter-colonizing Basidiomycetes and Ascomycetes Grown on Beech Wood, *FEMS Microbiol Ecol* **78**, 91-102.
- Mathew, S.; Abraham, T. E. (2005) Studies on the Production of Feruloyl Esterase from Cereal Brans and Sugar Cane Bagasse by Microbial Fermentation, *Enzyme Microb Technol* **36**, 565–570.
- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. (1988) Improved Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels Including Isoelectric-Focusing Gels with Clear Background at Nanogram Sensitivity Using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis* **9**, 255–262.
- Pan, X. J.; Sano, Y. (2005) Fractionation of Wheat Straw by Atmospheric Acetic Acid Process, *Bioresour Technol* **96**, 1256–1263.
- Pant, D.; Adholeya, A. (2007) Enhanced Production of Ligninolytic Enzymes and Decolorization of Molasses Distillery Wastewater by Fungi Under Solid State Fermentation, *Biodegradation* **18**, 647–659.
- Penttilä, M.; Nevalainen, H.; Rättö, M.; Salminen, E.; Knowles, J. (1987) A Versatile Transformation System for the Cellulolytic Filamentous Fungus *Trichoderma reesei*, *Gene* **61**, 155–164.
- Popov, N.; Schmitt, M.; Schulzeck, S.; Matthies, H. (1975) Reliable Micromethod for Determination of the Protein Content in Tissue Homogenates, *Acta Biol Med Ger*, 1441–1446.

- Pühse, M.; Szweda, R. T.; Ma, Y.; Jeworrek, C.; Winter, R.; Zorn, H. (2009) *Marasmius Scorodonius* Extracellular Dimeric Peroxidase - Exploring its Temperature and Pressure Stability, *Biochim Biophys Acta* **1794**, 1091–1098.
- Purdy, R. E.; Kolattukudy, P. E. (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*, 61–69.
- Ruiz-Duenas F. J.; Ferreira P.; Martinez M. J. (2006) In Vitro Activation, Purification, and Characterization of *Escherichia Coli* Expressed Aryl-Alcohol Oxidase, A Unique H₂O₂-Producing Enzyme. *Protein Expr Purif* **45**, 191-199.
- Rumbold, K.; Biely, P.; Mastihubova, M.; Gudelj, M.; Gubitx, G.; Robra, K. H.; Prior, B. A. (2003) Purification and Properties of a Feruloyl Esterase Involved in Lignocellulose Degradation by *Aureobasidium Pullulans*, *Appl Environ Microbiol* **69**, 5622–5626.
- Sugano, Y. (2009) Dyp-Type Peroxidases Comprise a Novel Heme Peroxidase Family, *Cell Mol Life Sci* **66**, 1387–1403.
- Tien, M.; Kirk, K. T. (1984) Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete-Chrysosporium* - Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂Requiring Oxygenase, *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 2280–2284.
- Ullrich, R.; Liers, C.; Schimpke, S.; Hofrichter, M. (2009) Purification of Homogeneous Forms of Fungal Peroxygenase, *Biotechnology Journal* **4**, 1619–1626.
- Ullrich, R. (2005) Die Haloperoxidase des Pilzes *Agrocybe aegerita*: Ein Extracelluläres P450-Enzym, Dissertation,
- Valmaseda, M.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (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 Environ Microbiol*, 817–823.
- Wariishi, H.; Valli, K.; Gold, M. H. (1992) Manganese(II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium* - Kinetic Mechanism and Role of Chelators, *J Biol Chem* **267**, 23688–23695.
- Weingarten, P.; Lutter, P.; Wattenberg, A.; Blueggel, M.; Bailey, S.; Klose, J.; Meyer, H. E. (2005) Application of Proteomics and Protein Analysis for Biomarker and Target Finding for Immunotherapy, *Methods Mol Med*, 155–174.

- Wessel, D.; Flügge, U. I. (1984) A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids, *Anal Biochem* **138**, 141–143.
- Williamson, G.; Faulds, C. B.; Kroon, P. A. (1998a) Specificity of Ferulic Acid (Feruloyl) Esterases, *Biochem Soc Trans* **26**, 205–209.
- Williamson, G.; Kroon, P. A.; Faulds, C. B. (1998b) Hairy Plant Polysaccharides: A Close Shave with Microbial Esterases, *Microbiology* **144**, 2011–2023.
- Winkler, U. K.; Stuckmann, M. (1979) Glycogen, Hyaluronate, and some other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia-Marcescens*, *J Bacteriol* **138**, 663–670.
- Zor, T.; Selinger, Z. (1997) Linearization of the Bradford Protein Assay Increases its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies, *Anal Biochem* **236**, 302–308.
- Zorn, H.; Langhoff, S.; Scheibner, M.; Nimtz, M.; Berger, R. G. (2003) A Peroxidase from *Lepista Irina* Cleaves β,β -Carotene to Flavor Compounds, *Biol Chem* **384**, 1049–1056.
- Zorn, H.; Peters, T.; Nimtz, M.; Berger, R. G. (2005) The Secretome of *Pleurotus Sapidus*, *Proteomics* **5**, 4832–4838.

8 Anhang

Probennummer	Stamm	Medium	Kultivierungszeit	Aktivität [U L ⁻¹]
S 278 / 11	RH32919	Fed Batch	88,2h	33,4
S 290 / 11	RH32919	Fed Batch	115,5h	62,5
S 302 / 11	RH32919	Fed Batch	137h	16,3
S 314 / 11	RH32919	Fed Batch	161h	9,9
S 284 / 11	RH32919	D5	88,2h	71,0
S 296 / 11	RH32919	D5	115,5h	236,2
S 308 / 11	RH32919	D5	137h	166,9
S 320 / 11	RH32919	D5	161h	367,5
S 279 / 11	RH32924	Fed Batch	88,2h	18,1
S 291 / 11	RH32924	Fed Batch	115,5h	33,4
S 303 / 11	RH32924	Fed Batch	137h	41,9
S 315 / 11	RH32924	Fed Batch	161h	35,5
S 285 / 11	RH32924	D5	88,2h	113,6
S 297 / 11	RH32924	D5	115,5h	234,4
S 309 / 11	RH32924	D5	137h	284,1
S 321 / 11	RH32924	D5	161h	202,4
S 280 / 11	RH32926	Fed Batch	88,2h	88,8
S 292 / 11	RH32926	Fed Batch	115,5h	49,7
S 304 / 11	RH32926	Fed Batch	137h	72,8
S 316 / 11	RH32926	Fed Batch	161h	32,0
S 286 / 11	RH32926	D5	88,2h	111,9
S 298 / 11	RH32926	D5	115,5h	197,1
S 310 / 11	RH32926	D5	137h	255,7
S 322 / 11	RH32926	D5	161h	241,5
S 281 / 11	RH32927	Fed Batch	88,2h	28,4
S 293 / 11	RH32927	Fed Batch	115,5h	29,8
S 305 / 11	RH32927	Fed Batch	137h	24,1
S 317 / 11	RH32927	Fed Batch	161h	16,3
S 287 / 11	RH32927	D5	88,2h	58,2
S 299 / 11	RH32927	D5	115,5h	120,7
S 311 / 11	RH32927	D5	137h	133,2
S 323 / 11	RH32927	D5	161h	120,7
S 282 / 11	RH32928	Fed Batch	88,2h	25,6
S 294 / 11	RH32928	Fed Batch	115,5h	44,0
S 306 / 11	RH32928	Fed Batch	137h	51,8
S 318 / 11	RH32928	Fed Batch	161h	52,6
S 288 / 11	RH32928	D5	88,2h	158,0
S 300 / 11	RH32928	D5	115,5h	158,0

S 312 / 11	RH32928	D5	137h	174,0
S 324 / 11	RH32928	D5	161h	166,0
S 283 / 11	RH32929	Fed Batch	88,2h	36,9
S 295 / 11	RH32929	Fed Batch	115,5h	57,5
S 307 / 11	RH32929	Fed Batch	137h	66,8
S 319 / 11	RH32929	Fed Batch	161h	69,6
S 289 / 11	RH32929	D5	88,2h	124,3
S 301 / 11	RH32929	D5	115,5h	278,4
S 313 / 11	RH32929	D5	137h	348,3
S 325 / 11	RH32929	D5	161h	177,6

Tabelle 29: Mittels BLAST und PFAM gefundene, homologe Proteine aus der 2D-elektrophoretischen Analyse von *P. sapidus*

Spot-nummer	Genlokus JgijPleosPC9 	identifiziertes Protein	Spezies	e-value	Zuordnung über eine Proteinfamilie	e-value
351	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	<i>Pleurotus sapidus</i>	0		
354	101837	Ubiquitin	<i>L. bicolor</i>	2,00E-167		
371	86240	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	1,5	Ricin-Typ beta-Lectin domäne	1,60E-11
380	88329	Karbohydrat-binde Modul Familie 13 Protein	<i>L. bicolor</i>	4,00E-31		
382	114053	Cerato-Platanin ähnliches sekretiertes Protein	<i>L. bicolor</i>	6,00E-37	Cerato-platanin (*)	2,20E-50
383	80476	putative Cyclophillin	<i>Pleurotus sp.</i>	7,00E-88		
389	116196	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-103	Pektat Lyase	1,30E-62
390	52745	Peptidyl-Lys-Metalloendopeptidase	<i>C. molybdites</i>	3,00E-121		
395	100792	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	4,00E-03	Phosphotransferase Enzymfamilie	4,50E-07
396	116143	Laccase 1	<i>P. ostreatus</i>	0		
397	156060	hypothetisches Protein	<i>L. bicolor</i>	2,00E-39	GDSL-ähnliche Lipase/Acylhydrolase	7,90E-04
399	128248	hypothetisches Protein	<i>L. bicolor</i>	3,00E-60		
400	61738	Glykosid Hydrolase familie 12	<i>L. bicolor</i>	4,00E-71		
401	117691	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	1,00E-		

				21		
402	90424	hypothetisches Protein	<i>M. pernicioso</i>	4,00E-06	Glykosid Hydrolase Familie 61	6,70E-63
403	97339	hypothetisches Protein	<i>M. pernicioso</i>	1,00E-61	Glykosid Hydrolase Familie 61	6,70E-63
405	108781	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	6,00E-41		
406	122311	hypothetisches Protein	<i>M. pernicioso</i>	7,00E-99	Glykosid Hydrolase Familie 61	6,70E-63
407	84996	Endocellulase	<i>P. arcularius</i>	4,00E-91	Glykosid Hydrolase Familie 12	4,50E-33
408	122311	hypothetisches Protein	<i>M. pernicioso</i>	2,00E-98	Glykosid Hydrolase Familie 61	6,70E-63
409	116143	Laccase 1	<i>P. ostreatus</i>	0		
411	128966	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	0	Rhamnogalacturonase B, N-terminal	1,10E-91
412	61549	Arabinosidase	<i>A. tabescens</i>	6,00E-115	Glykosid Hydrolase Familie 43	7,20E-18
413	50696	hypothetisches Protein	<i>U. maydis</i>	2,00E-03		
414	110973	hypothetisches Protein	<i>L. bicolor</i>	1,00E-03		
415	116926	Kohlenhydrat Esterase Familie 8 Protein	<i>L. bicolor</i>	3,00E-113	Pektinesterase	6,00E-04
416	46813	Thaumatococcus-like Protein	<i>L. bicolor</i>	3,00E-119	Thaumatococcus Familie (**)	6,10E-59
417	67014	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-96	Pektat Lyase	2,20E-37
418	67014	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-96	Pektat Lyase	2,20E-37
420	156060	hypothetisches Protein	<i>L. bicolor</i>	2,00E-39	GDSL-ähnliche Lipase/Acylhydrolase	7,90E-04
421	76980	hypothetisches Protein	<i>M. pernicioso</i>	3,00E-46		
423	64582	Endoglucanase	<i>V. voluacea</i>	5,00E-149	Glykosid Hydrolase Familie 5	1,20E-43
425	83989	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-104	Pektat Lyase	6,60E-35
427	50696	hypothetisches Protein	<i>U. maydis</i>	2,00E-03		
429	83989	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-104	Pektat Lyase	6,60E-35
432	71759	Peptidase 1	<i>P. ostreatus</i>	0	Subtilase Familie (S8)	8,60E-42
433	83989	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	4,00E-	Pektat Lyase	2,90E-

				108		39
434	83989	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	4,00E-108	Pektat Lyase	2,90E-39
436	82945	Glykosid Hydrolase Familie 16 Protein	<i>L. bicolor</i>	2,00E-107		
439	56431	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	8,00E-77	Glykosid Hydrolase Familie 61	4,20E-52
440	87575	Peptidase 1	<i>P. ostreatus</i>	1,00E-130	Subtilase Familie (S8)	8,60E-42
441	87575	Peptidase 1	<i>P. ostreatus</i>	1,00E-130	Subtilase Familie (S8)	8,60E-42
443	45547	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-96	Glykosid Hydrolase Familie 43	7,30E-18
444	88371	Aminopeptidase	<i>A. bisporus</i>	1,00E-144	Peptidase Familie M28	1,90E-29
445	116196	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-103	Pektat Lyase	1,30E-62
446	83989	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-104	Pektat Lyase	6,60E-38
450	116926	Kohlenhydra Esterase Familie 8 Protein	<i>L. bicolor</i>	3,00E-113	Pektinesterase	9,60E-36
451	77872	hypothetisches Protein	<i>M. perniciososa</i>	3,00E-56		
452-456	45206	Cellobiohydrolase II-I	<i>V. volvacea</i>	0	Glykosid Hydrolase Familie 6	8,60E-117
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	4,00E-15
457	78619	hypothetisches Protein	<i>M. perniciososa</i>	2,00E-16		
458	83989	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	5,00E-100	Pektat Lyase	5,60E-36
459	126566	Cellobiohydrolase II-I	<i>V. volvacea</i>	0	Glykosid Hydrolase Familie 6	8,60E-117
	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	<i>Pleurotus sapidus</i>	0		
461-462	89918	Endo-1,6-alpha-Mannosidase	<i>L. bicolor</i>	2,00E-128		
463	91073	hypothetisches Protein	<i>M. perniciososa</i>	0		
464	116896	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-124		
465	116196	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-103	Pektat Lyase	1,30E-62
466	116196	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-104	Pektat Lyase	6,60E-35
467	58117	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-	Rhamnogalacturonase B, N-	1,10E-

				148	terminal	91
468-469	89740	Xylanase	<i>P. ostreatus</i>	4,00E-122	Glykosid Hydrolase Familie 11	1,70E-79
471	116926	Kohlenhydrat Esterase Familie 8 Protein	<i>L. bicolor</i>	3,00E-113	Pektinesterase	9,60E-36
472	778722	hypothetisches Protein	<i>M. perniciososa</i>	3,00E-56		
473	130231	Cellobiohydrolase	<i>A. bisporus</i>	5,00E-94	Glykosid Hydrolase Familie 6	
476-477	115140	Aspartyl Peptidase	<i>L. bicolor</i>	1,00E-114		
478	115581	Glykosid Hydrolase Familie 72 Protein	<i>L. bicolor</i>	0	Glykosid Hydrolase Familie 72 (*) Xb Domäne	
481	125269	Endoglucanase	<i>P. chrysosporium</i>	1,00E-146	Glykosid Hydrolase Familie 5	4,40E-50
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,70E-14
482	60171	hypothetisches Protein	<i>L. bicolor</i>	0		
484	82044	hypothetisches Protein	<i>M. perniciososa</i>	2,00E-47	Pektat Lyase	1,10E-03
485	64582	Endoglucanase	<i>V. volvacea</i>	5,00E-149	Glykosid Hydrolase Familie 5	1,20E-43
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,80E-10
486-487	116971	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	6,00E-135	FAD Binde-Domäne	7,70E-26
488	126936	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	6,00E-111	pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,10E-11
489	117351	Acetyl-Xylan Esterase	<i>V. volvacea</i>	1,00E-124	Esterase PHB Depolymerase	2,60E-27
489					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,90E-14
490	100231	Cellobiohydrolase	<i>S. commune</i>	0		
491-493	45206	Cellobiohydrolase II-I	<i>V. volvacea</i>	0	Glykosid Hydrolase Familie 6	8,60E-117
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,10E-11
494	51443	CEL4b Mannanase	<i>A. bisporus</i>	2,00E-146		
495	83972	hypothetisches Protein	<i>L. bicolor</i>	0		
496	82770	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	3,00E-71	HP Superfamilie/ Saure Phosphatase	1,00E-04

500-502	117351	Acetyl-Xylan Esterase	<i>V. volvacea</i>	1,00E-124		
503	113478	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	1,00E-122	Aldose Epimerase	1,00E-42
504	54867	Galactan 1,3-beta-galactosidase	<i>P. chrysosporium</i>	0	Glykosid Hydrolase Familie 46	2,70E-18
					Kohlenhydrat Bind- Domäne	3,20E-05
506	113478	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	1,00E-122	Aldose Epimerase	1,00E-42
507	54867	Galactan 1,3-beta-galactosidase	<i>P. chrysosporium</i>	0	Glykosid Hydrolase Familie 46	2,70E-18
					Kohlenhydrat Bind- Domäne	3,20E-05
508	88922	hypothetisches Protein	<i>L. bicolor</i>	2,00E-120		
510-511	83969	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	4,00E-108	Pektat Lyase	2,90E-39
512	58117	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	2,00E-148	Rhamnogalacturonase B, N-terminal	1,10E-91
514	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	<i>Pleurotus sapidus</i>	0		
515	85079	Glykosid Hydrolase Familie 5 Protein	<i>L. bicolor</i>	5,00E-68		
516	89439	hypothetisches Protein	<i>M. perniciosus</i>	5,00E-35	Peptidase Familie M28	1,60E-22
517	62103	Cellobiose Dehydrogenase	<i>G. frondosa</i>	0		
518-520	128966	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	0	Rhamnogalacturonase B, N-terminal	3,10E-80
521	89214	Kupfer Radikal Oxidase	<i>P. chrysosporium</i>	2,00E-157	Glyoxaloxidase N-terminal	1,70E-50
522	81117	Phenoloxidase 2	<i>P. ostreatus</i>	0		
523	47295	Cellulose 1,4-beta-cellobiosidase Vorläufer	<i>Pleurotus sp.</i>	0	Glykosid Hydrolase Familie 7	8,60E-117
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,10E-11
524	81117	Phenoloxidase 2	<i>P. ostreatus</i>	0		
525	114510	Arylalkohol Oxidase	<i>P. eryngii</i>	5,00E-119		
527-528	124117	Glykosid Hydrolase Familie 15 Protein	<i>L. bicolor</i>	0	Glykosid Hydrolase Familie 15	5,00E-102
					Stärke Binde-Domäne	3,00E-27

529	57949	hypothetisches Protein	<i>L. bicolor</i>	0		
533-534	110973	hypothetisches Protein	<i>P. placenta</i>	1,00E-60	Glykosid Hydrolase Familie 28	9,70E-05
536	90219	Glykosid Hydrolase Familie 27 Protein	<i>L. bicolor</i>	1,00E-140	Melibiose	6,50E-02
	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	<i>Pleurotus sapidus</i>	0		
537-538	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	<i>Pleurotus sapidus</i>	0		
539	50696	hypothetisches Protein	<i>U. maydis</i>	2,00E-03		
540	50696	hypothetisches Protein	<i>U. maydis</i>	2,00E-03		
541-542	89668	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	7,00E-111	Acetyl-Xylan Esterase	0,044
543	94793	hypothetisches Protein	<i>C. cinerea</i>	0	Alpha-L-Arabinofuranosidase	5,00E-11
544-545	115581	Glykosid Hydroase Familie 72 Protein	<i>L. bicolor</i>	0		
546-547	62166	Glyoxal Oxidase	<i>L. bicolor</i>	0	Glyoxaloxidase N-terminal	1,60E-35
548-549	116309	Arylalkohol Oxidase Vorläufer	<i>P. eryngii</i>	0		
551	65411	hypothetisches Protein	<i>M. perniciosa</i>	3,00E-132	Alpha-Amylase	3,00E-21
					Stärke Binde-Domäne	2,00E-25
555	114098	Exo-beta-1,3-glucanase	<i>L. edodes</i>	0		
558	98024	Glykosid Hydrolase Familie 3 Protein	<i>L. bicolor</i>	0		
559	116143	Laccase 2	<i>Pleurotus sapidus</i>	0		

10 Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
AAO	Arylkoholoxidase
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
APO	aromatische Peroxidase
CAN	Acetonitril
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
cDNA	copy-DNA
CBD	Glucosebindedomäne
cbh	Cellubiohydrolase
Cell/Xyl	Cellulase/Xylanase Mix aus <i>T. reesei</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHCA	α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure
CUR	Curtain gas
C-X	siehe Cell/Xyl
d	Tag
D	Dyp-Typ Peroxidase aus <i>P. sapidus</i>
DAD	Dioden Array Detector
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DNA	Desoxyriobonukleinsäure
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfonyloxid
DP	Declustering Potential
DTP	DyP-Typ Peroxidase
DTT	Dithiothreitol
DyP	Dye-decolorizing Peroxidase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Umweltfaktor
EP	Entrance Potential
EPS	Esterase aus <i>P. sapidus</i>
ESI-MS/MS	Elektronenspray-Ionisation/Tandem-Massenspektrometrie
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Nukleotid
FP	Focussing potential
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung : 9,81 m s ⁻²
GC/MS	Gas chromatography-mass spectrometry
GDS(L)	Aminosäuremotif in Lipasen
GS1	Ion source gas 1
GS2	Ion source gas 2
HBT	1-Hydroxybenzotriazol
HIC	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie
His	Histidin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detection</i>
HPSEC	<i>High Performance Size Exclusion Chromatography</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IHI	Internationales Hochschul Institut
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IS	Ion spray
k_{cat}	Katalytische Wechselzahl
kDa	Kilodalton
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
L	Laccase
LC	Liquid Chromatography
LCK	Lignocellulosekomplex
LC/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LCB	Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
LiP	Ligninperoxidase
M (MspI)	Dyp-Typ-Peroxidase aus <i>Mycetinis scorodonius</i> (Maxibright®, DSM)
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i>
MBP	Maltose-Binde Protein
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MI	Massenindex
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekülgewicht
n. b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NEPHGE	Nonequilibrium pH Gel Electrophoresis
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
o. g.	oben genannt
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEI	Gesamtbewertungszahl für einen Prozess
PFF	Peptid-Fragmentierungs-Fingerabdruckspektrum
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	Peptid-Massen-Fingerabdruckspektrum
POS	<i>Pleurotus ostreatus</i>
PSA	<i>Pleurotus sapidus</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHE	Safety, Health and Environment
SNL	Standardnährlösung
sp.	Spezies
TFA	<i>Trifluoressigsäure</i>

TMCS	Trimethylchlorsilan
U	Unit (Enzymeinheit)
UBZ	Umweltbewertungszahl
Ü	Überstand
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichts
VA	Veratrylalkohol
VP	polyvalente Peroxidase
W(IC)	Wichtungskoeffizient
XPO	<i>Xylaria polymorpha</i>
XpoFAE	Feruloyl-Esterase aus <i>X. polymorpha</i>
XpoLAC	Laccase aus <i>X. polymorpha</i>
YNB	Yeast Nitrogen Based
YP	Yeast Pepton