

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt

**„Entwicklung eines effizienten Zwei-Enzym-Systems
aus einer Arylalkohol-Oxidase und einer Peroxidase zum
umweltschonenden und sicheren Aufschluss von
Lignocellulose“**

gefördert durch die



Deutsche Bundesstiftung Umwelt

Aktenzeichen: 29938-32

Verfasser: Prof. Dr. H. Zorn, C. Lauber, I. Galperin, Prof. Dr. M. Rühl (Justus-Liebig Universität Gießen); Dr. M. Suckow, Dr. M. Piontek, Dr. M. Piontek (ARTES Biotechnology, Langenfeld);

Projektbeginn: 01.04.2012

Laufzeit : 31.03.2014

Gießen/Langenfeld 2014

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
2	ANLASS UND ZIELSETZUNG	5
3	ERGEBNISSE	6
3.1	REKOMBINANTE DARSTELLUNG EINER ARYLALKOHOL-OXIDASE (AAO)UND EINER DYP-TYP PEROXIDASE	6
3.1.1	AAO Produktion in <i>E. coli</i>	6
3.1.2	Produktion in <i>H. polymorpha</i>	8
3.1.3	Produktion in einem Basidiomyceten	9
3.1.4	Transformation von <i>P. sapidus</i> mit verschiedenen Selektionsplasmiden	10
3.1.5	Rekombinante Darstellung der AAO in <i>C. cinerea</i>	11
3.1.6	Aufreinigung der in <i>C. cinerea</i> exprimierten AAO.....	11
3.1.7	Produktion einer DyP in <i>C. cinerea</i>	13
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINANTEN AAO AUS <i>E. COLI</i>	16
3.2.1	Bestimmung des pH-Optimums.....	17
3.2.2	Bestimmung des Temperaturoptimums.....	18
3.2.3	Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und k_{cat}	18
3.3	OPTIMIERUNG DES ZWEI-ENZYM-SYSTEMS ZUR OXIDATION VON DMP.....	20
3.4	OPTIMIERUNG DES ZWEI-ENZYM-SYSTEMS ZUR OXIDATION VON ANNATTO	23
3.4.1	Bleichung von Molke mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems	24
4	DISKUSSION	25
5	ÖFFENTLICHKEITSARBEIT	27
6	FAZIT	27
7	LITERATUR	28

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: (links) Die Aminosäuresequenz (ASS) von 22 möglichen AAOs aus *C. cinerea* (Cop) wurden mit AAOs aus *Pleurotus eryngii* (PER) und *P. sapidus* (Icb_AAO_PS) verglichen (aligned). Die für *C. cinerea* spezifischen ASS wurden für die Peptidsynthese und Antikörperproduktion verwendet. (rechts) Eine dreidimensionale Proteinstruktur der *P. sapidus* AAO wurde mit Hilfe von SWISS-MODEL auf der Grundlage der Kristallstruktur der *P. eryngii* AAO (3FIM) berechnet (Fernández et al. 2009). 7
- Abb. 2: Western Blot der rekombinanten Arylalkoholoxidase. **A:** rückgefaltete AAO* (1), Marker - PageRuler Plus prestained protein ladder, Fermentas (M). **B:** rückgefaltete AAO* (1), unter Coexpression mit Chaperonen exprimierte AAO nach Zellaufschluss in der löslichen Fraktion (2), Marker – Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas (M) 7
- Abb. 3: Vergleich der AAO-Gehalte von Gesamtzellextrakt und intrazellulärer löslicher und unlöslicher Fraktion von Stamm RB11/pFPMT-H1-M-AAO(28-593)-H6 # 11-11. Stamm 11-11 wurde im 3ml-Reagenzmaßstab für 48 Std. bei 37°C und 180rpm in Phosphat-gepuffertem YP/YNB (pH6 mit 0,1M KPi) kultiviert.. Anschließend wurden Gesamtzellextrakt sowie intrazelluläre lösliche und unlösliche Fraktion präpariert. Das Pellet der intrazellulären unlöslichen Fraktion wurde im Volumen der zugehörigen löslichen Fraktion in Probenpuffer rückgelöst. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (reduzierende Bedingungen) und Western Blot analysiert. Die Produktbande ist mit einem Pfeil markiert. 9
- Abb. 4: Expressionsplasmid für die AAO (pYIG1) and DyP (pYIG2). *gpdII* – Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Agaricus bisporus*; f1(+) Replikationsursprung (origin of replication) für einzelsträngige Replikation; *ura3* – Uracil Marker für Hefe Auxotrophie; 2µm ori – Replikationsursprung für *Saccharomyces cerevisiae*; *ampR* – Ampicillin Resistenz Gen; oriEC – Replikationsursprung für *E. coli*; *pab1* – p-Aminobenzoesäure-Synthase..... 10
- Abb. 5: AAO-Aktivität von 5 pYIG1-Transformanten (1-1-x) und 2 Kontroll-Transformanten (pCc1001) in YMG Flüssigkulturen..... 11
- Abb. 6: Größenausschlusschromatographie (SEC): UV-Chromatogramm (blau), Fraktionen A1 bis D6 und AAO-Aktivität (lila) der einzelnen Fraktionen..... 12
- Abb. 7: SDS-PAGE (oben) und Western Blot (unten) von Reinigungsschritten der AAO: Kulturüberstand (1), nach Cross-Flow Filtration (2), nach IEX (3) und Fraktionen B4-C2 (4-8) der SEC (vgl. Abb. 5), sowie des Markers (Prestained Protein Ladder, M)..... 13
- Abb. 8: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten einiger pYIG2 Transformanten, neg. Kontrolle, pos. Kontrolle 14
- Abb. 9: Peroxidase-Aktivität (ABTS) in Kulturüberständen von pYIG2 Transformanten und drei Kontroll-Transformanten (P.3-x-Kontrolle), die bei 24 °C und 37 °C kultiviert wurden..... 15
- Abb. 10: Peroxidase-Aktivität (β -Carotin-Assay) in Kulturüberständen von pYIG2 Transformanten und drei Kontroll-Transformanten (P.3-x-Kontrolle), die bei 24 °C und 37 °C kultiviert wurden..... 16
- Abb. 11: Das pH-Optimum der rückgefalteten AAO* wurde mit Veratryalkohl als Substrat und verschiedenen Puffern bestimmt. 17
- Abb. 12: Mit Hilfe des AAO*-Assays wurde die Abhängigkeit der AAO-Aktivität von der Temperatur untersucht. 18
- Abb. 13: Cornish-Bowden-Diagramme zur Herleitung der enzymkinetischen Parameter. Aufgetragen ist die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von

der Substratkonzentration. Die Diagramme wurden mit OrginPro 8.6 erstellt und die Sättigungshyperbel mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung $V = \frac{V_{max} \times X}{K_M + X}$ an die Messdaten angepasst.....	19
Abb. 14: Umsatz von DMP durch das AAO*-DyP-Zwei-Enzym-System in 50 mM Natriumacetatpuffer bei pH 4,5 und 30 °C und die DyP mit H ₂ O ₂ bzw. ohne H ₂ O ₂ im Vergleich.....	22
Abb. 15: Parallel zum DMP-Umsatz gemessene Oxidation von Veratrylalkohol im AAO*-DyP-Zwei-Enzym-System bzw. DyP mit und ohne H ₂ O ₂ im Vergleich..	22
Abb. 16: Abbau des Farbstoffs Annatto bei pH 4,5 durch das AAO-DyP-Zwei-Enzym-System und durch die DyP mit H ₂ O ₂ im Vergleich. Ohne die Zugabe von H ₂ O ₂ wurde kein Umsatz durch die Dyp detektiert.	23
Abb. 17: Parallel zum Annatto-Abbau gemessene Oxidation von Veratrylalkohol im AAO-DyP-Zwei-Enzym-System bzw. DyP mit H ₂ O ₂ im Vergleich.	24
Abb. 18: Bleichung der gefärbten Molke bzw. des gefärbten Puffers mittels Zwei-Enzym-System und Vergleich mit der Positivkontrolle (Zugabe von H ₂ O ₂) und der ungefärbten Molke.....	25

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reinigung der AAO aus dem Kulturüberstand des Transformanten 1-1-512	
Tabelle 2: Kinetische Parameter für die rekombinante (<i>E. coli</i>) und rückgefaltete AAO* aus <i>P. sapidus</i> sowie im Vergleich die Konstanten für die rekombinante (<i>E. coli</i>) und rückgefaltete AAO* aus <i>P. eryngii</i> und die Wildtyp AAO aus <i>P. eryngii</i>	20
Tabelle 3: Zwei-Enzymassay für DMP optimiert.....	21
Tabelle 4: Zwei-Enzymassay für Annatto optimiert.....	23

1 Zusammenfassung

Im Projekt „Entwicklung eines effizienten Zwei-Enzym-Systems aus einer Arylalkohol-Oxidase und einer Peroxidase zum umweltschonenden und sicheren Aufschluss von Lignocellulose“ wurde eine Arylalkohol-Oxidase aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* in drei verschiedenen Wirtsorganismen, dem Bakterium *E. coli*, der Hefe *Hansenula polymorpha* und dem Basidiomyceten *Coprinopsis cinerea* rekombinant dargestellt. Dabei konnten die höchsten Aktivitätsausbeuten von ca. 90 U L⁻¹ mit dem Basidiomyceten *C. cinerea* erzielt werden. Die Klonierung der für das zweite Enzym, eine Dyp-Typ Peroxidase (DyP) aus *P. sapidus*, kodierenden DNA, in *C. cinerea* verlief zwar positiv, jedoch konnten keine Aktivitätsunterschiede hinsichtlich des DyP spezifischen Substrates β -Carotin zwischen DyP-Transformanten und Kontroll-Transformanten festgestellt werden. Daher wurde für die Abstimmungsversuche des Zwei-Enzym-Systems die von der Firma AB Enzymes (Darmstadt, Deutschland) heterolog in *T. reesei* produzierte DyP verwendet. Dabei konnte nach Optimierungsversuchen gezeigt werden, dass das Zwei-Enzym-System das Ligninmodellsubstrat Syringol (DMP, 2,6-Dimethoxyphenol) über einen längeren Zeitraum oxidieren konnte als das einfache System bestehend aus der Peroxidase und dem benötigten Cofaktor H₂O₂. Das hinsichtlich Syringol optimierte Zwei-Enzym-System wurde anschließend auch zur technischen Bleichung von mit β -Carotin gefärbter Molke eingesetzt. Auch hier zeigte sich der deutliche Vorteil gegenüber dem einfachen Enzym-System bestehend aus DyP und H₂O₂.

2 Anlass und Zielsetzung

Lignocellulosen, komplexe Materialien aus den beiden am häufigsten in der Natur vorkommenden Polymeren Cellulose/Hemicellulose und Lignin, sind in der Natur ubiquitär nachwachsende Rohstoffe (Holz, Stroh). Basidiomyceten sind in der Lage, auf diesen komplexen Materialien durch Sekretion geeigneter Lignin-abbauender (lignolytische) Enzyme zu wachsen. Die wichtigsten Vertreter dieser lignolytischen Enzyme sind Peroxidasen, die Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Cofaktor benötigen. In der Natur wird dieses durch andere Enzyme, wie z.B. Arylalkohol-Oxidasen (AAO) zur Verfügung gestellt. Bei technischen Applikationen, in denen Peroxidasen zum

Einsatz kommen, muss dem System instabiles und ggf. explosives H_2O_2 sequentiell zugeführt werden. Gegenstand dieses Projekts ist daher die Etablierung eines Zwei-Enzym-Systems bestehend aus einer DyP-Typ Peroxidase (DyP) und einer AAO. Dabei wird neben der Abstimmung beider Enzyme aufeinander besonderes Augenmerk auf die gemeinsame rekombinante Produktion der AAO und der DyP gelegt. Ziel ist es, die Koexpression beider Enzyme in einer Zelle zu erreichen und H_2O_2 als Nebenprodukt der AAO-vermittelten Reaktion als Cosubstrat für die DyP verfügbar zu machen.

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Darstellung einer Arylalkohol-Oxidase (AAO) und einer Dyp-Typ Peroxidase

Das Gen *aao*, das für eine Arylalkoholoxidase (AAO) aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* codiert, wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert, um eine rekombinante Darstellung in einem Prokaryoten (*E. coli*), einem Ascomyceten (*Hansenula polymorpha*) und einem Basidiomyceten (*P. sapidus*, *Coprinopsis cinerea*) zu ermöglichen. Des Weiteren wurde die genomische Sequenz der Dyp-Typ Peroxidase (DyP) aus *P. sapidus* in einem Expressionsvektor für die rekombinante Darstellung in einem Basidiomyceten kloniert.

3.1.1 AAO Produktion in *E. coli*

Bereits im ersten Jahr des geförderten Vorhabens konnte mit Hilfe des pCold-Systems unter Verwendung der Vektoren pGro7 (Chaperonplasmid) und pColdI-AAO-K5⁻ (Expressionsplasmid) die AAO in *E. coli* rekombinant hergestellt werden. Mit diesem System konnte die Löslichkeit des Zielproteins gegenüber anderen getesteten Expressionssystemen zwar erhöht werden, dennoch wurde die rekombinante AAO hauptsächlich in *inclusion bodies* eingeschlossen. Die Reinigung des Zielproteins erfolgte daher unter denaturierenden Bedingungen, um ausreichende Mengen AAO für eine Rückfaltung und anschließende Charakterisierung zu gewinnen. Der Western Blot zum Nachweis der *P. sapidus* AAO wurde im Anschluss an eine native PAGE bzw. denaturierende PAGE durchgeführt. Für die Herstellung des Antiserums wurde ein exponierter Proteinbereich auf Basis

des Strukturmodells der AAO und Homologieuntersuchungen mit 22 mutmaßlichen AAOs aus *C. cinerea*, der AAO aus *Pleurotus eryngii* und der *P. sapidus* AAO ausgewählt und die Aminosäuresequenz NQSFDNLFDRDSSEFNA als Antigen determinante bestimmt (Abb. 1). Die Synthese des Peptids und die Produktion der Antikörper in Kaninchen wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt.

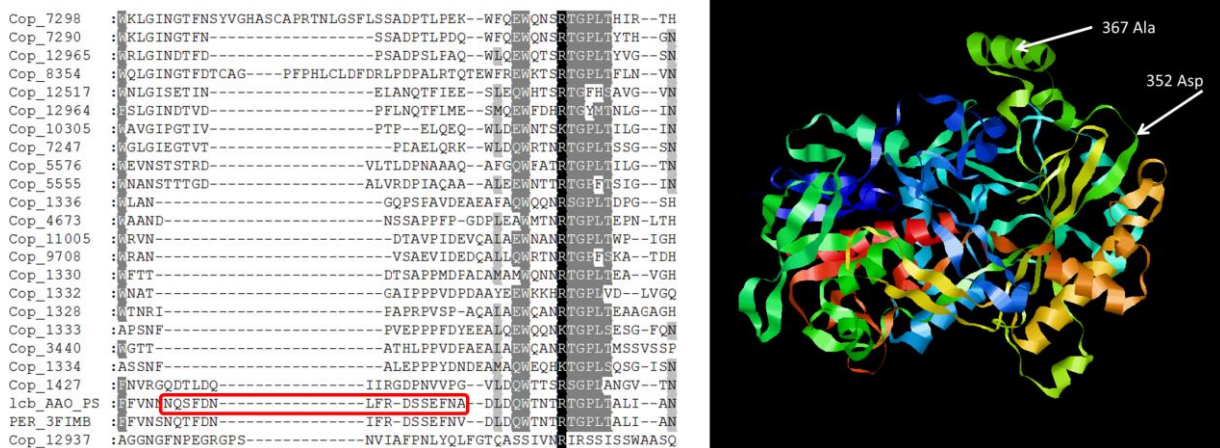


Abb. 1: (links) Die Aminosäuresequenz (ASS) von 22 möglichen AAOs aus *C. cinerea* (Cop) wurden mit AAOs aus *Pleurotus eryngii* (PER) und *P. sapidus* (lcb_AAO_PS) verglichen (aligned). Die für *C. cinerea* spezifischen ASS wurden für die Peptidsynthese und Antikörperproduktion verwendet. (rechts) Eine drei-dimensionale Proteinstruktur der *P. sapidus* AAO wurde mit Hilfe von SWISS-MODEL auf der Grundlage der Kristallstruktur der *P. eryngii* AAO (3FIM) berechnet (Fernández et al. 2009).

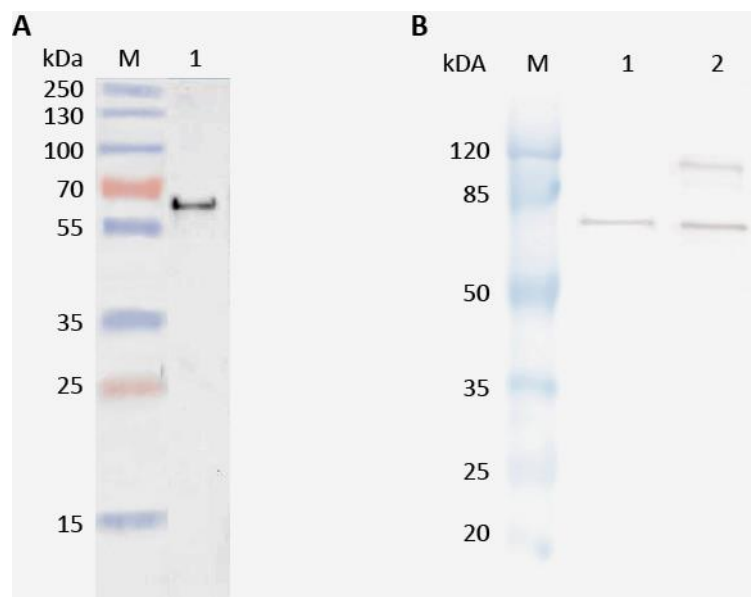


Abb. 2: Western Blot der rekombinanten Arylalkoholoxidase. **A:** rückgefaltete AAO* (1), Marker - PageRuler Plus prestained protein ladder, Fermentas (M). **B:** rückgefaltete AAO* (1), unter Coexpression mit Chaperonen exprimierte AAO nach Zellaufschluss in der löslichen Fraktion (2), Marker - Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas (M)

Die in *E. coli* exprimierte und rückgefaltete AAO (AAO*) aus *P. sapidus* wurde mittels Western Blot und AAO-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 2). Die gereinigte AAO* wurde im Western Blot selektiv mit einem Molekulargewicht von ca. 63 kDa nachgewiesen. Das rekombinante Enzym wurde nativ, wie auch denaturiert mittels Western Blot detektiert. Die nach dem Strukturmodell ausgewählte Antigen determinante befindet sich demnach an der Oberfläche des Enzyms, so dass eine Antikörperbindung auch am nativen Enzym möglich ist.

Auch die unter Coexpression der Chaperone (GroEL/GroES-Triggerfaktor) produzierte AAO wurde spezifisch mittels Antikörper in der löslichen Fraktion detektiert. Allerdings wurde hier auch eine weitere Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 126 kDa nachgewiesen. Dabei könnte es sich um dimere Aggregate der AAO handeln. In gereinigter Form liegt die AAO dauerhaft als Monomer vor. Im Gegensatz dazu neigt das Enzym, wenn es nach dem Zellaufschluss ungereinigt gelagert wird, dazu zu dimerisieren.

3.1.2 Produktion in *H. polymorpha*

Die im ersten Jahr des Vorhabens durchgeführte cytosolische als auch sekretorische Darstellung der AAO in der Hefe *H. polymorpha* lieferte unterschiedliche Ergebnisse. So konnte bei der sekretorischen Expression keine AAO nachgewiesen werden, wohingegen bei der cytosolischen Expression mit Hilfe des His-Tags positive Transformanten detektiert wurden (Abb. 3). Allerdings waren die Aktivitäten der rekombinanten AAO geringer als in *E. coli*, so dass von einer weiteren Optimierung der *H. polymorpha* Transformanten abgesehen wurde.

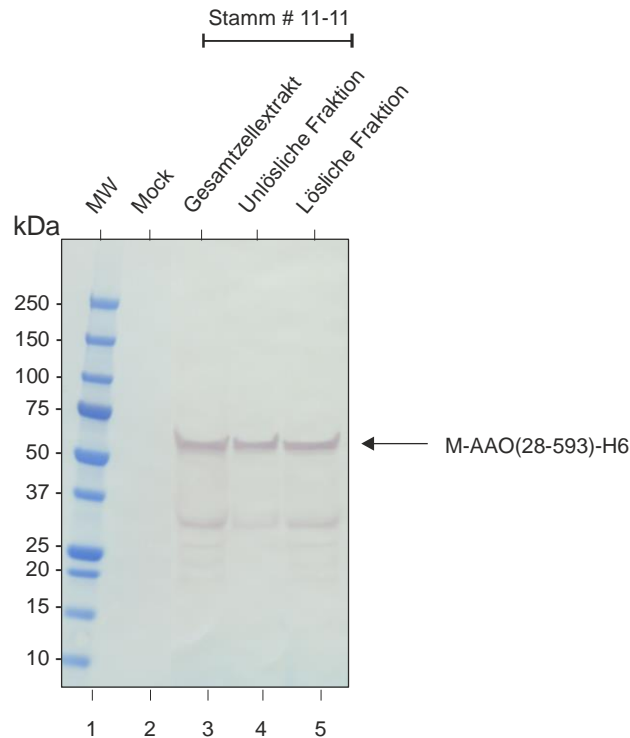


Abb. 3: Vergleich der AAO-Gehalte von Gesamtzellextrakt und intrazellulärer löslicher und unlöslicher Fraktion von Stamm RB11/pFPMT-H1-M-AAO(28-593)-H6 # 11-11. Stamm 11-11 wurde im 3ml-Reagenzmaßstab für 48 Std. bei 37°C und 180rpm in Phosphat-gepuffertem YP/YNB (pH6 mit 0,1M KPi) kultiviert.. Anschließend wurden Gesamtzellextrakt sowie intrazelluläre lösliche und unlösliche Fraktion präpariert. Das Pellet der intrazellulären unlöslichen Fraktion wurde im Volumen der zugehörigen löslichen Fraktion in Probenpuffer rückgelöst. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (reduzierende Bedingungen) und Western Blot analysiert. Die Produktbande ist mit einem Pfeil markiert.

3.1.3 Produktion in einem Basidiomyceten

Um die aufwendige Isolierung und Rückfaltung der AAO aus *E. coli* zu umgehen, wurde bereits Ende des ersten Jahres mit der rekombinanten Darstellung der AAO in einem Basidiomyceten begonnen. Dazu wurden die für die *P. sapidus* AAO und DyP kodierenden Gene jeweils in einen bereits für Laccasen positiv getesteten Expressionsvektor kloniert (Kilaru et al. 2006). Dieses Plasmid enthält einen konstitutiven Promoter aus dem Champignon, *Agaricus bisporus*, der bei verschiedensten Transformationen von Enzymen aus Basidiomyceten positive Ergebnisse liefert. Die beiden so generierten Plasmide pYIG1 und pYIG2 wurden als Expressionsvektoren bei den Transformationsversuchen eingesetzt (Abb. 4).

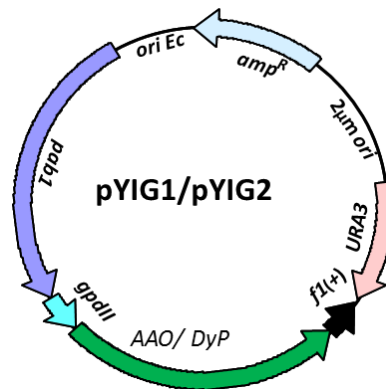


Abb. 4: Expressionsplasmid für die AAO (pYIG1) and DyP (pYIG2). *gpdlI* – Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Agaricus bisporus*; *f1(+)* Replikationsursprung (origin of replication) für einzelsträngige Replikation; *ura3* – Uracil Marker für Hefe Auxotrophie; *2µm ori* – Replikationsursprung für *Saccharomyces cerevisiae*; *ampR* – Ampicillin Resistenz Gen; *oriEC* – Replikationsursprung für *E. coli*; *pab1* – p-Aminobenzoesäure-Synthase

3.1.4 Transformation von *P. sapidus* mit verschiedenen Selektionsplasmiden

Zur rekombinanten Produktion der DyP und AAO in *P. sapidus* (homologe Expression) musste ein Selektionsmarker gefunden werden. Da es bisher keinen auxotrophen *P. sapidus* Stamm gibt, wurden verschiedene, das Hygromycin Resistenzgen (Hygromycin B Phosphotransferase *hygB*) enthaltende Plasmide eingesetzt (pVV26, pBSH-TEFF; Zuccaro et al. 2009). Die Transformation von *P. sapidus* wurde auf Grundlage des bereits im Labor etablierten *C. cinerea* Transformationsprotokolls von Dörnte und Kues (2012), basierend auf der PEG-vermittelten Transformation von Binnering et al. (1987) durchgeführt. Dabei wurde anstelle der bei *P. sapidus* fehlenden Konidiosporen vegetatives Myzel verwendet. Mit beiden Plasmiden konnten leider keine positiven Transformanten erzeugt werden. Daher wurde wie bereits für pYIG1 und pYIG2 beschrieben, das Hygromycin Resistenzgen *hygB* aus dem Plasmid MV3 (ARTES Biotechnology) amplifiziert und anschließend über homologe Rekombination in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* in das linearisierte Plasmid pYSK7 eingebracht. Das so erhaltene Plasmid pYIG3 wurde für einen weiteren Transformationsversuch in *P. sapidus* und parallel in dem Tintling *C. cinerea* verwendet. Auch hierbei konnten für beide Basidiomyceten keine positiven Transformanten generiert werden. Ein weiteres bereits im Speisepilze *A. bisporus* positiv verwendetes Plasmid (pBGgHg, Chen et al. 2000) erbrachte ebenfalls keine positiven Transformanten. Daher wurde für die Expression von AAO und DyP ein bereits etabliertes Transformationssystem im Basidiomyceten *C. cinerea* verwendet. Der für die Transformation verwendete *C. cinerea* Stamm FA2222 hat eine

Tryptophan-Auxotrophie, die sich durch den Selektionsvektor pCc1001 (*trp*⁺, Binninger et al. 1987) kompensieren lässt.

3.1.5 Rekombinante Darstellung der AAO in *C. cinerea*

Das Plasmid pYIG1 (AAO) wurde zusammen mit dem Selektionsvektor pCc1001 (*trp*⁺) in *C. cinerea* transformiert. Mittels PCR positiv getestete Klone wurden in Flüssigkulturen auf ihre AAO-Aktivität getestet. Dabei konnten im Kulturüberstand des Transformanten pYIG1-1-5 Aktivitäten von bis zu 90 U L⁻¹ erzielt werden (Abb. 5).

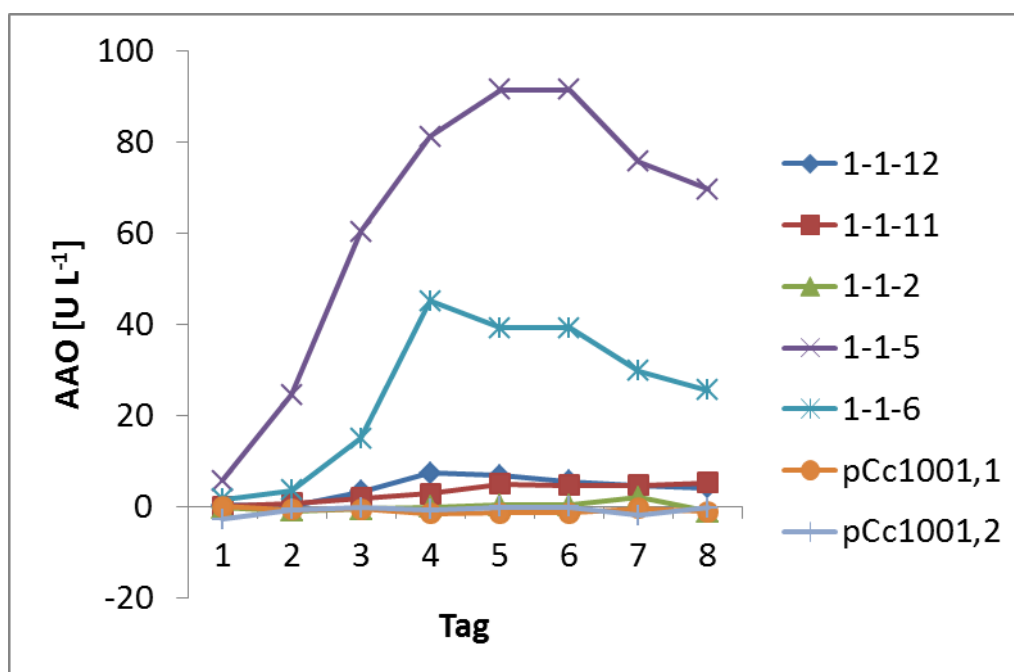


Abb. 5: AAO-Aktivität von 5 pYIG1-Transformanten (1-1-x) und 2 Kontroll-Transformanten (pCc1001) in YMG Flüssigkulturen

3.1.6 Aufreinigung der in *C. cinerea* exprimierten AAO

Um eine ausreichende Menge rekombinanter AAO zur Verfügung zu haben, wurde der AAO-Transformant 1-1-5 in einem Bioreaktor für 6 Tage kultiviert. Der Kulturüberstand wurde vom Myzel getrennt und große Moleküle mittels Cross-Flow Filtration (> 300 kDa) entfernt. Anschließend wurde die AAO über eine Anionenaustausch-chromatographie (IEX) und eine Größenausschlusschromatographie (SEC, Abb. 6) mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) gereinigt (Tabelle 1). Dabei konnte die spezifische Aktivität um den Faktor 9,1 erhöht werden. Die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot (Abb. 7) zeigt eine deutliche

Reduktion der Anzahl der Banden und bestätigt somit die nach der SEC erhöhte spezifische AAO-Aktivität. Im Western Blot wurden nach der SEC zwei Banden von ca. 62 kDa und 84 kDa detektiert. Die 62 kDa Bande entspricht in etwa dem kalkulierten Molekulargewicht von 64 kDa, bzw. der rekombinanten *E. coli* AAO-Bande von 63 kDa (Abb. 2). Die größere Bande könnte eine verstärkte Glycosidierung des rekombinanten Enzyms darstellen. Versuche zur Deglycosidierung der AAO sind geplant. Weiterhin wurden bereits beide Banden aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten, welche nach tryptischem Verdau per ESI-LC-MS/MS ansequenziert werden sollen.

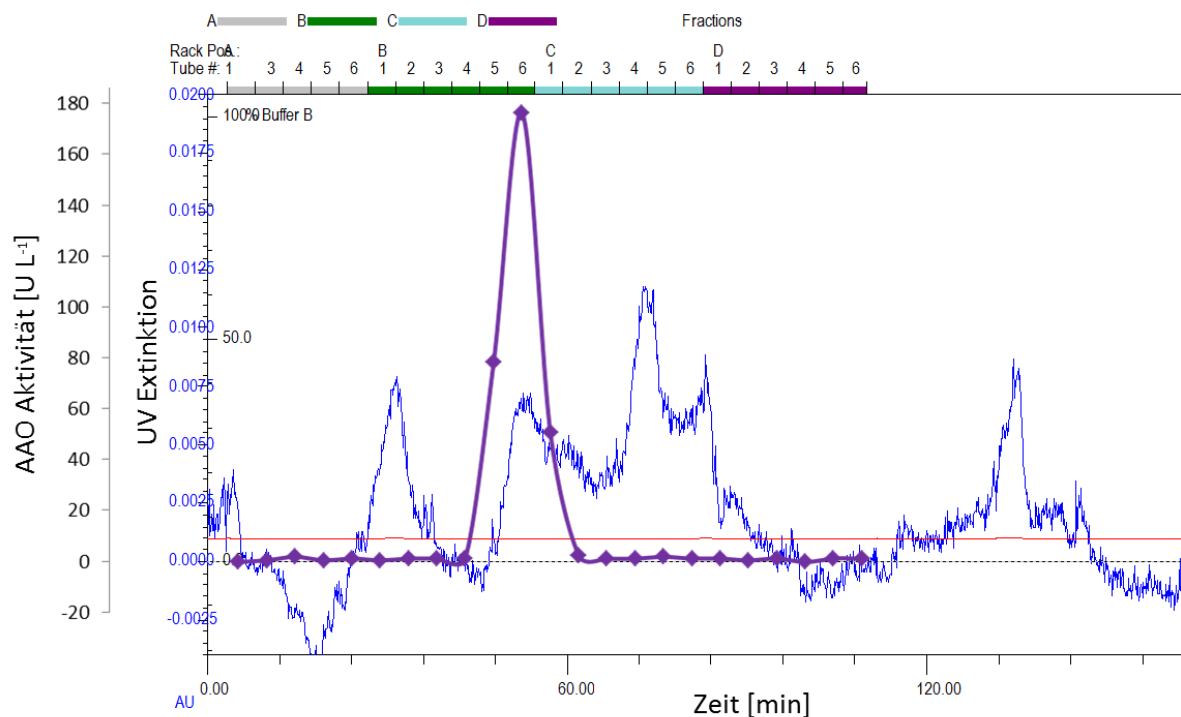


Abb. 6: Größenausschlusschromatographie (SEC): UV-Chromatogramm (blau), Fraktionen A1 bis D6 und AAO-Aktivität (lila) der einzelnen Fraktionen.

Tabelle 1: Reinigung der AAO aus dem Kulturüberstand des Transformanten 1-1-5

Reinigungsschritt	Volumen [mL]	Aktivität [U/L]	Aktivität [U]	Protein [mg/L]	Aktivität [U/mg]	Faktor
Kulturüberstand	750	91	69	40,6	2,3	1,0
Querstromfiltration (Cross-Flow)	650	50	32	24,1	2,1	0,9
FPLC IEX	40	189	7,6	18,1	10,4	4,5
Umpuffern für SEC	13,5	210	2,8	20,1	10,5	4,6
FPLC SEC	14	176	2,5	8,4	21,0	9,1

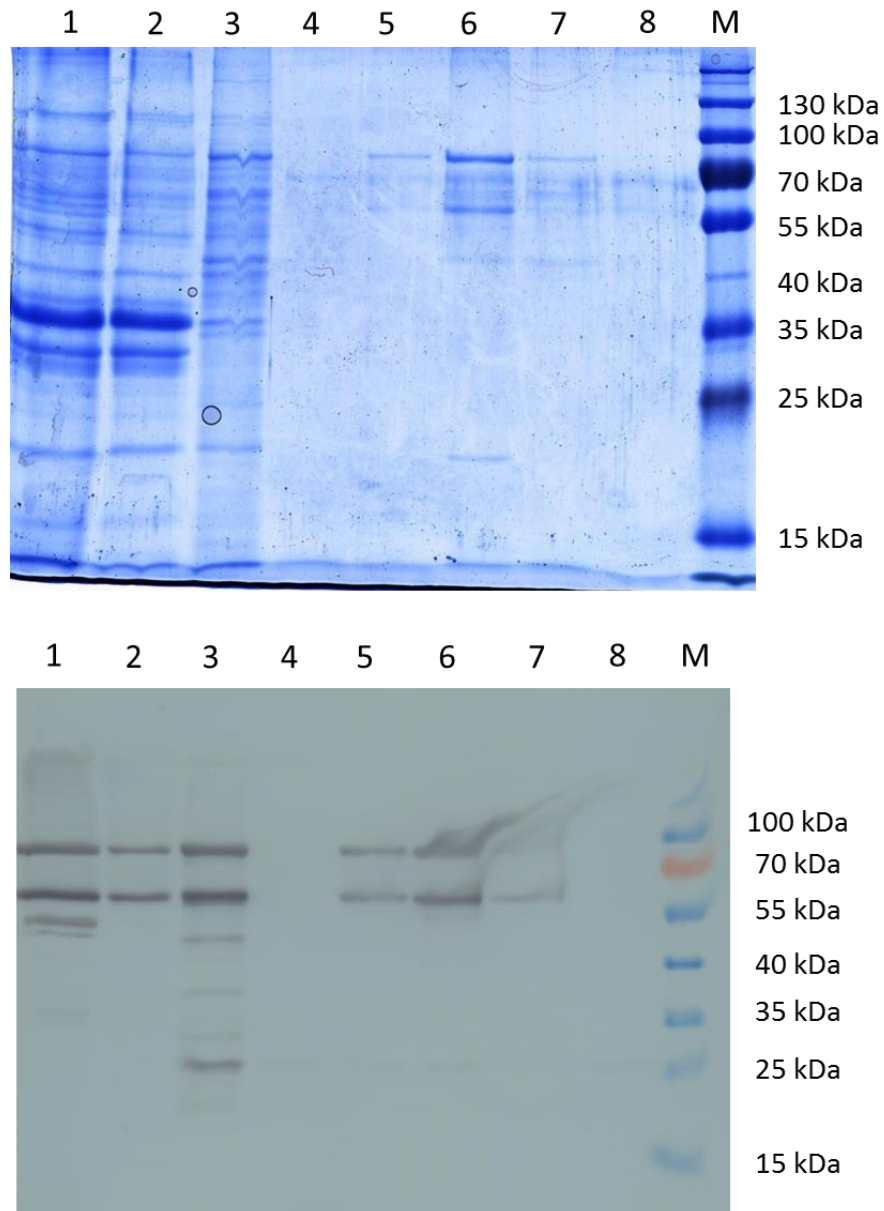


Abb. 7: SDS-PAGE (oben) und Western Blot (unten) von Reinigungsschritten der AAO: Kulturüberstand (1), nach Cross-Flow Filtration (2), nach IEX (3) und Fraktionen B4-C2 (4-8) der SEC (vgl. Abb. 5), sowie des Markers (Prestained Protein Ladder, M).

3.1.7 Produktion einer DyP in *C. cinerea*

Das Plasmid pYIG2, das ein Dye-decolorizing Peroxidase (DyP) codierendes Gen aus *P. sapidus* enthält (Abb. 4), wurde erfolgreich in *C. cinerea* transformiert. Mittels PCR konnten aus 27 getesteten Klonen 6 positive Klone identifiziert werden. Dazu wurden die für die Plasmidkonstruktion verwendeten Primer eingesetzt (Abb. 8).

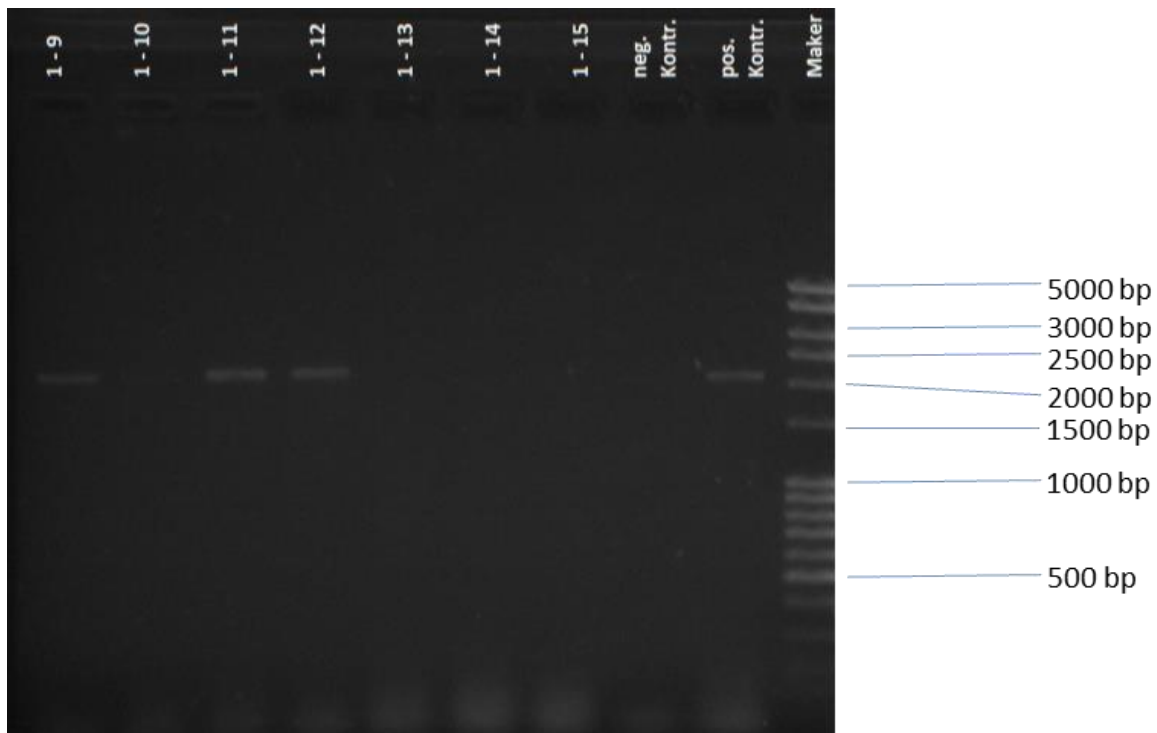


Abb. 8: Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten einiger pYIG2 Transformanten, neg. Kontrolle, pos. Kontrolle

Fünf dieser Transformanten wurden in YMG-Medium bei der für *C. cinerea* optimalen Wachstumstemperatur von 37 °C und bei der am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie verwendeten Standardtemperatur von 24 °C kultiviert. Die Enzymaktivität gegenüber dem Substrat ABTS [2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)] wurde über einen Verlauf von 8 Tagen gemessen (Abb. 9, 10). Bei 24 °C zeigte der Transformant 1-11 nach 6 Tagen die höchste Aktivität von ca. 80 U L⁻¹; bei 37 °C zeigte der Transformant lediglich Aktivitäten von ca. 40 U L⁻¹. Allerdings konnten auch bei Kontroll-Transformanten Peroxidase-Aktivitäten von bis zu 30 U L⁻¹ bei einer Kultivierungstemperatur von 37 °C gemessen werden. Eine anschließende Aktivitätsbestimmung mit dem DyP-spezifischeren Substrat β -Carotin zeigte dagegen keine deutlichen Unterschiede zwischen DyP- und Kontroll-Transformanten. Die Aktivität der Kontroll-Transformanten stammt von homologen *C. cinerea* Peroxidasen. Da es auch durch die Transformation selber durch Integration des Plasmids zu einer Regulierung der Expression von Peroxidasegenen kommen kann, ist durch die hier angegebenen Ergebnisse nicht eindeutig zu belegen, dass die Aktivität in den pYIG2-Transformanten durch die *P. sapidus* DyP hervorgerufen wurde. Für die weiteren Arbeiten zur Abstimmung des Zwei-Enzym-Systems wurde daher die in *T. reesei* rekombinant hergestellte DyP (AB Enzymes) verwendet.

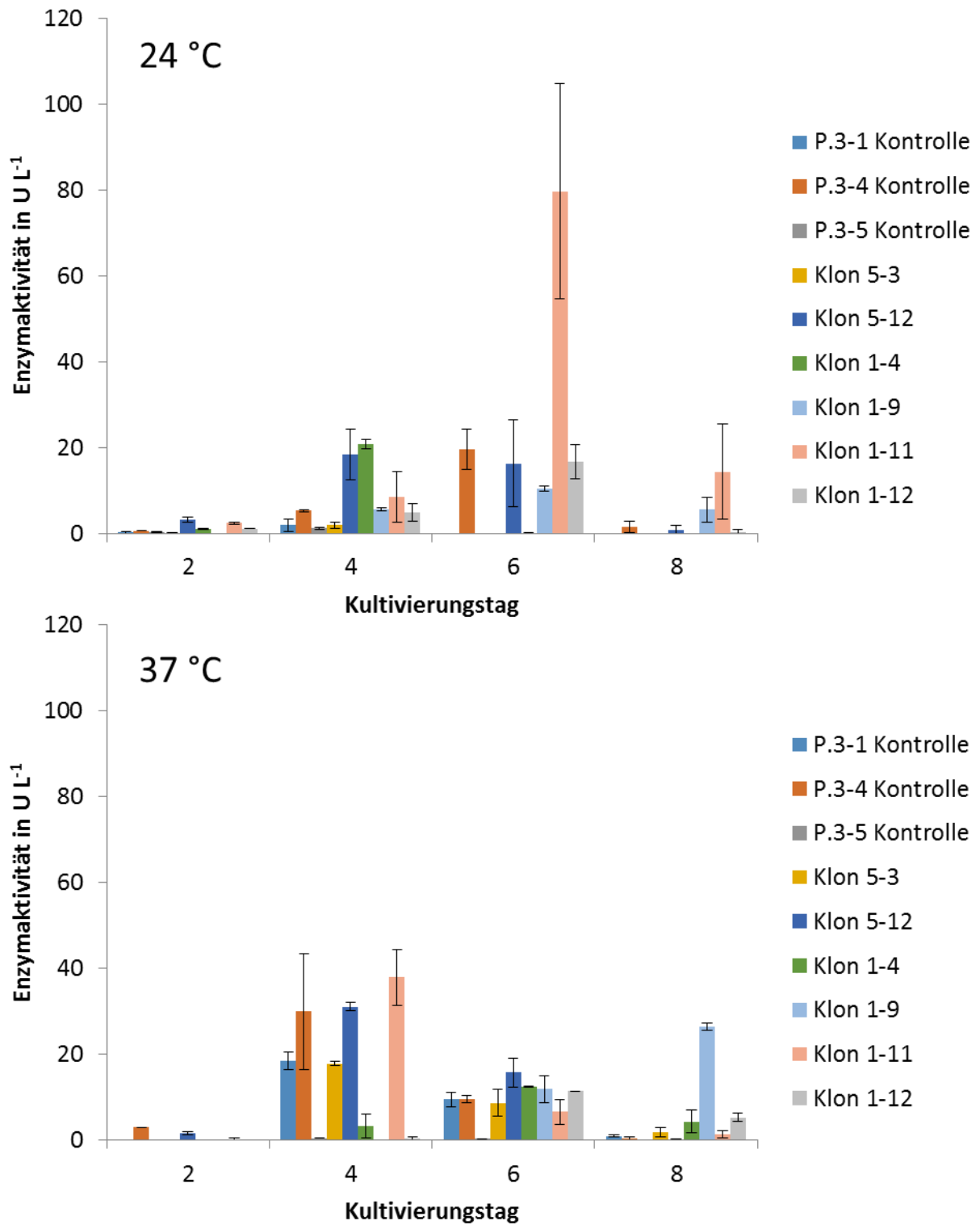


Abb. 9: Peroxidase-Aktivität (ABTS) in Kulturüberständen von pYIG2 Transformanten und drei Kontroll-Transformanten (P.3-x-Kontrolle), die bei 24 °C und 37 °C kultiviert wurden.

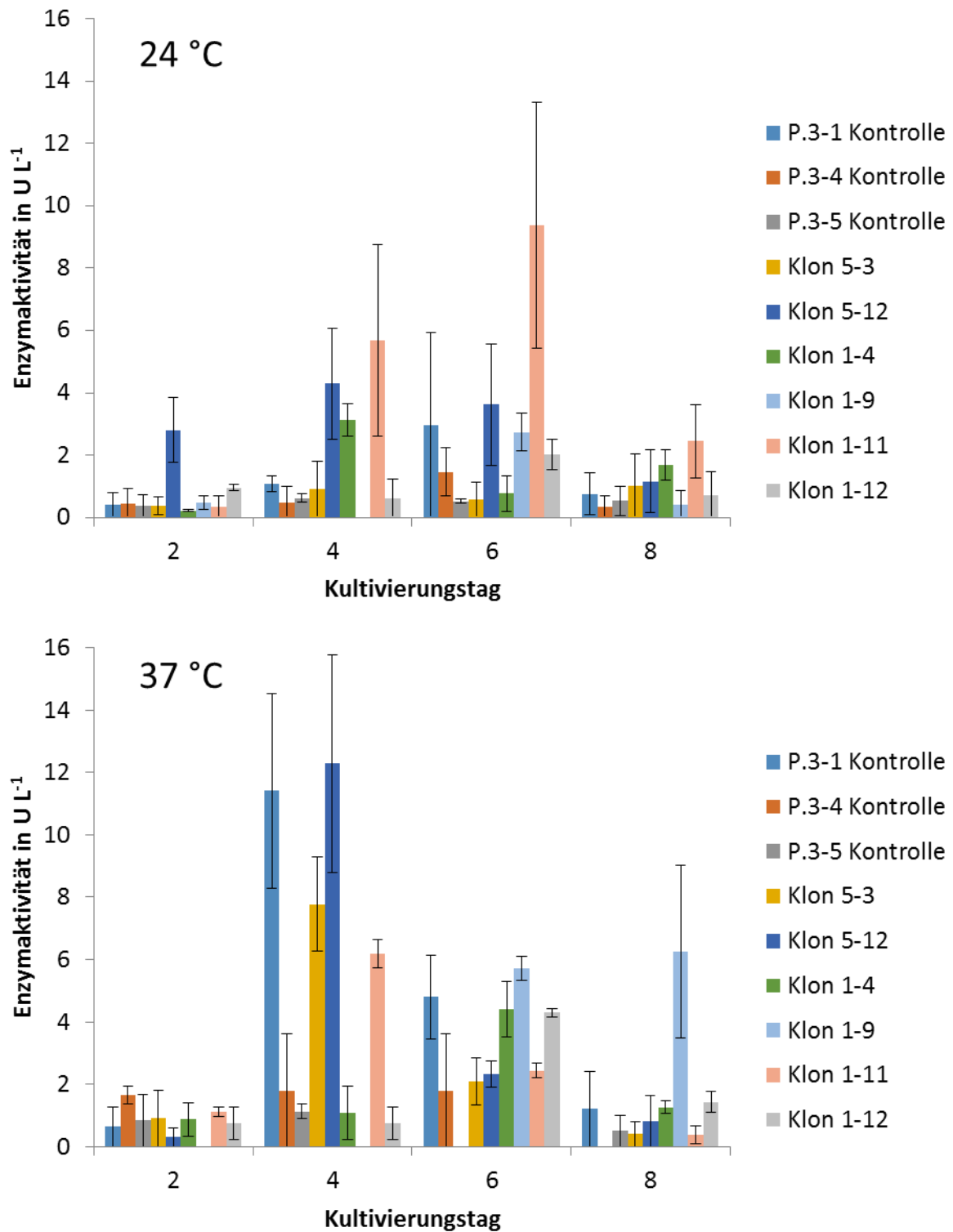


Abb. 10: Peroxidase-Aktivität (β -Carotin-Assay) in Kulturüberständen von pYIG2 Transformanten und drei Kontroll-Transformanten (P.3-x-Kontrolle), die bei 24 °C und 37 °C kultiviert wurden.

3.2 Charakterisierung der rekombinanten AAO aus *E. coli*

Die in *E. coli* rekombinant produzierte und rückgefaltete AAO* wurde gereinigt und hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften charakterisiert.

3.2.1 Bestimmung des pH-Optimums

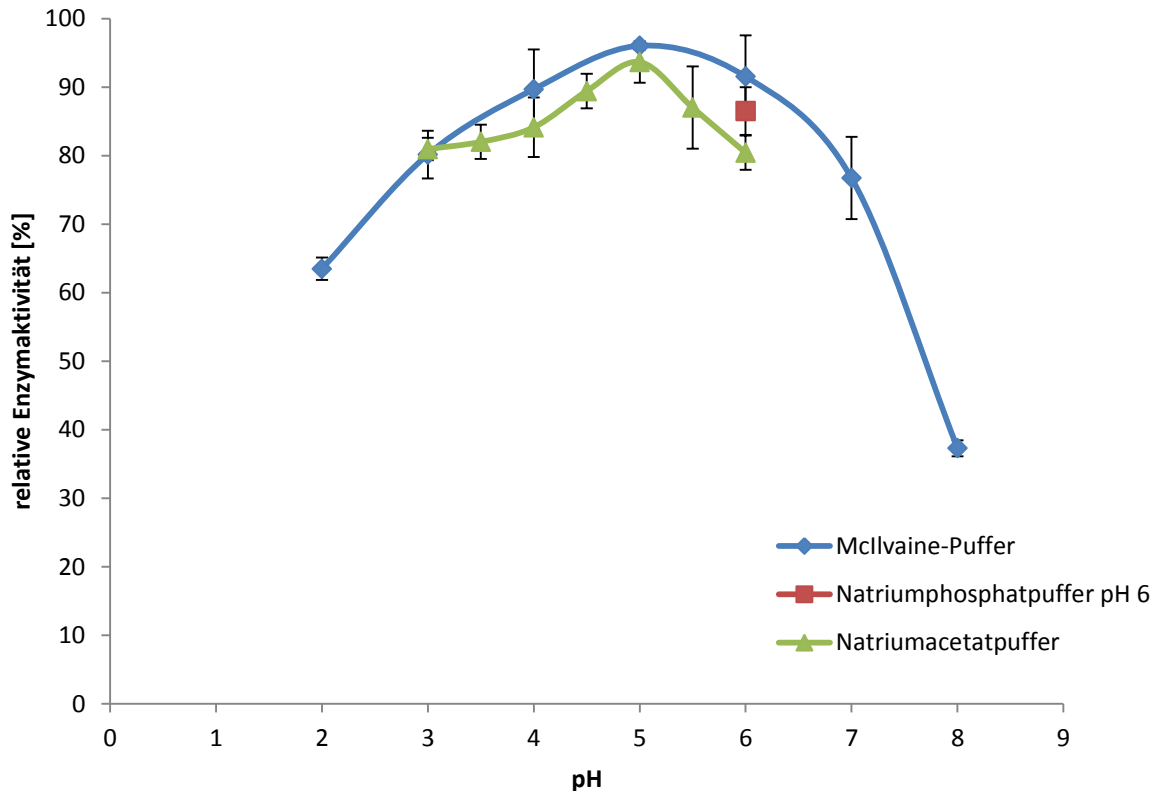


Abb. 11: Das pH-Optimum der rückgefalteten AAO* wurde mit Veratryalkohl als Substrat und verschiedenen Puffern bestimmt.

Mit dem McIlvaine-Puffer wurde ein Bereich von pH 2-8 und mit dem Natriumacetatpuffer ein Bereich von pH 3-6 untersucht. Bei beiden Puffern wurde die höchste AAO*-Aktivität bei pH 5 gemessen (Abb. 11). Das bestimmte pH-Optimum ist vergleichbar zu denen anderer AAOs (Guillen *et al.* 1992). Zusätzlich wurde die Aktivität der rekombinanten AAO* in Natriumphosphatpuffer, der in der Literatur häufig verwendet wird, zu pH 6 bestimmt.

3.2.2 Bestimmung des Temperaturoptimums

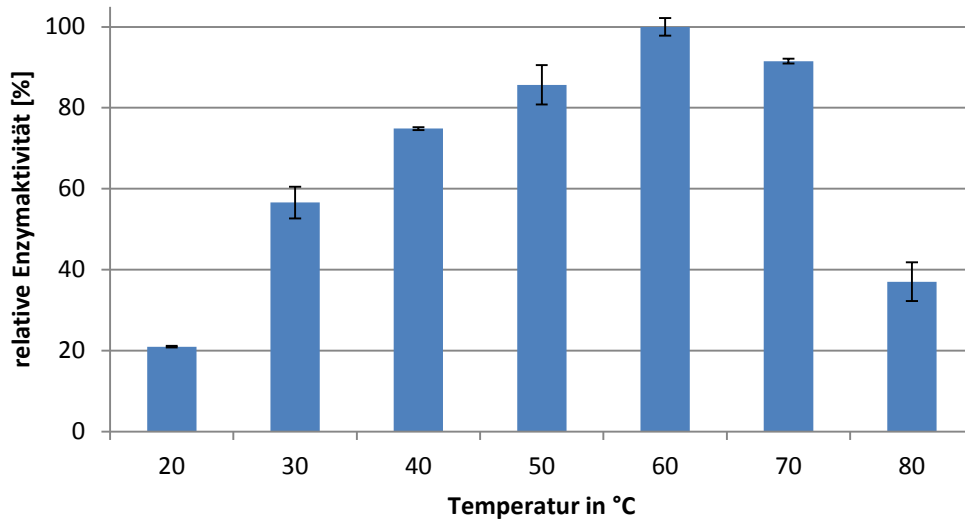


Abb. 12: Mit Hilfe des AAO*-Assays wurde die Abhängigkeit der AAO-Aktivität von der Temperatur untersucht.

Die Bestimmung der optimalen Temperatur für die rekombinante AAO* wurde unter Verwendung des Veratrylalkohol-Assays durchgeführt. Dafür wurde der Assay in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C in 10 °C Schritten durchgeführt. Für jede Messung wurde das Enzym 5 Minuten vortemperiert und anschließend eine 10 minütige Messung durchgeführt. Die Umsatzgeschwindigkeit war bei allen Messungen über mindestens drei Minuten stabil. In Abb. 12 ist die relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur aufgetragen. Für die rückgefaltete AAO* wurde ein Temperaturoptimum von 60 °C ermittelt. Für andere AAOs sind in der Literatur Temperaturoptima zwischen 45 °C und 55 °C beschrieben.

3.2.3 Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und k_{cat}

Die Kinetiken wurden anhand des optimierten AAO*-Assays mit verschiedenen Substraten bestimmt. Als Substrat wurden die primären Alkohole Benzylalkohol, *p*-Anisalkohol, Veratrylalkohol und Zimtalkohol verwendet (Abb. 13, Tabelle 2). Für die Oxidation von Benzylalkohol wurden 30 μ L AAO* in den Assay eingesetzt.

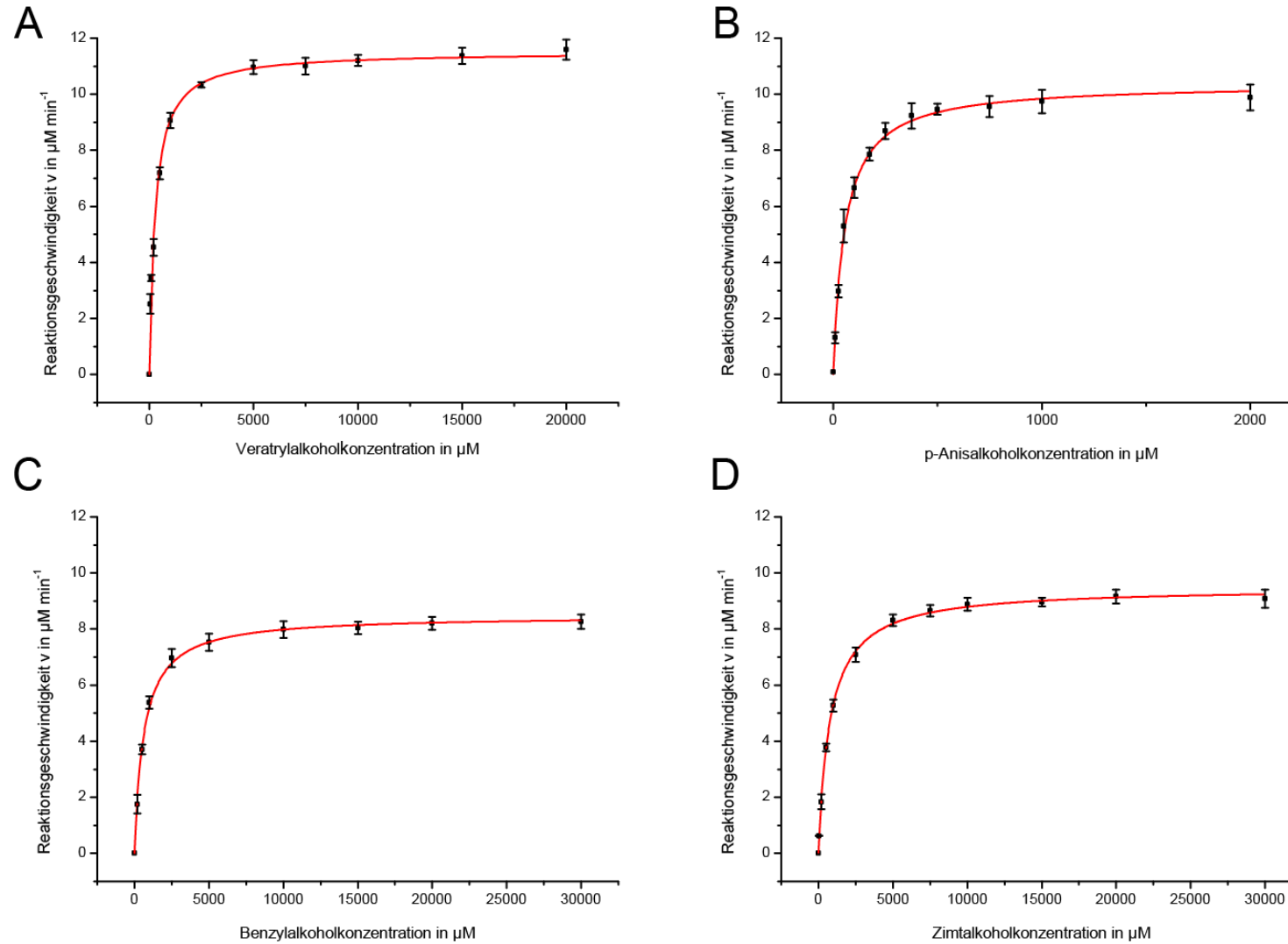


Abb. 13: Cornish-Bowden-Diagramme zur Herleitung der enzymkinetischen Parameter. Aufgetragen ist die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die Diagramme wurden mit OrginPro 8.6 erstellt und die Sättigungshyperbel mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung $V = \frac{V_{max} \times X}{K_M + X}$ an die Messdaten angepasst.

Tabelle 2: Kinetische Parameter für die rekombinante (*E. coli*) und rückgefaltete AAO* aus *P. sapidus* sowie im Vergleich die Konstanten für die rekombinante (*E. coli*) und rückgefaltete AAO* aus *P. eryngii* und die Wildtyp AAO aus *P. eryngii*.

	rückgefaltete AAO* <i>P. sapidus</i>	rückgefaltete AAO* <i>P. eryngii</i> ^a	AAO <i>P. eryngii</i> ^b
Benzylalkohol			
K _M	629	873	840
kcat	34	30	59
kcat K _M ⁻¹	55	35	70
Veratrylalkohol			
K _M	270	541	410
kcat	98	99	143
kcat K _M ⁻¹	361	172	349
p-Anisalkohol			
K _M	55	37	40
kcat	154	134	239
kcat K _M ⁻¹	2808	3870	5970
Zimtalkohol			
K _M	789		
kcat	67	n.b.	n.b.
kcat K _M ⁻¹	85		

K_M in μM, kcat in s⁻¹, kcat K_M⁻¹ in s⁻¹ mM⁻¹, n.b. nicht bestimmt, ^a Ruiz-Dueñas *et al.* 2006, ^b Guillén *et al.* 1992. Alle Fehlergrenzen lagen unter 20% der Mittelwerte.

Weiterhin wurde Coniferylalkohol als Substrat verwendet. Coniferylalkohol wurde durch die AAO* umgesetzt. Die AAO* wies gegenüber Coniferylalkohol eine Aktivität von 13 U L⁻¹ ± 7% bzw. eine spezifische Aktivität von 2,4 U mg⁻¹ ± 10% auf.

Die Werte sind vergleichbar zu den für die *P. sapidus* AAO* wie auch für die AAO* aus *P. eryngii* ermittelten Werten (Ruiz-Dueñas *et al.* 2006).

Für eine heterolog in *Emericella nidulans* exprimierte AAO aus *P. eryngii* wurde für Zimtalkohol ein K_M von 708 μM (kcat: 65 s⁻¹; kcat K_M⁻¹: 78 s⁻¹ mM⁻¹) bestimmt (Ferreira *et al.* 2005). Diese Werte sind ebenfalls mit den für die rekombinante AAO* aus *P. sapidus* bestimmten Werten vergleichbar.

3.3 Optimierung des Zwei-Enzym-Systems zur Oxidation von DMP

Zunächst wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für den Umsatz von DMP (2,6-Dimethoxyphenol, Syringol) durch die heterolog exprimierte DyP aus *P. sapidus* bestimmt. Dabei wurde gezeigt, dass die höchste Aktivität des Enzyms für den Umsatz

von DMP bei pH 4,5 liegt. Die rückgefaltete AAO* hat bei diesem pH-Wert eine Aktivität von 90%. Eine Umsetzung von DMP durch die DyP bei pH 6 wurde nicht nachgewiesen. Daher wurde das Zwei-Enzym-System bei pH 4,5 etabliert. Die höchste Enzymaktivität zeigte die DyP bei einer Temperatur zwischen 20 und 30 °C. Außerhalb dieses Temperaturbereiches sank die Aktivität deutlich ab. Da die Aktivität der AAO* bei 30 °C höher als 55% ist, wurde das Zweienzymsystem bei 30 °C etabliert.

Im optimierten Zwei-Enzym-System (Tabelle 3) wird H₂O₂ kontinuierlich von der AAO* zur Verfügung gestellt, welches von der DyP umgehend verbraucht wird. Im Vergleich zur Positivkontrolle wird DMP länger umgesetzt (Abb. 14). Bei der Negativkontrolle wurde ein minimaler Umsatz beobachtet, der jedoch nach ca. 2 Minuten bereits stagnierte und daher vernachlässigt werden kann. Parallel zum Umsatz des DyP-Substrates wurde der Umsatz von Veratrylalkohol kontrolliert (Abb.15). Nur im Zwei-Enzym-System wird Veratrylalkohol oxidiert und H₂O₂ im Assay produziert.

Tabelle 3: Zwei-Enzymassay für DMP optimiert

	Zwei-Enzym-System	Positivkontrolle	Negativkontrolle
AAO* (16,2 U mg ⁻¹) ¹	25 µL	- µL	- µL
DyP ²	20 µL	20 µL	20 µL
Puffer ³	85 µL	85 µL	85 µL
DMP ⁴	10 µL	10 µL	10 µL
H ₂ O ₂ ⁵	- µL	50 µL	- µL
H ₂ O	50 µL	0 µL	50 µL
Veratrylalkohol ⁶	10 µL	10 µL	10 µL
Rückfaltungspuffer	- µL	25 µL	25 µL

¹ 5 mU • ² 77 nM • ³ Natriumacetatpuffer (50 mM, pH 4,5) • ⁴ 100 mM gelöst in 30 % Ethanol • ⁵ 0,125 mM • ⁶ 100 mM in Puffer

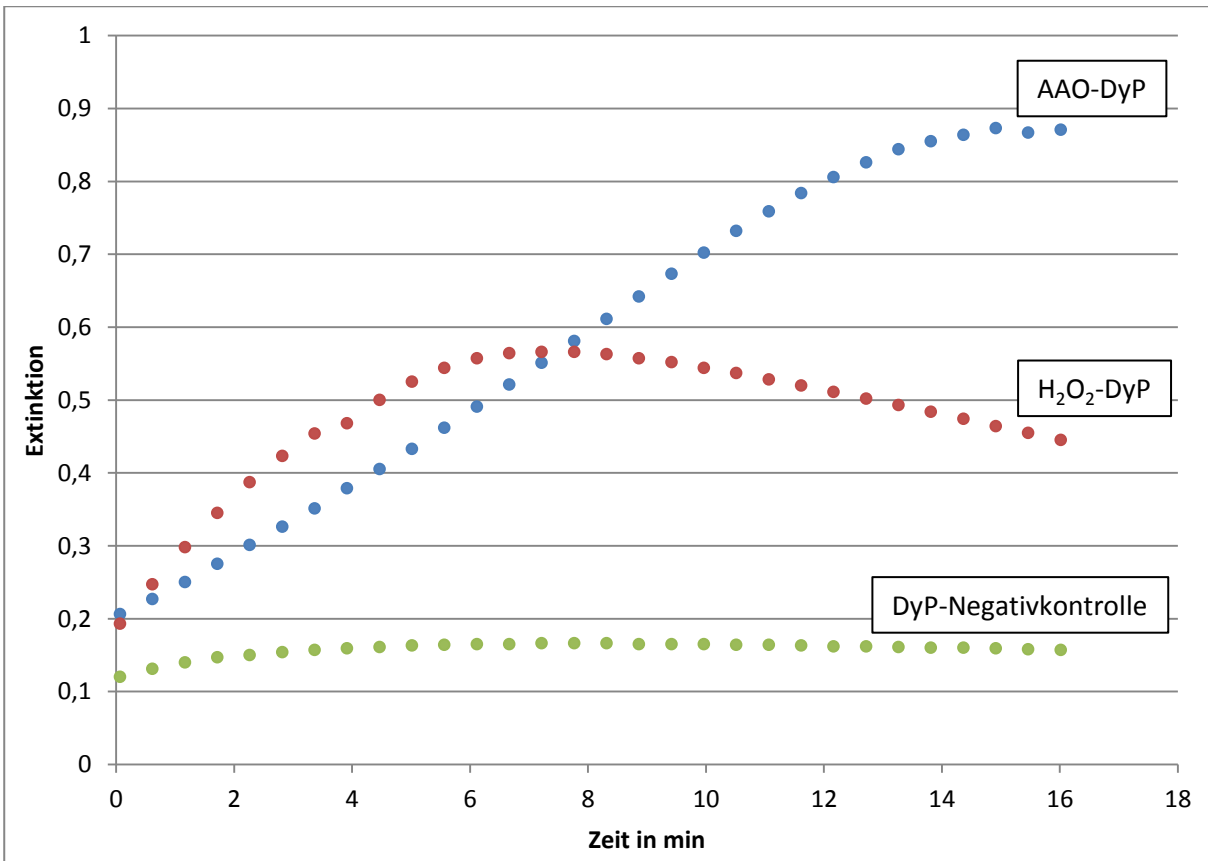


Abb. 14: Umsatz von DMP durch das AAO*-DyP-Zwei-Enzym-System in 50 mM Natriumacetatpuffer bei pH 4,5 und 30 °C und die DyP mit H₂O₂ bzw. ohne H₂O₂ im Vergleich.

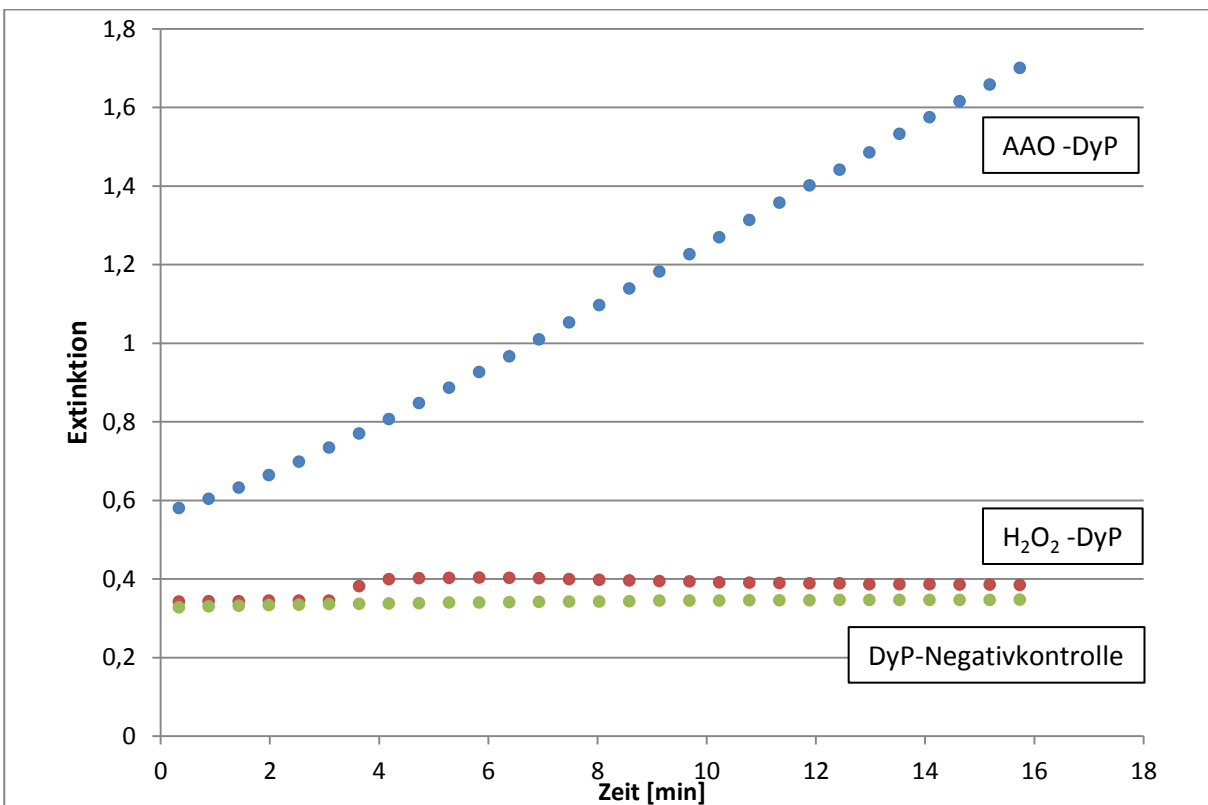


Abb. 15: Parallel zum DMP-Umsatz gemessene Oxidation von Veratrylalkohol im AAO*-DyP-Zwei-Enzym-System bzw. DyP mit und ohne H₂O₂ im Vergleich.

3.4 Optimierung des Zwei-Enzym-Systems zur Oxidation von Annatto

Anhand der getesteten Oxidation von ABTS und DMP mit dem Zwei-Enzym-System wurde im zweiten Jahr die Oxidation des industrierelevanten Farbstoffs Annatto durchgeführt. Der Abbau von Annatto erfolgte bei pH 4,5. Dieser pH-Wert wurde gewählt, da dieser dem pH-Wert der Molke entspricht.

Die für den Abbau von Annatto benötigte H₂O₂-Menge ist vergleichbar mit der Menge für die Oxidation von ABTS. Daher muss auch für den Umsatz dieses Substrates die AAO-Konzentration niedrig gehalten werden, um eine Hemmung der DyP durch eine zu rasche H₂O₂-Produktion zu verhindern.

Tabelle 4: Zwei-Enzymassay für Annatto optimiert

	Zwei-Enzym-System	Positivkontrolle	Negativkontrolle
AAO (6,2 U mg ⁻¹) ¹	10 µL	- µL	- µL
DyP ²	20 µL	20 µL	20 µL
Puffer ³	100 µL	100 µL	100 µL
H ₂ O ₂ ⁴	- µL	50 µL	- µL
H ₂ O	50 µL	0 µL	50 µL
Veratrylalkohol ⁵	20 µL	20 µL	20 µL
Rückfaltungspuffer	- µL	10 µL	10 µL

¹ 0,3 mU • ² 5400 nM • ³ Natriumacetatpuffer (50 mM, pH 4,5) mit Annatto (0,3%) • ⁴ 0,25 mM • ⁵ 100 mM in Puffer

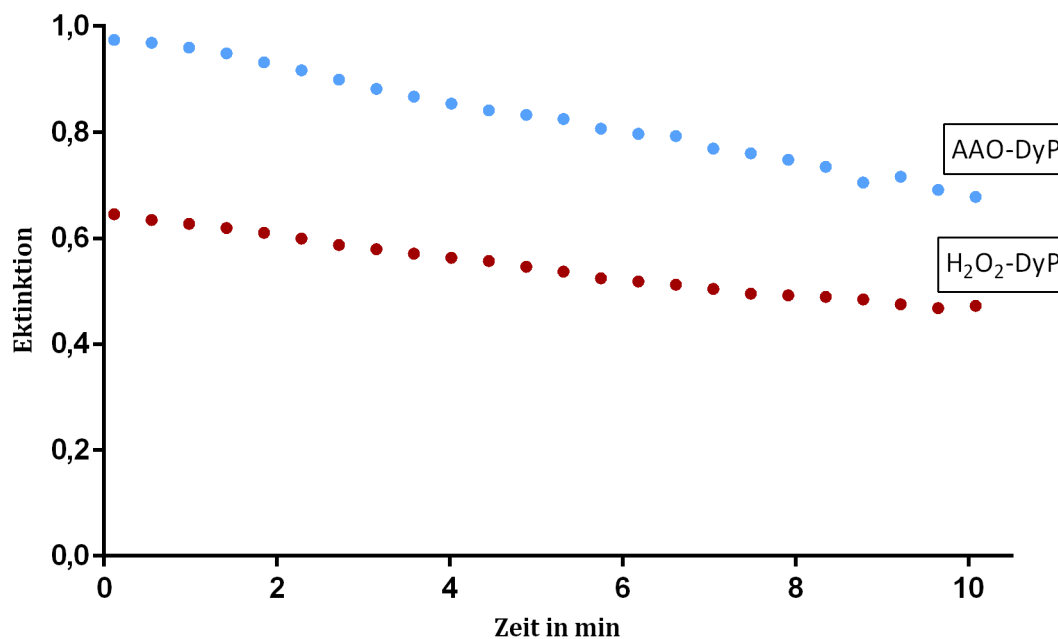


Abb. 16: Abbau des Farbstoffs Annatto bei pH 4,5 durch das AAO-DyP-Zwei-Enzym-System und durch die DyP mit H₂O₂ im Vergleich. Ohne die Zugabe von H₂O₂ wurde kein Umsatz durch die Dyp detektiert.

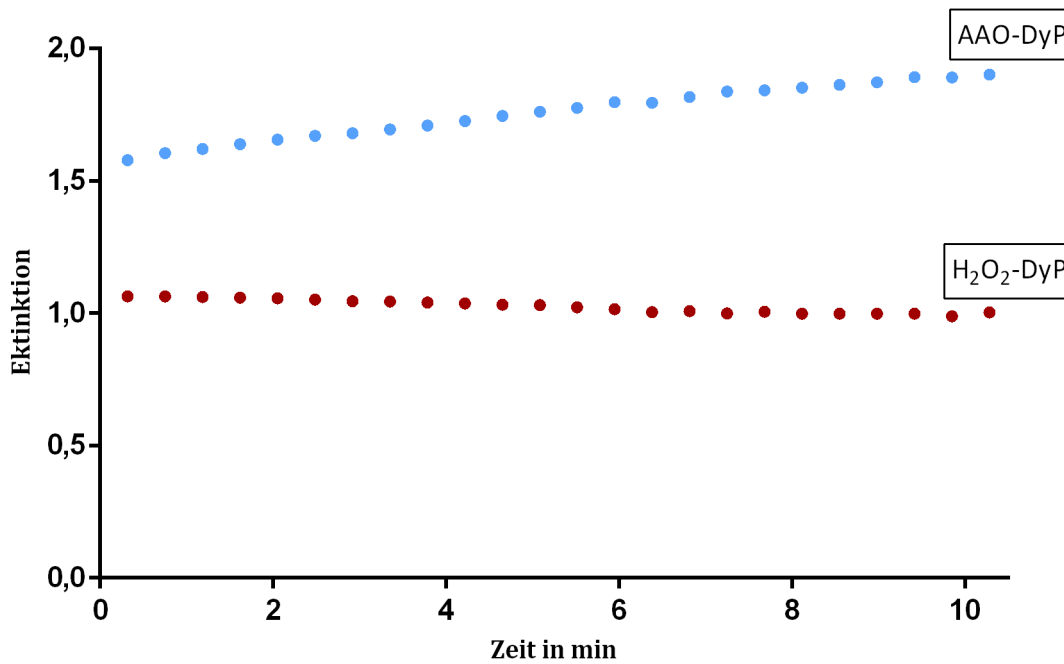


Abb. 17: Parallel zum Annatto-Abbau gemessene Oxidation von Veratrylalkohol im AAO-DyP-Zwei-Enzym-System bzw. DyP mit H₂O₂ im Vergleich.

Im Vergleich zur Positivkontrolle wurde beim optimierten Zwei-Enzym-System Annatto effizienter und schneller abgebaut (Abb. 16). Durch die kontinuierliche Zuführung von H₂O₂ durch die AAO wurde die Umsatzgeschwindigkeit der DyP gegenüber einer einmaligen Gabe von H₂O₂ gesteigert. Bei der Positivkontrolle ist die Anfangskonzentration des Cosubstrates zum Erreichen der maximalen Anfangsgeschwindigkeit zu hoch. Diese Problematik kann durch die systeminterne Produktion von H₂O₂ durch die AAO umgangen werden. Die Negativkontrolle zeigte keinen Substratumsatz.

3.4.1 Bleichung von Molke mit Hilfe des Zwei-Enzym-Systems

Die verwendete Molke (Strothmann reine Molke; pH 4,5) wurde pur bzw. mit Annatto versetzt (30 µL Annatto auf 10 mL Molke) eingesetzt. Die Assayzusammensetzung (Tabelle 4) wurde auf 1 mL hochskaliert. Anstelle des Puffers wurde Molke eingesetzt. Eine Bleichung der gefärbten Molke war mit dem Zwei-Enzym-System aus AAO und DyP möglich (Abb. 18). Beide Enzyme sind auch unter den in der Molke gegebenen Bedingungen aktiv. Gegenüber der Positivkontrolle wurde der Umsatz durch das optimierte Zwei-Enzym-System gesteigert. Bei der ungefärbten Molke war keine Bleichung erkennbar. Bei der Molkebleichung wird der Vorteil des Zwei-Enzym-Systems besonders deutlich. Die Bleichung von Molke erfolgt derzeit in der Industrie durch Zusatz von H₂O₂ zu Lebensmitteln. Durch den Einsatz des Zwei-Enzym-Systems kann diese Zugabe

weitgehend überflüssig werden. Im Vergleich zur Positivkontrolle mit H_2O_2 ist die Bleichung mit dem Zwei-Enzym-System deutlich effektiver. Eine Negativkontrolle wurde stets mitgeführt. Aber weder der Einsatz der AAO alleine noch der Einsatz der DyP alleine führte zu einer Farbveränderung in der Probe.

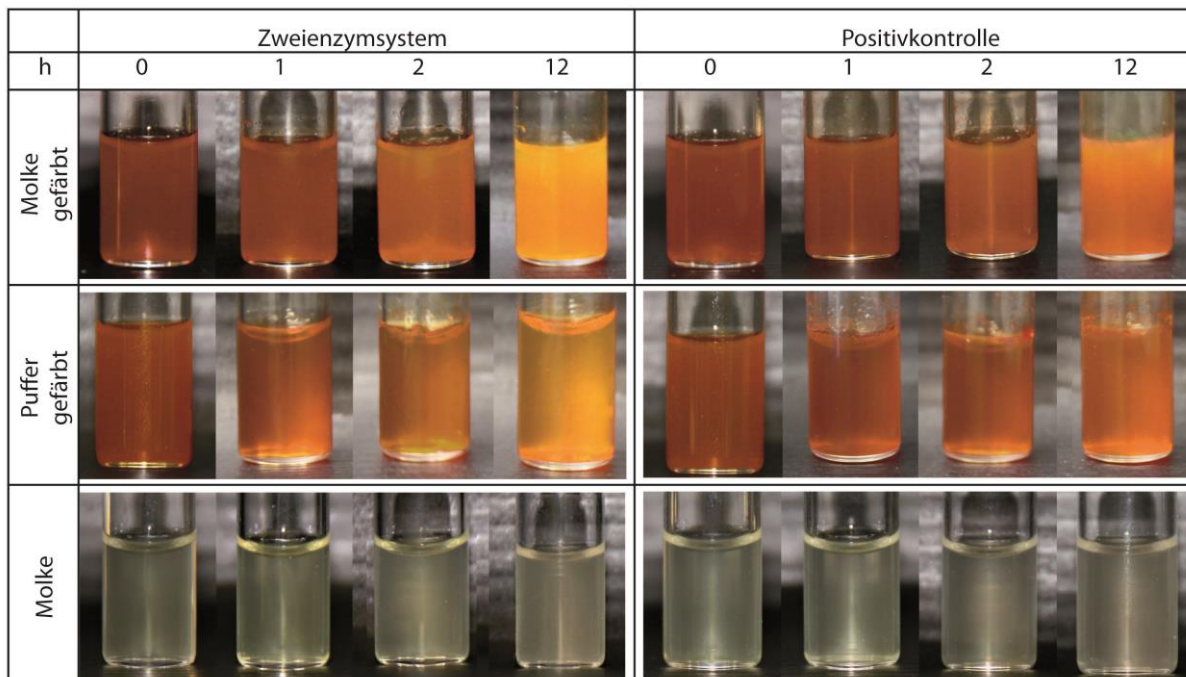


Abb. 18: Bleichung der gefärbten Molke bzw. des gefärbten Puffers mittels Zwei-Enzym-System und Vergleich mit der Positivkontrolle (Zugabe von H_2O_2) und der ungefärbten Molke

4 Diskussion

Ziel dieses Projekts war die Etablierung eines natürlichen Enzymsystems bestehend aus einer Aryl-Alkohol-Oxidase (AAO) und einer Dyp-Typ Peroxidase (DyP) aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*. Dabei stand neben der rekombinanten Darstellung beider Enzyme in drei verschiedenen Wirtsorganismen die Abstimmung der Enzymaktivitäten von AAO und DyP im Mittelpunkt des Forschungsvorhabens. In *E. coli* konnte die AAO mit Hilfe des pCold-Systems (pColdI-AAO-K5⁺) und der Coexpression eines Chaperonplasmids (pGRO7) exprimiert werden. Leider wurde das Enzym in *inclusion bodies* eingeschlossen, so dass eine Reinigung und anschließende Rückfaltung nötig war. Mit der aktiven AAO* konnten die pH- und Temperatur-Optima für die Enzymaktivität bestimmt werden. Daneben wurden die Michaelis-Menten Konstanten (K_M) und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) für vier verschiedene Substrate (Benzylalkohol, *p*-Anisalkohol, Veratrylalkohol und Zimtalkohol) bestimmt.

Um die aufwendige Reinigung und Rückfaltung der AAO* aus den *inclusion bodies* zu vermeiden, wurde parallel der industrielle Expressionswirt *Hansenula polymorpha* eingesetzt. Trotz eines Screenings von über 70 Transformantenkolonien konnte keine AAO im Überstand von *H. polymorpha* nachgewiesen werden. Somit scheint eine sekretorische Expression der AAO in *H. polymorpha* nicht möglich. Eine cytosolische Expression der AAO lieferte dagegen positive Ergebnisse. So wurde die rekombinante AAO zwar auch in der unlöslichen Fraktion des Zellextrakts nachgewiesen, aber über 50% lagen in gelöster Form vor. Der produktivste Transformantenpool wurde für die Einzelstammgenerierung ausgewählt. Ein Screening mit einem synthetischen Medium zeigte bei allen getesteten Puffersystemen ähnliche Ausbeuten wie im Vollmedium. Dabei wurde eine AAO-Aktivität von 5 U L^{-1} gemessen.

Als drittes Expressionssystem wurde ein filamentöser Basidiomycet verwendet. Eine Transformation zur homologen Produktion von AAO und DyP in *P. sapidus* mit Hilfe eines Hygromycin-Resistenzgens (*hygB*) gelang nicht. Abweichend vom Arbeitsplan kam daher der Tintling *Coprinopsis cinerea* zum Einsatz, da hier bereits ein Expressionssystem mit Selektionsdruck auf eine Tryptophan-Auxotrophie existiert. Neben dem AAO-Plasmid pYIG1 wurde parallel auch ein Plasmid pYIG2 mit dem für die DyP codierenden Gen hergestellt. Beide Plasmide konnten in *C. cinerea* transformiert werden. Die DyP-Transformanten zeigten allerdings nur geringe Aktivitätsunterschiede gegenüber den Kontroll-Transformanten, weshalb für die in *C. cinerea* rekombinant produzierte DyP weitere Arbeiten (Western Blot und Peptidsequenzierung) notwendig sind, um eine genaue Aussage bezüglich der Quelle der Peroxidaseaktivität zu treffen.

Die AAO-Transformanten von *C. cinerea* zeigten hingegen deutliche Aktivitäten von ca. 90 U L^{-1} im Kulturüberstand, was auf eine sezernierende Expression hindeutet. Im Gegensatz dazu wurden bei den Kontroll-Transformanten keine, bzw. nur sehr geringe Aktivitäten detektiert. Der Western Blot zeigte, im Vergleich zum Western Blot bei den rekombinanten *E. coli* Klonen, zwei deutliche Banden von ca. 62 kDa und 84 kDa Größe. Die untere Bande entspricht dabei dem kalkulierten Molekulargewicht der AAO ohne Signalpeptid (61,4 kDa). Die größere Bande könnte auf glykosidierte Formen der AAO zurückzuführen sein, wobei sich rechnerisch ein Zuckergehalt von ca. 35% ergab. In weiteren Versuchen soll die gereinigte AAO enzymatisch deglykosidiert und erneut mittels Western Blot analysiert werden.

Zur Etablierung des Zwei-Enzym-Systems wurde neben der durch die Firma AB Enzymes zur Verfügung gestellten DyP die mittels *E. coli* rekombinant gewonnene und rückgefaltete

AAO verwendet. In Optimierungsversuchen konnte eine im Vergleich zur H₂O₂-Zugabe verbesserte Umsetzung des phenolischen Ligninmodellsubstrates Syringol (2,6-Dimethoxyphenol, DMP) gezeigt werden. In einem weiteren Anwendungsbeispiel zur umweltverträglichen Oxidation von β -Carotin in Molke zeigte das Zwei-Enzym-System erneut klare Vorteile gegenüber dem einfachen Enzymsystem bestehend aus DyP und H₂O₂.

Das Zwei-Enzym-System wurde somit erfolgreich für die Oxidation von Syringol als auch für den in der Lebensmittelindustrie verwendeten Farbstoff Annatto eingesetzt. In beiden Fällen zeigte das Zwei-Enzym-System deutliche Vorteile gegenüber dem einfachen Enzymsystem. Weitere Versuche zur Oxidation von technischem Lignin sind geplant. Dafür müssen jedoch zunächst größere Mengen an AAO rekombinant hergestellt werden.

5 Öffentlichkeitsarbeit

Die Ergebnisse des von der DBU geförderten Projekts „Zwei-Enzym-System“ wurden bisher auf verschiedenen Veranstaltungen im In- und Ausland vorgestellt. Bei der 6. Jahreskonferenz der GGL (International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences) wurde ein Poster zum Thema „Heterologous expression of an aryl-alcohol oxidase and a dye-decolorizing peroxidase in *Coprinopsis cinerea*“ vorgestellt. Außerdem wurde im Februar diesen Jahres auf dem „First Padova-Giessen Chemical Meeting“ ein Vortrag zum Thema „Development of a 2-enzyme system and genetic modification of basidiomycetes“ gehalten. Weiterhin wurden Teile der Arbeit am 13.06.2014 auf einem Workshop zum Thema „Genetics and Genomics“ an der Goethe-Universität Frankfurt vorgestellt. Abschließend ist noch die Einreichung eines Vortrags für die Jahrestagung der VAAM im Oktober diesen Jahres mit dem Titel „Development of a two-enzyme system comprising of an aryl-alcohol oxidase and a dye-decolorizing peroxidase“ zu erwähnen. Nach Abschluss der in Kapitel 3 und 4 beschriebenen Arbeiten werden die Ergebnisse in einer wissenschaftlichen Zeitung publiziert. Insbesondere die heterologe Produktion einer AAO in einem Basidiomyceten stellt eine Neuheit dar und ist unseres Wissens bisher noch nicht beschrieben.

6 Fazit

Im Zuge des Projekts konnten die meisten der angestrebten Meilensteine umgesetzt werden. Lediglich einige Punkte wurden nicht erreicht, diese wurden allerdings durch alternative Vorgehensweisen kompensiert. So zeigte sich im Laufe des Projekts, dass eine

Transformation des Speisepilzes *P. sapidus* mit den getesteten Selektionsplasmiden nicht möglich war. Daher wurden die bereits konstruierten Plasmide für die Expression der AAO und DyP zusammen mit dem vorhandenen Selektionsvektor (pCc1001) des auxotrophen *C. cinerea* Stammes FA2222 in selbigen transformiert. Die AAO-Aktivität konnte dabei in *C. cinerea* gegenüber *H. polymorpha* um das 18fache gesteigert werden. Eine Co-Expression von AAO und DyP wurde jedoch, wie in der Vorhabenbeschreibung angegeben, nicht durchgeführt, da eine Expression der *P. sapidus* DyP in *C. cinerea* bisher nicht eindeutig nachgewiesen wurde.

Aus diesem Grund wurde zur Abstimmung beider Enzyme die bereits durch die Firma AB Enzymes rekombinant in *T. reesei* hergestellte DyP und die in diesem Projekt in *E. coli* produzierte AAO eingesetzt. Der Einsatz des Zwei-Enzym-Systems im Labormaßstab zur Oxidation von Ligninkomponenten und zur Bleichung von Molke verlief erfolgreich, so dass das Gesamtziel des Projekts erfüllt wurde.

7 Literatur

- Binner DM, Skrznia C, Pukkila PJ, Casselton LA (1987) DNA-mediated transformation of the basidiomycete *Coprinus cinereus*. EMBO J 6:835–840
- Dörnte B, Kües U (2012) Reliability in transformation of the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. Curr. Trends Biotechnol. Pharm. 6:340–355
- Ferreira P, Medina M, Guillén F, Martínez MJ, Van Berkel W J H, Martínez AT, (2005) Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. Biochem J 389:731-738.
- Fernández IS, Ruíz-Dueñas FJ, Santillana E, Ferreira P, Martínez MJ, Martínez AT, Romero A (2009). Novel structural features in the GMC family of oxidoreductases revealed by the crystal structure of fungal aryl-alcohol oxidase. Acta Cryst. Sect. D 65:1196-1205
- Guillén F, Martínez AT, Martínez MJ (1992) Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Eur J Biochem 209:603-611.
- Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Martínez MJ, Martínez AT (2006) In vitro activation, purification, and characterization of *Escherichia coli* expressed aryl-alcohol oxidase, a unique H₂O₂-producing Protein. Expr Purif 45(1):191-199.
- Zuccaro A, Basiewicz M, Zurawska M, Biedenkopf D, Kogel K-H (2009) Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. Fung Genet Biol 46:543-550