Aus dem Institut für Lebensmittelchemie und
Lebensmittelbiotechnologie der Justus Liebig Universität Gießen

Sekretomanalyse von *Pleurotus sapidus* zum effizienten Aufschluss von Lignocellulosen

Dissertation
zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
- Dr. rer. nat. **-**

im Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Ing. (FH) Ina Schüttmann

Gießen, 2011

1. Gutachter:	Prof. Dr. H. Zorn
2. Gutachter:	Prof. Dr. S. Schnell
Prüfer:	Prof. Dr. A. M. Pingoud
Prüfer:	Prof. Dr. S. Schindler

Ich erkläre hiermit: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ina Schüttmann

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2007 bis November 2008 bei der AG Technische Biochemie der Universität Dortmund und in der Zeit von November 2008 bis August 2011 am Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus Liebig Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Zorn angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Zorn danke ich recht herzlich für die Möglichkeit der Promotion und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Die stete Diskussionsbereitschaft, der gewährte Freiraum zur Bearbeitung des Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut haben mir bei der Bewältigung der Arbeit sehr geholfen.

An alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Technische Biochemie der Universität Dortmund und des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Universität Giessen:

Ich danke Euch für die gute Zusammenarbeit, das freundschaftliche Verhältnis und die Unterstützung für die Bewältigung der verschiedensten Aufgaben.

Ebenso bedanke ich mich bei unseren Projektpartnern Artes® Biotechnology GmbH, Langenfeld für die Produktion der *Hansenula polymorpha* Stämme und Protagen® AG, Dortmund für die 2D-Analysen und die Proteinidentifizierungen. Dem Analytischen Service des biochemischen Instituts der Justus-Liebig Universität danke ich für die Erstellung der Edmann-Sequenz und der Bundesstiftung Umwelt (DBU) für die finanzielle Förderung (AZ 13199 und 13211).

Bei meiner Familie möchte ich mich ganz herzlich für ihre Liebe und die mir immer gewährte Unterstützung bedanken.

Zusammenfassung

Mit einer polyvalenten Peroxidase wurde ein Schlüsselenzym des Lignocelluloseabbaus aus Kulturen des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* chromatographisch gereinigt. Nach einer dreistufigen Reinigung wurde das Enzym mit einem Reinigungsfaktor von 130 aus dem Überstand einer Submerskultur isoliert. Die Aktivitätsoptima wurden für die Substrate β,β-Carotin, ABTS, Syringol und Veratrylalkohol ebenso bestimmt wie die Wechselzahlen und katalytischen Konstanten.

In Zusammenarbeit mit der Firma Artes Biotechnology GmbH wurde ein *Hansenula polymorpha* Stamm generiert, welcher die für die polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* kodierende cDNA enthielt. Das Enzym wurde heterolog exprimiert und die Aktivitätsoptima des rekombinanten Enzyms ermittelt.

Anschließend wurde der Abbau der Substrate Rapsstroh und „Rückstand einer Biogasanlage“ durch den Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* untersucht. Dazu wurde die Gesamtheit der sekretierten Enzyme (das Sekretom) von *Pleurotus sapidus* in Submers- und Emerskulturen analysiert. Photometrisch bestimmt wurden die Aktivitätsverläufe von Laccasen, Esterasen, Lipasen, Cellulasen, Xylanasen und Peroxidasen, insbesondere von Manganperoxidasen und polyvalenten Peroxidasen. Das Sekretom von *Pleurotus sapidus* wurde anschließend mittels zweidimensionaler Elektrophorese getrennt, massenspektrometrisch identifiziert und bioinformatisch ausgewertet.

Verschiedene Substrate wurden mit gereinigten Enzympräparationen und Kulturüberständen von *Pleurotus sapidus* umgesetzt. Hierbei wurde die Umsetzung von Ligninmodellsubstanzen wie zum Beispiel Coniferyl- und Veratrylalkohol, aber auch von Lignin organosolv und feingemahlenem Rapsstroh durch die gereinigte polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* gezeigt. Ebenso wurde ein Umsatz von feingemahlenem Rapsstroh mit *Pleurotus sapidus* Submerskulturen nachgewiesen. Die Versuche wurden analytisch durch photometrische Bestimmungen (Glucose- und Phenolgehalt), Messung der Partikelgrößenverteilungen und HPLC-/HPSEC-Messungen ausgewertet.

Schlagworte: *Pleurotus sapidus*, Lignocelluloseabbau, Sekretomanalytik, polyvalente Peroxidase, zellfreie Umsetzungen

Abstract

With a versatile peroxidase, a key enzyme of the degradation of lignocelluloses was purified by chromatographic methods from submers cultures of the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. After three steps, the enzyme was isolated with a purification factor of 130. Optimal reaction conditions were determined together with turnover numbers and product formation rates for the substrates: β,β-carotene, ABTS, syringol, and veratryl alcohol.

In cooperation with Artes® Biotochnology, a *Hansenula polymorpha* strain was generated containing the cDNA encoding the versatile peroxidase of *Pleurotus sapidus*. The enzyme was expressed heterologously, and pH and temperature optima were determined for the recombinant enzyme.

The degradation of the lignocelluloses rape straw and residues from a biogas plant by *Pleurotus sapidus* were studied. Therefore, the entirety of enzymes ("the secretome") secreted by *Pleurotus sapidus* in submerged and surface cultures were analysed. The activities of laccases, esterases, lipases, cellulases, xylanases, and peroxidases, in particular manganese peroxidases and versatile peroxidases were calculated by photometric assays. The secretome of *Pleurotus sapidus* was separated by two-dimensional electrophoresis and identified by mass spectrometry. A bioinformatic analysis of the data was performed.

In-vitro digestions of various substrates were carried out with the isolated versatile peroxidase and culture supernatants of *Pleurotus sapidus*. The conversion of various low molecular weight lignin model substances like coniferyl alcohol or veratryl alcohol, finely ground rape straw and lignin organosolv were investigated. The conversion of finely ground rape straw was demonstrated with submerged cultures of *Pleurotus sapidus*. The product analysis was performed by photometric assays, determination of particle size distribution, and HPLC-/HPSEC analysis.

Keywords: *Pleurotus sapidus*, degradation of lignocellulose, secretome analysis, versatile peroxidase, *in-vitro* digestion

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
2D	zweidimensional
ABTS	2,2´-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
BTX	Stoffgemisch: Benzol, Toluol, Xylol
bzw	Beziehungsweise
CBB – G250	CoomassieBrilliant Blau G250
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propansulfonathydrat
d	Durchmesser
DAD	Diode Array Detection
DEAE	Diethylaminoethyl
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
DyP	Dyedecoulorising Peroxidase
ΔE	Extinktionsdifferenz
$\varepsilon_{x\ nm}$	Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge x nm
E64	trans-Epoxysucciny-L-leucyl-amido(4-guanidino)-butan
EC	Enzymkomission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eV	Elektronenvolt
F	Verdünnungsfaktor
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FE	Flächeneinheit
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GFC	Gelfiltrationschromatographie
h	Stunde
H6	sechs Histidinreste
ha	Hektar [Flächeneinhait]
HIC	hydrophobe Interaktionschromatographie
HMF	Hydroxymethylfurfural
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPSEC	High-performance sizeexclusionchromatography
ID	Innendurchmesser
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	Kilodalton
kPa	Kilopascal
kVh	Kilovoltstunden
λ	Wellenlänge [nm]
L	Liter
LC	Liquid Chromatography
LIFT®	Beschleunigungsmodul in der TOF-Detektion

LRET	Long rangeelectrontransfer
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
min	Minute
Mio.	Million
M^{ox}	oxidiertes Methionin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MS/MS	Massenspektrometrie-Kopplung
MW	Molekulargewicht
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
NIST	National Institute of Standards and Technology
nor. Spotvolumen	normalisiertes Spotvolumen
o-	*ortho*-
Ω	Wiederstand
p-	*para*-
p.a.	pro analysi [für analytische Zwecke]
PEG2000	Polyethylenglycol 2000
PFAM	Protein Families Datenbank
PFF	Peptid-Fragmentierungs-Fingerabdruckspektrum
pI	isoelektrischer Punkt
PMF	Peptid-Massen-Fingerabdruckspektrum
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
*p*NPP	*para*-Nitrophenolpalmitat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ρ	Dichte
RNA	Ribonukleinsäure
RP	reversephase [Umkehrphase]
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Real-time Polymerasekettenreaktion
S	Leitfähigkeit [Siemens]
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNL	Standardnährlösung
sp.	Spezies
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TOF	Time-of-flight Detektion
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	Visible : sichtbares Licht
VP	polyvalente Peroxidase
$V_{Probe/Kulturüberstand}$	Volumen der Probe bzw. Kulturüberstand
W	Watt
wt	Wildtyp
YNB	Yeast Nitrogen Based
YP	Yeast Peptone

Die Aminosäuren wurden nach dem internationalen Ein- beziehungsweise Drei-Buchstabencode abgekürzt. Die Zahl an der Bezeichnung kennzeichnet die Position der Aminosäure im Protein.

Die Bezeichnungen der Mikroorganismen wurden nach dem Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2011 Annual Checklist benannt (Bisby *et al.* 2011).

www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2011/. Zugriff: 30. Juni 2011

1 Einleitung 5
1.1 Hintergrund 5
1.2 Zielsetzung 11
2 Ergebnisse 12
2.1 Polyvalente Peroxidase 12
2.1.1 Wildtypenzym aus *Pleurotus sapidus* 12
2.1.1.1 Induktion der polyvalenten Peroxidase 12
2.1.1.2 Reinigung einer polyvalenten Peroxidase 13
2.1.1.3 Biochemische Charakterisierung 20
2.1.1.4 Zellfreie Umsetzungen von Substraten 25
2.1.2 Rekombinantes Enzym aus *Hansenula polymorpha* 30
2.1.2.1 Expression der polyvalenten Peroxidase 31
2.1.2.2 Biochemische Charakterisierung 31
2.2 Sekretomanalyse von *Pleurotus sapidus* 35
2.2.1 Erfassung von Enzymaktivitäten als Summenparameter 35
2.2.1.1 Anwendbarkeit der kombinierten Laccase/Peroxidasemessung mittels ABTS 35
2.2.1.2 Oberflächenkulturen auf dem Rückstand einer Biogasanlage 40
2.2.1.3 Oberflächenkulturen auf Rapsstroh 46
2.2.1.4 Submerskulturen mit dem Rückstand einer Biogasanlage 52
2.2.1.5 Submerskulturen mit Rapsstroh 58
2.2.1.6 Zellfreie Umsetzung von Rapsstroh 63
2.2.2 Zweidimensionale elektrophoretische Analyse des Sekretoms 67
2.2.2.1 Optimierung der Probenvorbereitung und Visualisierung von Proteinmustern 67
2.2.2.2 Übersichtsanalyse von Oberflächenkulturen auf Rapsstroh 71
2.2.2.3 Übersichtsanalyse von Submerskulturen mit Rapsstroh 72
2.2.2.4 Kinetische Analyse von Submerskulturen mit Rapsstroh 78
3 Diskussion 98
3.1 Polyvalente Peroxidase 101
3.1.1 Wildtypenzym aus *Pleurotus sapidus* 102
3.1.2 Charakterisierung der Enzympräparation 102
3.1.3 Zellfreie Umsetzungen von Substraten mit dem Wildtypenzym 108

3.1.4 Heterologe polyvalente Peroxidase aus *Hansenula polymorpha* ..109
3.2 Sekretomanalyse von *Pleurotus sapidus* ..111
3.2.1 Erfassung von Enzymaktivitäten als Summenparameter..111
3.2.1 Zellfreie Umsetzungen von Substraten..125
3.2.2 Zweidimensionale elektrophoretische Analyse des Sekretoms ..126
3.2.3 Kinetische Analyse von Submerskulturen mit Rapsstroh..128
3.3 Fazit und Ausblick ..133
4 Experimenteller Teil ..135
4.1 Verwendete Mikroorganismen..135
4.2 Verwendete Geräte ..135
4.3 Verwendete Chemikalien ..136
4.4 Verwendete Ultrafiltrationseinheiten..139
4.5 Verwendete Gase für die Gaschromatographie ..139
4.6 Mikrobiologie ..139
4.6.1 Kultivierung von Basidiomyceten..139
4.6.1.1 Standardnährlösung-(SNL)-Medium ..139
4.6.1.2 Hauptkulturmedium ..140
4.6.1.3 Spurenelementlösung ..140
4.6.1.4 Extraktionspuffer ..140
4.6.1.5 Peptidaseinhibitor..140
4.6.1.6 Stammhaltung..140
4.6.1.7 Vorkultur..141
4.6.1.8 Submerskultur (Hauptkultur) ..141
4.6.1.9 Submerskultur (Volumenvergrößerung) ..141
4.6.1.10 Ernte der Submerskulturen..141
4.6.1.11 Emerskultur (Hauptkultur)..141
4.6.1.12 Ernte der Emerskulturen ..142
4.6.2 Kultivierung von *Hansenula polymorpha* ..142
4.6.2.1 Wachstumsmedium (YNB-Medium) ..142
4.6.2.2 Stammhaltung..142
4.6.2.3 Vorkultur..142
4.6.2.4 Hauptkultur..143
4.6.2.5 Ernte der Submerskulturen ..143

4.7 Proteinanalytik 143
4.7.1 Enzymaktivitäten 143
4.7.1.1 ABTS -Assay – Bestimmung von Laccase- und Peroxidaseaktivität 144
4.7.1.2 Manganperoxidase-Aktivität 145
4.7.1.3 β,β-Carotin-Assay 146
4.7.1.4 Esterase-Aktivität 147
4.7.1.5 Peptidase-Aktivität 148
4.7.1.6 Cellulase-Aktivität 149
4.7.1.7 Xylanase-Aktivität 149
4.7.1.8 Lipase-Aktivität 150
4.7.1.9 Phenolgehalt 151
4.7.1.10 Wasserstoffperoxidgehalt 151
4.7.1.11 Proteingehalt 152
4.7.1.12 Glucosegehalt 152
4.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelktrophorese (SDS-PAGE) 153
4.7.3 Western Blot 156
4.7.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF) 156
4.7.5 Zweidimensionale Elektrophorese 157
4.7.5.1 Fällung mit Trichloressigsäure 157
4.7.5.2 Probenaufarbeitung für die zweidimensionale Elektrophorese 157
4.7.5.3 verwendete Stammlösungen 158
4.7.5.4 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten 160
4.7.5.5 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese 161
4.7.6 Färbungen für elektrophoretische Methoden 162
4.7.6.1 Färbung mit colloidalem Coomassie Brilliant Blau (CBB) 162
4.7.6.2 Silberfärbung 163
4.7.7 Biochemische Charakterisierung der gereinigten/ heterolog exprimierten polyvalenten Peroxidase 164
4.7.7.1 Bestimmung des Molekulargewichts 164
4.7.7.2 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen 164
4.7.7.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten K_m und k_{cat} 164

4.8 Chromatographie 165
4.8.1 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) 165
4.8.1.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) 165
4.8.1.2 Ionenaustauschchromatographie (IEX) 166
4.8.1.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC) 167
4.8.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) 168
4.8.2.1 HPLC Analytik mit einer Umkehrphasen-Säule 168
4.8.2.2 HPLC Analytik zur Molekulargewichtsverteilung mit einer linearen Säule (HPSEC) 168
4.8.3 Gaschromatographie (GC) 168
4.8.3.1 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) 168
4.8.3.2 Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor (GC-MS) 169
4.9 Zellfreie (*in-vitro*) Umsetzungen 169
4.9.1 *In-vitro* Umsetzungen mit der gereinigten Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus* 169
4.9.1.1 Modellsubstrate 169
4.9.1.2 Lignin organosolv 169
4.9.2 *In-vitro* Umsetzungen mit Überständen von *Pleurotus sapidus* Submerskulturen 170
4.9.2.1 Stroh 170
4.9.3 Probenvorbereitung für die HPLC 171
4.9.4 Probenvorbereitung für die HPSEC 171
4.9.5 Probenvorbereitung für die GC-FID / GC-MS 171
5 Literaturverzeichnis 172
6 Anhang 191
6.1 Massenspektrometrische Identifizierung der gereinigten polyvalenten Peroxidase 191
6.2 Heterologe polyvalente Peroxidase aus *Hansenula polymorpha* 193
6.3 Peptiddaten der Übersichtsanalyse 194
6.4 Peptiddaten der kinetischen Sekretomanalyse 200

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Bereits 1902 entstand die Idee, Weißfäulepilze zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von pflanzlichen Abfällen einzusetzen (Falck 1902). Seit den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurden die Forschungsarbeiten am Abbau von pflanzlichem Material durch Mikroorganismen intensiviert. Die Arbeiten wurden auf mögliche Anwendung lignolytischer Systeme in der Papierindustrie, zur Gewinnung nützlicher Produkte und in der Abfallaufbereitung fokussiert. Heute bezeichnet man pflanzliches Material als nachwachsende Rohstoffe. Diese besitzen ein großes energetisches und chemisches Potential.

Die Hauptkomponenten pflanzlichen Materials sind Cellulose, Hemicellulose und Lignin, das zweithäufigste Biopolymer der Erde. Das Makromolekül Lignin ist aus den aromatischen Grundeinheiten Coniferyl-, Sinapyl- und Cumarylalkohol (Sarkanen *et al*. 1971, Adler 1977) aufgebaut. Die Phenylpropangrundeinheiten, die teilweise am Phenylring methoxyliert und am Propanrest hydroxyliert sind, werden durch Ether- und C-C-Bindungen auf unterschiedliche Weise miteinander verknüpft. So entsteht ein komplexes dreidimensionales Netzwerk, in welchem Cellulose und Hemicellulose eingebunden sind. Zur Isolierung einzelner Bestandteile, Kohlenhydrate und aromatischer Verbindungen, muss das Lignocellulosegerüst aufgeschlossen werden. Das Netzwerk ist chemisch nur schwer angreifbar, benötigt werden hohe Temperaturen und hoher Druck (Ohgren *et al.* 2006, Ruiz *et al.* 2008) oder auch ein niedriger pH-Wert (Guo *et al.* 2008). Auch für einen Großteil der Mikroorganismen stellt das Lignocellulosenetzwerk ein großes Hindernis dar.

Die effektivsten Lignocellulose-abbauenden Mikroorganismen finden sich unter den filamentösen Pilzen. Asco- und Basidiomyceten (Schlauch- und Ständerpilze) leben saprophytisch und beziehen den zum Wachstum benötigten Kohlenstoff aus ihrer Umgebung (Kendrick 2000). Sie sind neben den Bakterien die wichtigsten Destruenten der Lignocellulose und deshalb von fundamentaler Bedeutung für den Kohlenstoffkreislauf der Erde. Der Lignocelluloseabbau durch Mikroorganismen kann dabei in drei Gruppen eingeteilt werden (Huckfeldt *et al*. 2006). Bei der Moderfäule („soft rot“) wird das Holz oberflächlich durch Pilze,

überwiegend Ascomyceten und *fungi imperfecti*, angegriffen. Bei hoher Feuchtigkeit werden die Zellwände des Holzes abgebaut und somit dessen Festigkeit herabgesetzt (Daniel *et al.* 1992, Blanchette 1995). Bei der Braunfäule („brown rot“) bauen die Mikroorganismen vorwiegend Cellulose ab. Das verbleibende Lignin färbt das Holz schwarzbraun (Abbildung 1a) (Eriksson *et al.* 1990, Blanchette 1995). Bei der Weißfäule („white rot“) wird zunächst und überwiegend Lignin abgebaut und das Holz dadurch entfärbt (Abbildung 1a) (Eriksson *et al.* 1990, Blanchette 1995). Der biologische Ligninabbau verläuft in zwei Stufen: Bereits gelöste Ligninfragmente können von Bakterien, wie zum Beispiel durch Vertreter der Familie *Streptomycetaceae* (Crawford und Crawford 1980, Berrocal *et al.* 1997) oder *Pseudomonadaceae* (Zimmermann 1990) verwertet werden. Der direkte enzymatische Abbau des Holzes wird überwiegend von Weißfäulepilzen katalysiert. Einige wichtige Vertreter der Weißfäulepilze sind die *Trameten* aus der Familie der Porlingsartigen, die Seitlingsartigen (*Pleurotaceae*) (Abbildung 1b) und die Holzkeulenartigen (*Xylariaceae*) (Hlasek 2009) (Abbildung 1c).

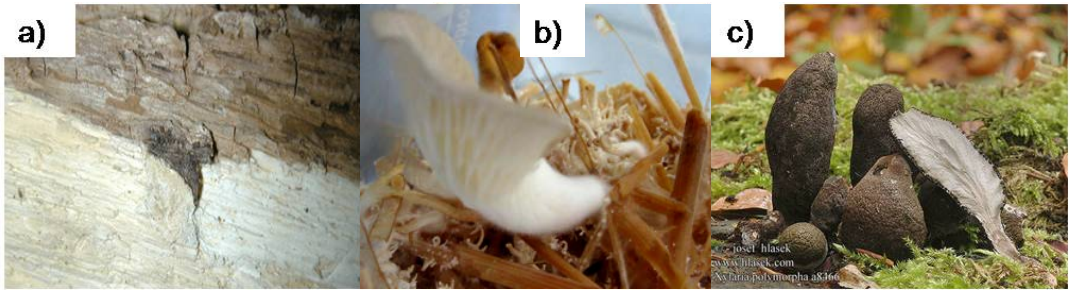


Abbildung 1: a: Holzstück mit der Braunfäule im oberen und der Weißfäule in unteren Bildteil (Rüpke und Fiedler 2010); b: Fruchtkörper des Weißfäulepilzes *Pleurotus sapidus* in einer Oberflächenkultur nach 8 Wochen, c: Fruchtkörper des Weißfäulepilzes *Xylaria polymorpha* (Hlasek 2009)

Sie nutzen eine komplexe, einzigartige Ausstattung an extrazellulären Biokatalysatoren, Sekretom genannt, die ihnen den Aufschluss von lignifizierten Biopolymeren ermöglicht. Diese extrazellulären Enzyme lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe umfasst die Enzyme, welche die Kohlenhydrate Cellulose und Hemicellulose und das Lignin direkt umsetzen. Dazu gehören unter anderem Cellulasen und Xylanasen (Baldrian *et al.* 2005), Phenoloxidasen für den Ligninabbau und Dioxygenasen (Hofrichter und Ullrich 2006, Scheibner *et al.* 2008, Liers *et al.* 2010). Die Enzyme der zweiten Gruppe

katalysieren den Ligninabbau nur indirekt; dazu gehören Superoxid-Dismutasen (Gralla und Kosman 1992). In einer dritten Gruppe werden die Enzyme zusammengefasst, die unterschiedliche Metabolismen miteinander verknüpfen. Diese Gruppe enthält unter anderem Glyoxaloxidase, Arylalkoholoxidasen, Glucoseoxidasen, Pyranoseoxidasen und Cellobiosedehydrogenasen (Kersten *et al.* 1995, Varela *et al.* 2000, Zamocky *et al.* 2006).

In vorangegangenen Arbeiten zum Holzabbau durch Basidiomyceten lag der Fokus vorwiegend auf der Charakterisierung der unmittelbar am Ligninabbau beteiligten Oxidoreduktasen und der Entschlüsselung der beteiligten Reaktionsmechanismen (Abbildung 2). Zahlreiche Manganperoxidasen, Ligninperoxidasen und Laccasen wurden biochemisch charakterisiert und ihre Sequenzen in Gendatenbanken hinterlegt (http://srs6.ebi.ac.uk/ 30.06.2011). Auch Peroxidasen vom Dye-Decoulorising-Typ (DyP) und polyvalente Peroxidasen wurden bislang für unterschiedliche Weißfäulepilze beschrieben (Hofrichter *et al.* 1999, Scheibner *et al.* 2008).

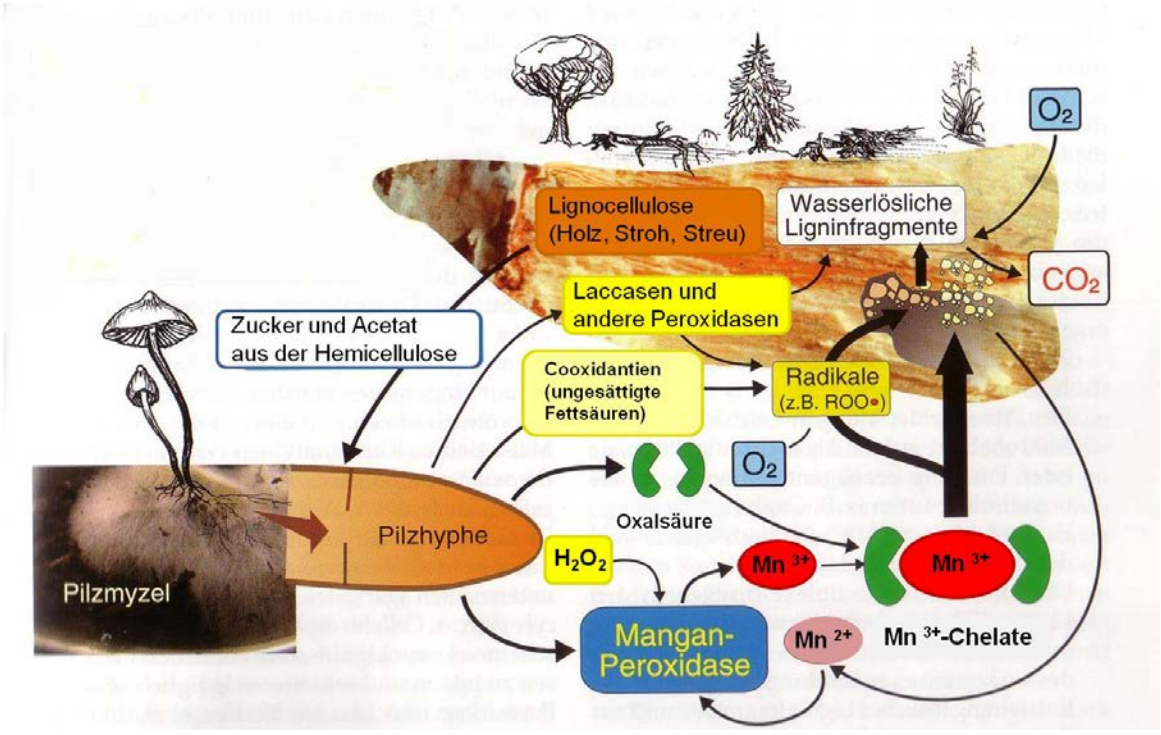


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ligninkreislaufs in holzzersetzenden Basidiomyceten, modifiziert nach (Hofrichter *et al.* 2001b)

Das Sekretom von Basidiomyceten enthält neben den typischen lignolytischen und Wasserstoffperoxid-produzierenden Enzymen auch zahlreiche Glycosidasen

und Esterasen/Lipasen. Des Weiteren wurden unterschiedliche Peptidasen in Kulturen von *Pleurotus sapidus* (Zorn *et al.* 2005a), *Pleurotus ostreatus* (Faraco *et al.* 2005) und *Phanerodontia chrysosporium* (Wymelenberg *et al.* 2005) detektiert. Darüber hinaus wiesen Untersuchungen von *Xylaria* Spezies auf die Bildung spezieller Esterasen, die am Holzabbau beteiligt sind (Liers *et al.* 2006) hin.

Zur Charakterisierung der Sekretome von Basidiomyceten sind umfangreiche Informationen über die Art, den Umfang, die Induktion und die kinetischen Parameter der beteiligten Enzyme notwendig. Diese Informationen sind am besten aus hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophoresen und anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der beteiligten Proteine zu gewinnen. Die zweidimensionale Gelelektrophorese kombiniert die Trennung von Proteinen nach ihrem isoelektrischem Punkt (erste Dimension) und nach ihrem Molekulargewicht (zweite Dimension). Dieses Trennverfahren für komplexe Proteingemische wurde von O´Farrell (1975) und Klose (1975) unabhängig voneinander entwickelt. Die heutige Technik erlaubt die Ausführung im Hochdurchsatzverfahren, bei dem bis zu 12 Proben gleichzeitig analysiert werden können. Moderne Auswertesoftware ermöglicht den quantitativen Vergleich einzelner Proteine untereinander oder die Auswertung kinetischer Parameter einzelner Proteine in komplexen Gemischen (Bandow *et al.* 2008).

Unter statischen Bedingungen wurden Sekretome einzelner Basidiomyceten bereits untersucht. Von *Phanerodontia chrysosporium* wurden Sekretomanalysen auf Weichholz (21 Tage statischer Kultur, Ravalason *et al.* 2008), und auf Eichenholz (21 Tage statischer Kultur, Abbas *et al.* 2005) durchgeführt. Das Sekretom von *Pleurotus sapidus* wurde auf den Substraten Erdnussschalen und Glaswolle/Glucose (2 - 7 Tage, statisch-dynamische Kultur, Zorn *et al.* 2005b) untersucht.

Die Entschlüsselung des extrazellulären Enzymsystems von holzzersetzenden Mikroorganismen soll zukünftig zu einer besseren stofflichen Nutzung des Rohstoffs Lignocellulose führen. Nach Schätzungen beträgt die jährliche globale Biomasseproduktion derzeit etwa 200 Milliarden Tonnen (Strasburger *et al*. 2002). Verholzte Pflanzen besitzen einen Anteil von 15 – 30% Lignin (50 - 60

Milliarden Tonnen pro Jahr), sowie eine Anteil an aromatischen Strukturen von ca. 40% im Lignin. Bereits heute wird Lignin aus Nebenströmen der Industrie, wie zum Beispiel die „Schwarzlauge“ aus der Papierindustrie, als Energielieferant eingesetzt. Die Schwarzlauge besitzt einen hohen Heizwert, der den Bedarf einer Papierfabrik zu ~80% deckt (Kamm *et al*. 2006). Auch Lignosulfonate aus dem Sulfitverfahren werden bereits als Dispergier- und Bindemittel, zum Beispiel in Beton, Lacken oder Düngemitteln, eingesetzt. Genutzt werden hier die polyelektrolytischen Eigenschaften, die Adsorptionswirkung, die geringe Viskosität und die dunkle Farbe der Ligninsulfonate (Faix 1992). Lignin kann ebenfalls als Biowerkstoff eingesetzt werden. So besteht zum Beispiel ARBOFORM®, ein Biowerkstoff der Firma Tecnaro GmbH, hauptsächlich aus Lignin und Cellulose. Er ist thermoplastisch verformbar und kann mit etablierten Kunstoffverarbeitungsverfahren bearbeitet werden. Arboform® kann daher eine Alternative zu herkömmlichen Kunststoffen aus der Petrochemie sein.

Die zukünftigen Verwendungsmöglichkeiten des nachwachsenden Rohstoffs Lignocellulose lassen sich in drei Bereiche gliedern: Energie, Makromoleküle und Aromaten bzw. Feinchemikalien. Eine Bioraffinerie nach dem Prinzip der ganzheitlichen Nutzung von Biomasse (Abbildung 3) steht derzeit im Interesse der Forschung.

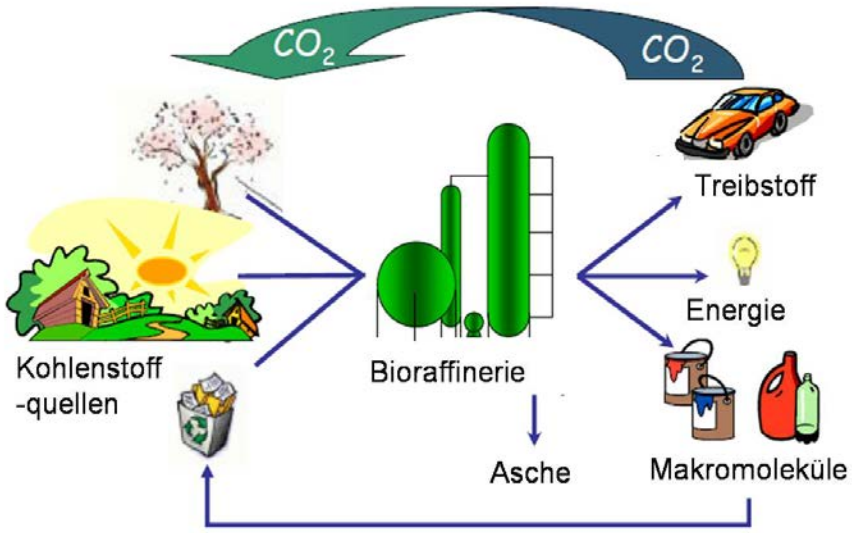


Abbildung 3: schematische Darstellung einer Bioraffinerie, modifiziert nach (Holladay *et al.* 2007)

Ein Praxisbeispiel ist die Grüne-Bioraffinerie-Demonstrationsanlage in Utzenaich. In der 2009 in Betrieb gegangenen Anlage werden aus Grassilage Milchsäure und Aminosäuren gewonnen. In künftig entstehenden Bioraffinerien könnten aus dem nachwachsenden Rohstoff Lignocellulose Makromoleküle und Feinchemikalien entstehen (Abbildung 4, Holladay *et al.* 2007). Somit könnten Teile der petrochemischen Produkte ersetzt werden. Die dabei freigesetzten Kohlenhydrate könnten zudem große Mengen Biokraftstoffe liefern oder zur Papierherstellung genutzt werden.

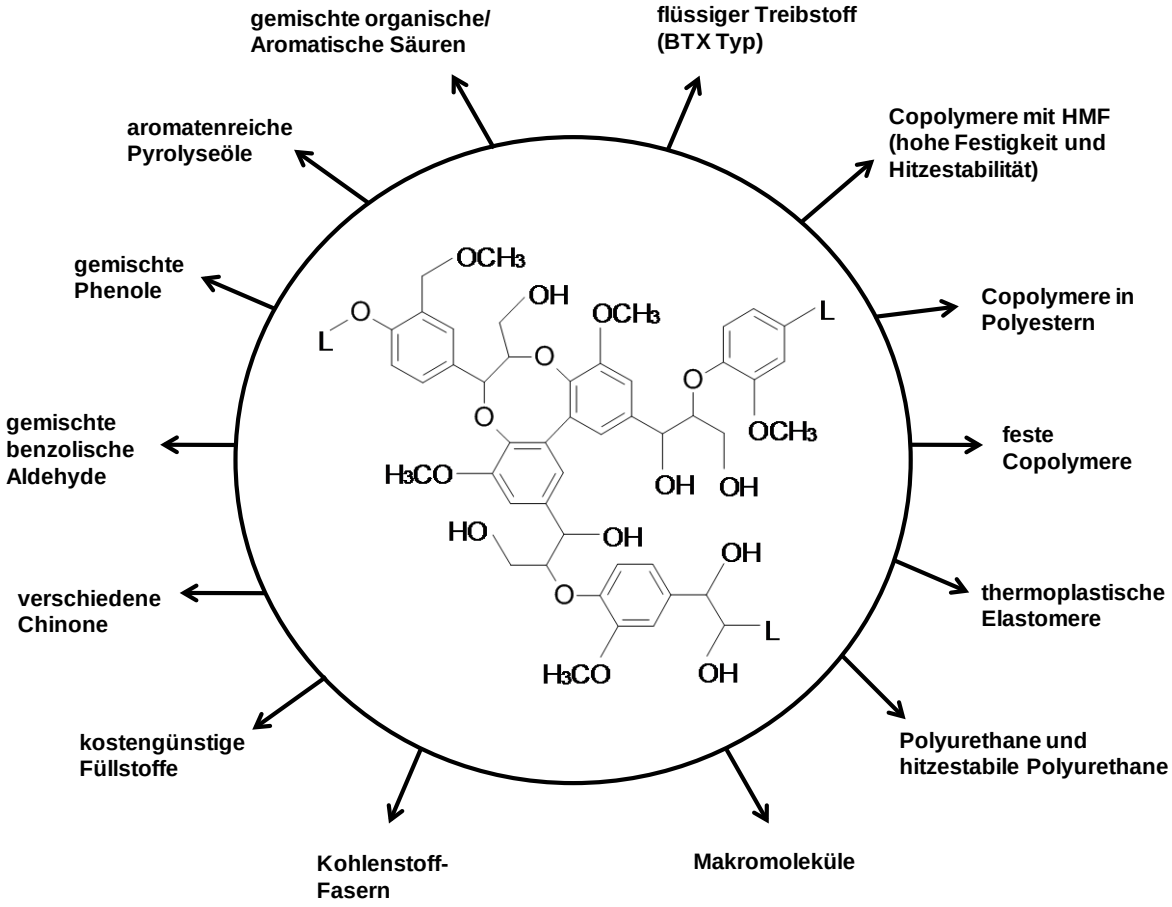


Abbildung 4: schematische Darstellung der Produktmöglichkeiten aus dem Rohstoff Lignin, modifiziert nach (Holladay *et al.* 2009)

Wenn es in der Zukunft möglich wäre, einen Teil des Papierbedarfs aus strohähnlichen Materialien zu decken, könnten große Einsparungen beim Energie- und Prozesswasserverbrauch erzielt werden. Darüber hinaus könnte auf bis zu 40% der für die Bleichung notwenigen aggressiven Chemikalien (z. B. ClO_2) verzichtet werden.

1.2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte ein Schlüsselenzym des Lignocelluloseabbaus, die polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* chromatographisch gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Das gereinigte Wildtypenzym und das in *Hansenula polymorpha* heterolog exprimierte Enzym sollten in zellfreien Umsetzungen von Ligninmodellsubstraten eingesetzt werden.

In Erweiterung dieser Arbeiten sollte der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* submers (Flüssigkultur) und emers (Oberflächenkultur) auf Rapsstroh kultiviert und die extrazellulären Enzymaktivitäten über den Kulturverlauf hinweg qualitativ und quantitativ erfasst werden. Als ein weiteres lignocellulosehaltiges Substrat sollte der Rückstand einer Biogasanlage eingesetzt werden. Die zeitaufgelöste Analyse umfasste photometrische Methoden und hochauflösende, zweidimensionale elektrophoretische Trennungen. Schlüsselenzyme aus dem Sekretom von *Pleurotus sapidus* sollten massenspektrometrisch identifiziert und die Kinetik der Enzymexpression bioinformatisch ausgewertet werden. Zellfreie Umsetzungen sollten mit den Überständen der *Pleurotus sapidus* Kulturen mit unterschiedlichen Ligninmodellsubstraten durchgeführt werden.

2 Ergebnisse

2.1 Polyvalente Peroxidase

Für die zellfreie Umsetzung von Ligninmodellsubstraten und Lignocellulose wurde die Sekretion einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* zunächst induziert. Das Wildtypenzym wurde chromatographisch gereinigt und biochemisch charakterisiert.

2.1.1 Wildtypenzym aus *Pleurotus sapidus*

2.1.1.1 Induktion der polyvalenten Peroxidase

Zur Induktion der polyvalenten Peroxidase wurde der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* submers in einem Minimalmedium (4.6.1.2), im 200 mL-Maßstab kultiviert. Als Kohlenstoffquelle wurden unterschiedliche lignin-haltige Substrate (20 g L^{-1}) eingesetzt: Rapsstroh (Durchmesser 3 mm und ~15 mm), der Rückstand einer Biogasanlage, Kakaoschalen (ganz und gemörsert) und Lignin organosolv bei unterschiedlichen pH-Werten des Mediums (pH-Wert 6,0 und 8,0). Die Enzymaktivität wurde täglich bestimmt (4.7.1.3). Die Kombination aus Minimalmedium (4.6.1.2) und dem Rückstand einer Biogasanlage als Kohlenstoffquelle zeigte nach acht Kulturtagen die höchste Enzymaktivität mit 0,2 U mg^{-1} (Abbildung 5).

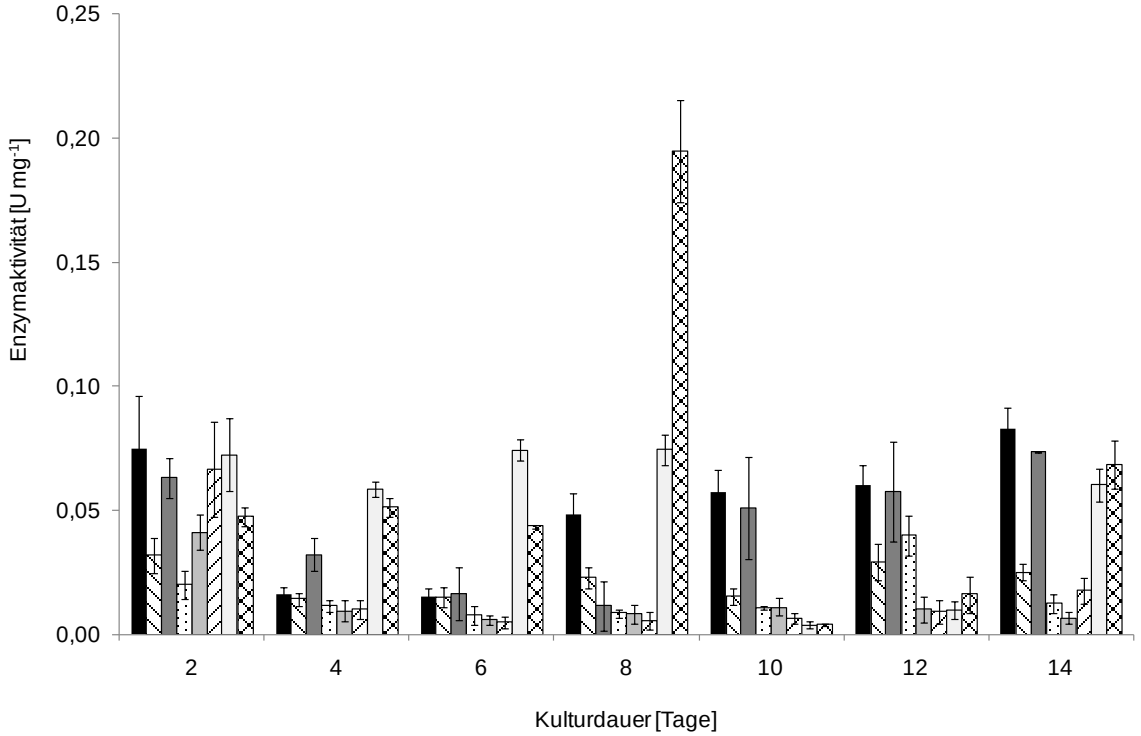


Abbildung 5: Vergleich der Aktivitäten der polyvalenten Peroxidase in Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* auf unterschiedlichen Substraten; Kakaoschale 3 mm (schwarz), Rückstand Biogasanlage (schraffiert, absteigend), Lignin organosolv pH 6,0 (dunkelgrau), Lignin organosolv pH 8,0 (gepunktet), Rapsstroh 3 mm (grau), Rapsstroh 10-20 mm (schraffiert, aufsteigend), Rapsstroh 10-20 mm mit Hefeextrakt (hellgrau) und Rückstand Biogasanlage mit Hefeextrakt (gekreuzt)

2.1.1.2 Reinigung einer polyvalenten Peroxidase

Die Reinigung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Langhoff (2002). Die Kulturüberstände von *Pleurotus sapidus* wurden mittels Ultrafiltration (10 kDa Ausschluss, Macrosep®) um den Faktor 10 konzentriert und auf den Startpuffer (4.8.1.1 bis 4.8.1.3) der jeweiligen Reinigungsstufe umgepuffert.

a) Hydrophobe Interaktionschromatographie

Das Zielprotein wurde bei einem pH von 3,5 und einer Salzkonzentration von 1 mol L^{-1} Natriumchlorid an eine hochsubstituierte Phenyl-Sepharose-Matrix gebunden (4.8.1.1). Die Elution erfolgte mit einem Puffer abnehmender Ionenstärke. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden auf ihre Aktivität hin untersucht. Aktivität wurde in den Fraktionen 35-37 detektiert (Abbildung 6). Bei einer Wiederfindung von 66% wurde ein Reinigungsfaktor von 10,8, bezogen auf die spezifische Aktivität, erzielt (Tabelle 1).

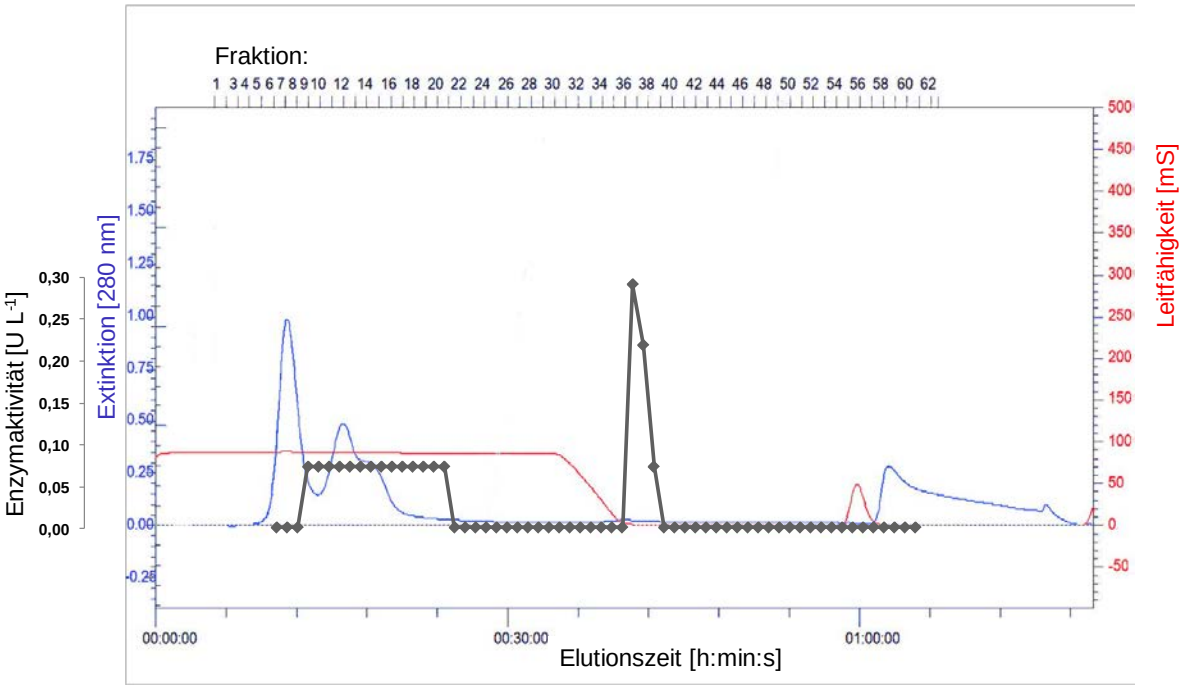


Abbildung 6: Hydrophobe Interaktionschromatographie an einer hochsubstituierten Phenyl-Sepharose-Matrix; blau: Extinktion (λ = 280 nm); rot: Leitfähigkeit [mS]; schwarz: Enzymaktivität [U L^{-1}] gemessen mittels β,β-Carotin Assay

Tabelle 1: Bilanzierung der Reinigung an einer Phenyl-Sepharose-Matrix mit einem Natriumchloridgradienten

	Aktivität [U L^{-1}]	**Spezifische Aktivität [U mg^{-1}]**	**Gesamt-aktivität [mU]**	**Wieder-findung [%]**	**Reinigungs-faktor**
Kulturüberstand	0,2 ± 0,02	0,005 ± 0,0006	2		
nach Konzentrierung	0,41 ± 0,03	0,012 ± 0,001	1,81	91	2,4
nach HIC	0,18 ± 0,02	0,054 ± 0,008	1,32	66	10,8

b) Ionenaustausch Chromatographie

Für die Ionenaustauschchromatographie wurde ein schwacher Anionenaustauscher (DEAE Sepharose) eingesetzt. Das Zielprotein wurde bei einem pH-Wert von 4,5 an die Matrix gebunden und mit einem Shift zu pH 3,0 eluiert (4.8.1.2).

Aktivität wurde in drei Fraktionen detektiert (Abbildung 7), 71% der eingesetzten Aktivität wurden von der Säule eluiert.

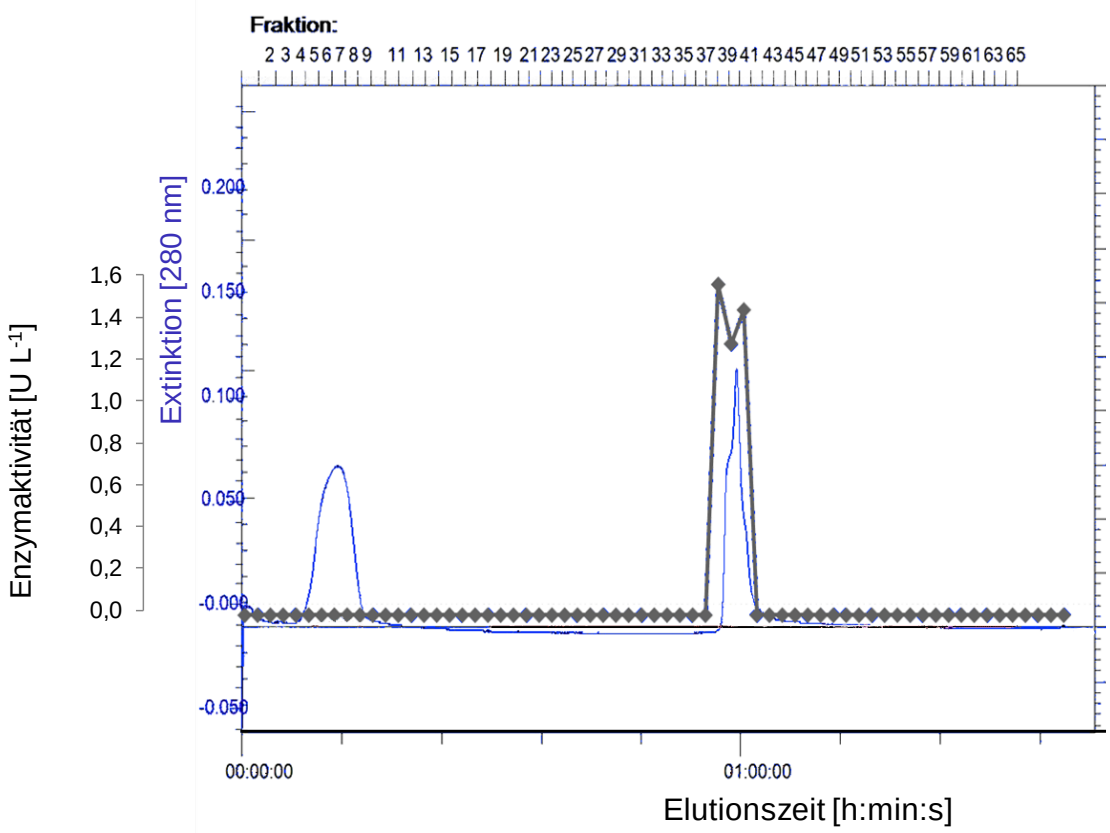


Abbildung 7: Ionenaustauschromatographie an einem schwachen Anionentauscher (DEAE-Sepharose); blau: Extinktion (λ = 280 nm); schwarz: Enzymaktivität [U L^{-1}] gemessen mittels β,β-Carotin Assay

c) Gelfiltrationschromatographie

Für die Gelfiltrationschromatographie (4.8.1.3) wurde eine analytische Sephadexsäule eingesetzt. Das Zielprotein wurde bei einem pH-Wert von 4,5 und Zusätzen an Eisen-, Mangan-, Zink- und Kupfersalzen zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten eluiert.

Aktivität wurde in insgesamt zwei Fraktionen detektiert (Abbildung 8). 72% der eingesetzten Gesamtaktivität wurden von der Säule eluiert.

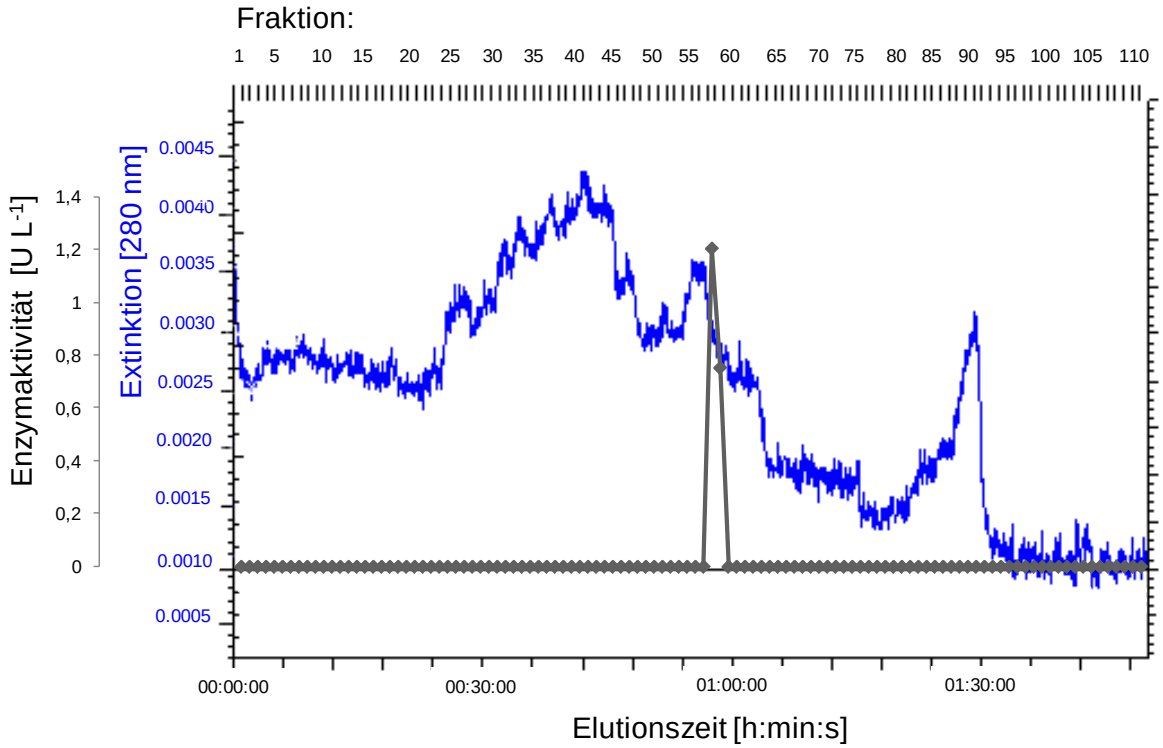


Abbildung 8: Gelfiltrationschromatographie an einer analytische Sephadexsäule; blau: Extinktion (λ = 280 nm); schwarz: Enzymaktivität [U L^{-1}] gemessen mittels β,β-Carotin Assay

d) Kombinierte Reinigung

Der Kulturüberstand von *Pleurotus sapidus* wurde mittels tagentialer Ultrafiltration konzentriert und die hydrophobe Interaktionschromatographie als ersten Reinigungsschritt genutzt. Die aktiven Fraktionen mehrerer Läufe wurden gepoolt und in der zweiten Reinigungsstufe (DEAE) eingesetzt. Die aktiven Fraktionen mehrerer Läufe wurden wiederum gepoolt, mittels Ultrafiltration (10 kDa Ausschluss, Macrosep®) konzentriert und der Gelfiltration zugeführt. Das erhaltene Enzympräparat besaß eine spezifische Aktivität von 1,3 U mg^{-1} und wurde mit einer Ausbeute von 12% aus Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* gereinigt. Der Reinigungsfaktor betrug, bezogen auf die spezifische Aktivität, 130 (Tabelle 2).

Tabelle 2: Bilanzierung der Reinigung einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*

	Aktivität [U L^{-1}]	Spezifische Aktivität [U mg^{-1}]	Gesamt-aktivität [U]	Ausbeute [%]	Reinigungs-faktor
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

e) Charakterisierung der Enzympräparation

Nach erfolgter chromatographischer Reinigung über drei Stufen wurde eine Trennung mittels SDS-PAGE (4.7.2) durchgeführt und mittels Colloidal Coomassie (4.7.6.1) gefärbt. Der Reinigungseffekt wurde über die gesamte Reinigung dokumentiert (Abbildung 9 links). Nach der Gelfiltrations-chromatographie wurden zwei Hauptbanden mit abgeschätzten Molekulargewichten von 26 und 38 kDa detektiert. Es wurde ebenso eine isoelektrische Fokussierung (4.7.4) mit anschließender Färbung (4.7.6.1) durchgeführt. Dabei wurden zwei Banden mit pI-Werten von 3,6 und 3,7 detektiert (Abbildung 9 rechts).

Die zwei Hauptbanden mit abgeschätzten Molekulargewichten von 26 und 38 kDa wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten. Die Sequenzierung der ausgeschnittenen Banden erfolgte nach tryptischem Verdau und anschließender Analyse mittels MALDI-MS/MS (Tabelle 3, Massenspektren s. Anhang a1). 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 *Pleurotus sapidus* (Zugriffsnummer CAJ01576) gefunden. Zudem ergab die Datenbankrecherche für die Peptide eine Homologie von 94% zu polyvalenten Peroxidasen aus *Pleurotus eryngii* (Zugriffsnummern Q9UR19.1 und o94753.1)

und eine 80%ige Homologie zu einer polyvalenten Peroxidase aus *Bjerkandera adusta* (Zugriffsnummer ABQ44529.1). In der Aminosäuresequenz des Proteins wurde die mutmaßliche Lage der Peptidsequenzen bestimmt (Abbildung 10).

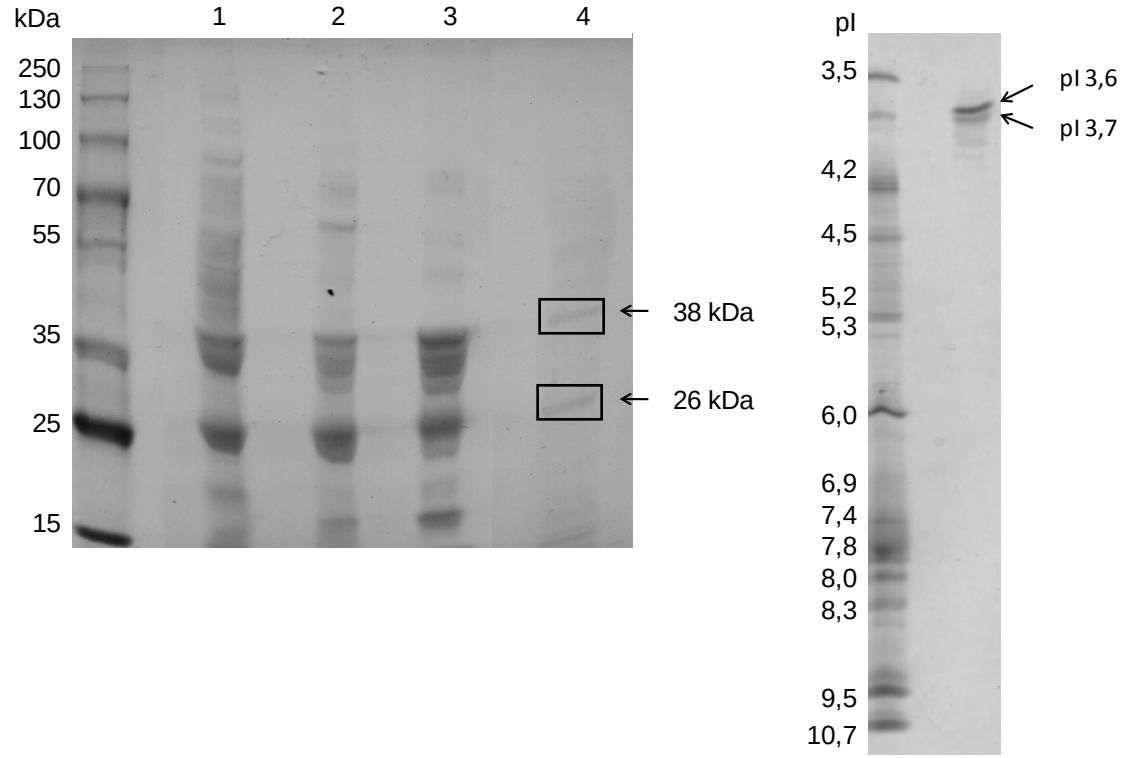


Abbildung 9: links: SDS-PAGE (Gradientengel (Serva) 8-16%ig) der einzelnen Reinigungsstufen der *β,β*-Carotin-abbauenden Enzyme aus *P. sapidus* 1: konz. Kulturüberstand, 30 µL; 2: konz. HIC-Fraktionen, 30 µL; 3: konz. DEAE-Fraktionen, 30 µL; 4: konz. GFC-Fraktion , 30 µL; rechts: IEF-Gel (pH 3-10) der konz. GFC-Fraktion, 10 µL

Tabelle 3: 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	

38 kDa-Bande:

```
CAJ01576   MSFKTLSALVLALGAAVQFTSAAVPRVQKRATCADGRTTANAACCVLFPILDDIQENLFDG
Peptid 1   ------------------------------------------------------------
Peptid 2   ------------------------------------------------------------
Peptid 3   ------------------------------------------------------------

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

CAJ01576   AKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPGGVRIPFFLGRPDAVAASPDHLVPEPFDSVDTILARMG
Peptid 1   ------------------------------------------------------------
Peptid 2   ------------------------------------------------------------
Peptid 3   ------------------------------------------------------------

CAJ01576   DAGFSAVEVVWLLASHSIAAADLVDPSIPGTPFDSTPGVFDSQFFIETQLKGRLFPGTPDN
Peptid 1   ------------------------------------------------------------
Peptid 2   -----------------------------------------------------LFPGTPDN
Peptid 3   ------------------------------------------------------------

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

CAJ01576   IDCSDVIPTPPALVGAAHLPAGFSLSDVEQACAETPFPALTADPGPVTSVPPVPGS
Peptid 1   ------------------------------------------------------
Peptid 2   ------------------------------------------------------
Peptid 3   ------------------------------------------------------
```

26 kDa-Bande:

```
CAJ01576   MSFKTLSALVLALGAAVQFTSAAVPRVQKRATCADGRTTANAACCVLFPILDDIQENLFDG
Peptid 1   ------------------------------------------------------------

CAJ01576   GQCGEEVHESLRLTFHDAIGFSPTLGGGGADGSIITFDTIETVFPANAGIDEIVSAQKPFV
Peptid 1   ------------------------------------------------------------

CAJ01576   AKHNISAGDFIQFAGAVGVSNCPGGVRIPFFLGRPDAVAASPDHLVPEPFDSVDTILARMG
Peptid 1   ------------------------------------------------------------

CAJ01576   DAGFSAVEVVWLLASHSIAAADLVDPSIPGTPFDSTPGVFDSQFFIETQLKGRLFPGTPDN
Peptid 1   -----------------------------------------------------LFPGTPDN

CAJ01576   KGEVQSPLQGEIRLQSDHLLARDPQTACEWQSMVNNQPKIQNRFAATMSKMALLGQDKSKL
Peptid 1   KGEVQSPLQGEIR-------------------------------------------------

CAJ01576   IDCSDVIPTPPALVGAAHLPAGFSLSDVEQACAETPFPALTADPGPVTSVPPVPGS
Peptid 1   ------------------------------------------------------
```

Abbildung 10: 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 3

Der N-Terminus des gereinigten Enzyms wurde nach einem Westernblot (4.7.3) mittels Edman-Abbau (Analytischer Service des biochemischen Institutes, Justus-Liebig-Universität Giessen) ansequenziert. Die ersten zehn Aminosäuren des reifen Proteins wurden bestimmt: NH_2 – AT(C)ADGGTTA (Abbildung 10) 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 *Pleurotus sapidus* (Zugriffsnummer CAJ01576) und *Pleurotus eryngii* (Zugriffsnummer Q9UR19.1) und zu Manganperoxidasen aus weiteren *Pleurotus* sp. gefunden.

2.1.1.3 Biochemische Charakterisierung

Die Enzympräparation aus der kombinierten Reinigung wurde konzentriert, die Konzentration mittels Bradford-Assay bestimmt (4.7.1.11) und biochemisch charakterisiert. Hierzu wurden die optimalen Reaktionsbedingungen (4.7.7.2) und die kinetischen Konstanten (4.7.7.3) für verschiedene Substrate bestimmt.

a) Optimierung der Reaktionsbedingungen

Für die Optimierung der Reaktionsbedigungen wurden in jedem Ansatz 0,1 nMol des gereinigten Enzyms eingesetzt. Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurde das gereinigte Enzym mit einem 50 mM Natriumacetatpuffer versetzt und der β,β-Carotin Aktivitätsassay bei 30 °C durchgeführt (4.7.1.3). Der optimale pH-Wert betrug 4,5 (Abbildung 11), daher wurden alle weiteren Messungen bei diesem pH-Wert durchgeführt. Bei der Bestimmung des Temperaturoptimums wurden alle verwendeten Lösungen jeweils fünf Minuten bei der gewünschten Temperatur vorinkubiert, die Enzympräparation zugefügt und die Aktivität bestimmt. Die optimale Reaktionstemperatur betrug 30 °C (Abbildung 12). Diese Temperatur wurde für alle weiteren Messungen verwendet. Um den Einfluss der Wasserstoffperoxidkonzentration zu bestimmen, wurden Konzentrationen von 0,05 bis 4 mM im Aktivitätstest eingesetzt. Die optimale Konzentration lag bei 2 mM (Abbildung 13) und wurde in weiteren Versuchen eingesetzt.

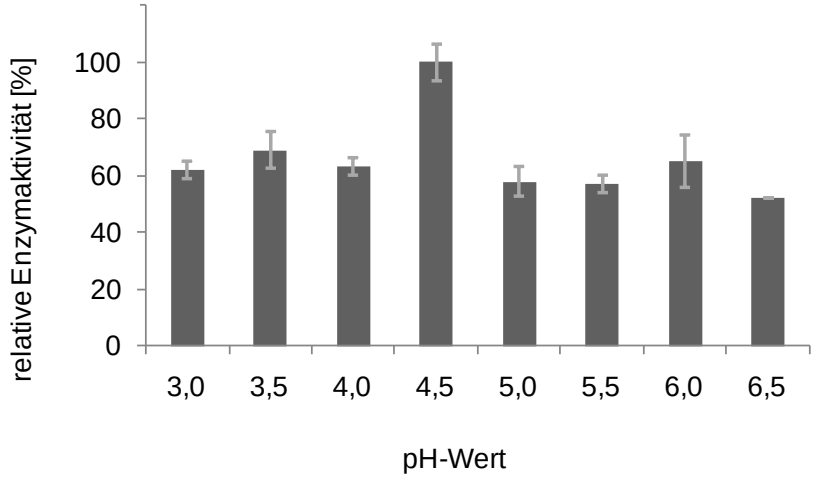


Abbildung 11: relative Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert des 50 mM Natriumacetatpuffers

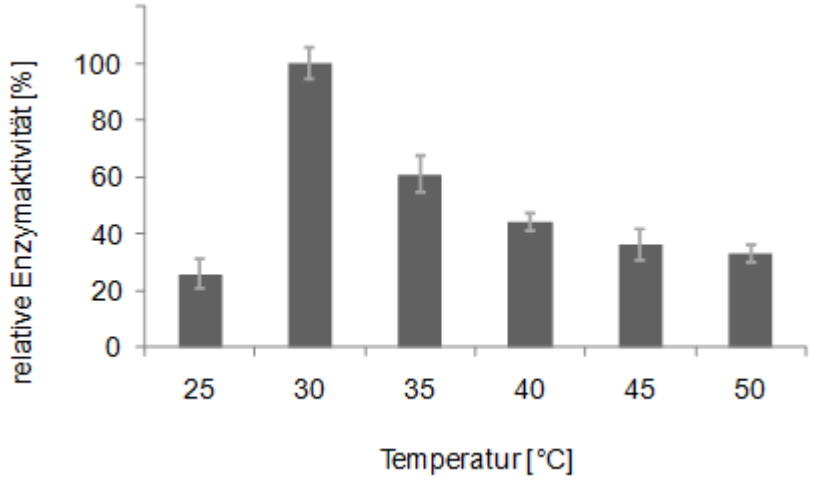


Abbildung 12: relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur

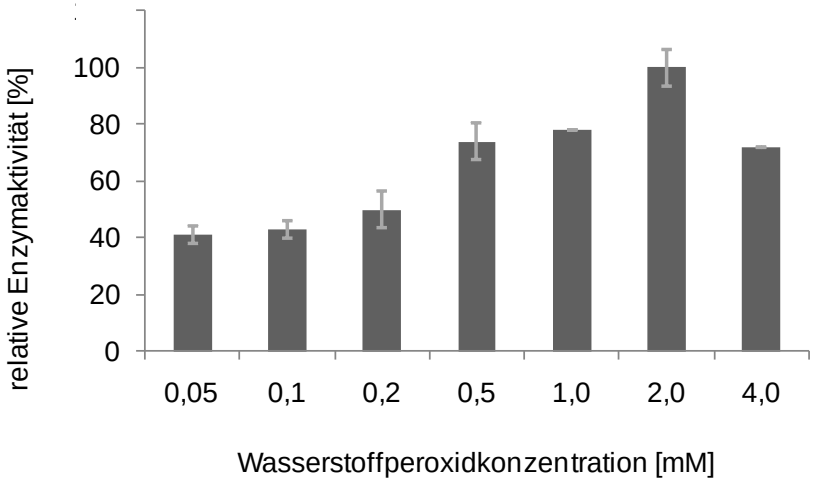


Abbildung 13: relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxidkonzentration

Zur Steigerung der Enzymaktivität wurden Mangansulfat und Coniferylalkohol zugesetzt. Die optimalen Konzentrationen betrugen hier 0,2 mM Mangansulfat (Abbildung 14 oben) beziehungsweise 5 µM Coniferylalkohol (Abbildung 14 unten). Ein Vergleich der Standardassaybedingungen (4.7.1.3) mit den optimierten Assaybedingungen erbrachte eine Aktivitätssteigerung um 150% bezogen auf die Standardbedingungen (Abbildung 15).

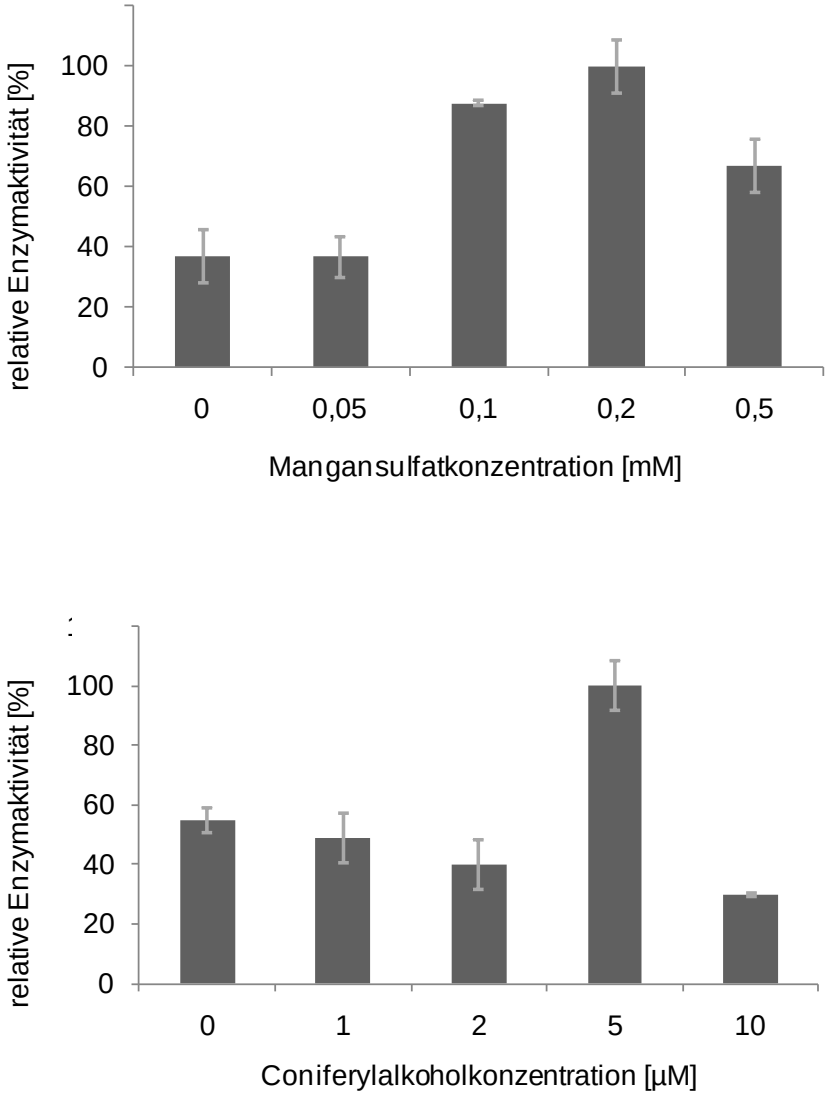


Abbildung 14: relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Mangansulfatkonzentration (oben), der Coniferylalkoholkonzentration (unten)

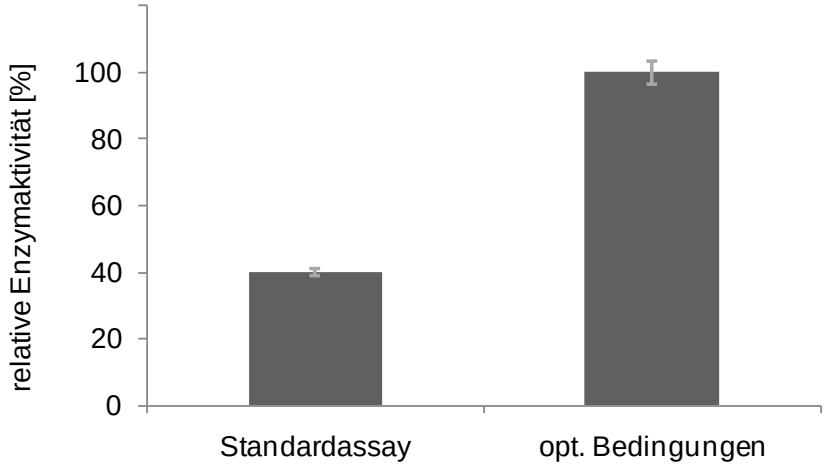


Abbildung 15: relative Enzymaktivität der polyvalenten Peroxidase: Vergleich der Standardassaybedingungen (50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5, 30 °C und 0,35 mM Wasserstoffperoxid) mit den optimierten Bedingungen (50 mM Natriumacetatpuffer pH 4,5, 30 °C, 2 mM Wasserstoffperoxid, 0,2 mM Mangansulfat und 5 µM Coniferylalkohol)

b) Bestimmung der kinetischen Konstanten der Enzympräparation

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten (4.7.7.3) wurde die Reaktionsgeschwindigkeit so eingestellt, dass sie während der ersten fünf Minuten im linearen Bereich lag. Die Proteinkonzentrationen der verwendeten Enzymlösung wurde mittels Bradfordassay (4.7.1.11) bestimmt. Für das Substrat Syringol wurden 0,01 nMol Enzym und für die restlichen Substrate wurden 0,025 nMol 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-Diagrammm aufgetragen (Abbildung 16).

In Abhängigkeit vom Substrat wurden Wechselzahlen von 993 bis 54471 s^{-1} bestimmt (Tabelle 4). Die katalytischen Konstanten betrugen 0,13 bis 3,95 10^8 M^{-1} s^{-1}.

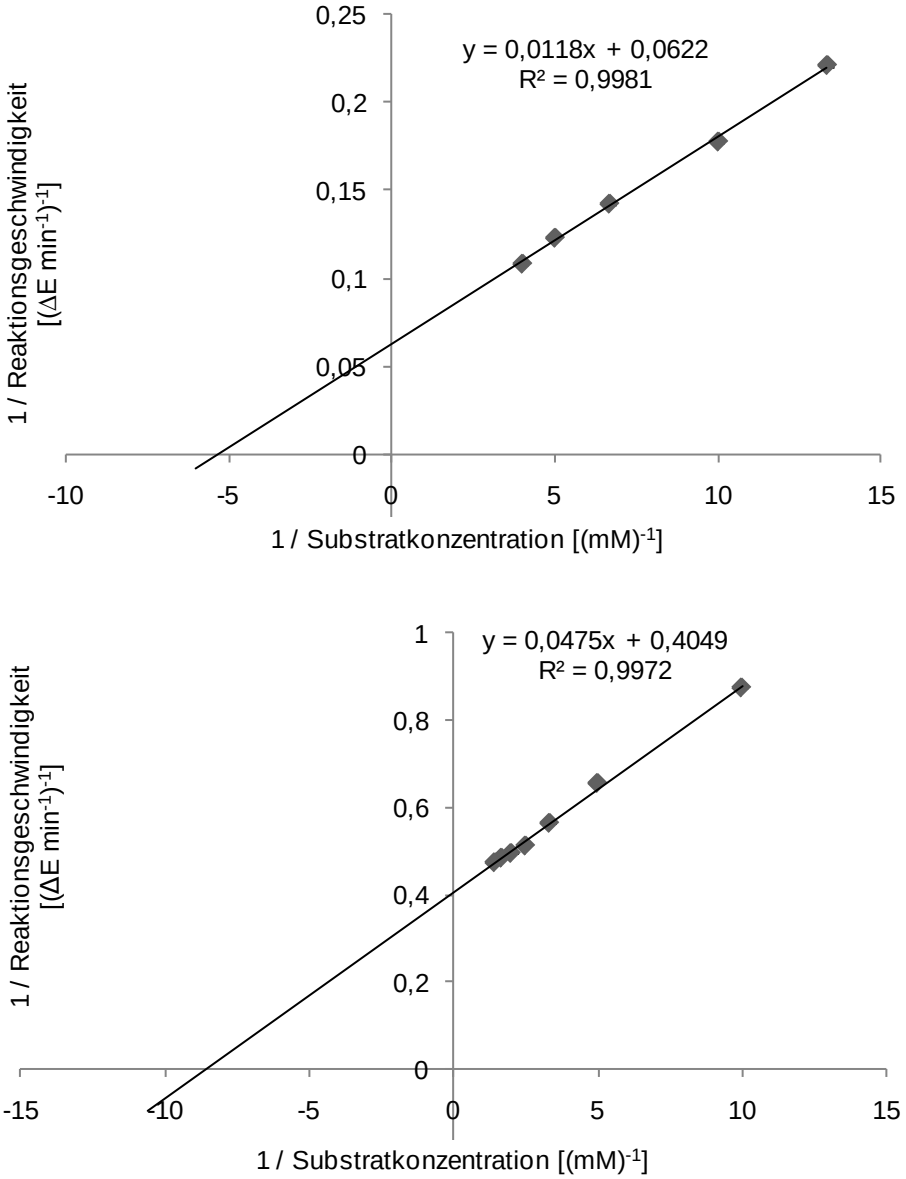


Abbildung 16: Lineweaver-Burk-Diagramm des gereinigten Enzyms aus *Pleurotus sapidus* mit verschiedenen Substratkonzentrationen an ABTS (oben) und Veratrylalkohol (unten)

Tabelle 4: Michaelis-Menten-Konstante (K_m), Wechselzahl (k_{cat}) und katalytische Konstante (k_{cat} K_m^{-1}) der Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus*

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

2.1.1.4 Zellfreie Umsetzungen von Substraten

Die gereinigte Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus* besaß optimale katalytische Eigenschaften bei einem pH-Wert von 4,5, einer Temperatur von 30 °C und einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 2 mM. Mit diesen Bedingungen wurden Umsetzungen mit verschiedenen Ligninmodellsubstraten durchgeführt (4.9.1.1).

Das Edukt Veratrylalkohol wurde durch die polyvalente Peroxidase umgesetzt (Abbildung 17), wobei ein neues Produkt entstand. Die Anfangskonzentration des Veratrylalkohols wurde innerhalb von 12 Stunden bis auf 1% ab- (Abbildung 18) und quantitativ zum Produkt umgebaut.

Zur Identifizierung des Reaktionsproduktes wurden die Proben mittels Mikroextraktion mit Pentan/Diethylether und mittels GC-MS untersucht (4.8.3.2). Über einen Datenbankvergleich wurde das Produkt als Veratrumaldehyd (Abbildung 19 unten) identifiziert. Essigsäure war im eingesetzten Puffersystem (4.9.1.1) vorhanden.

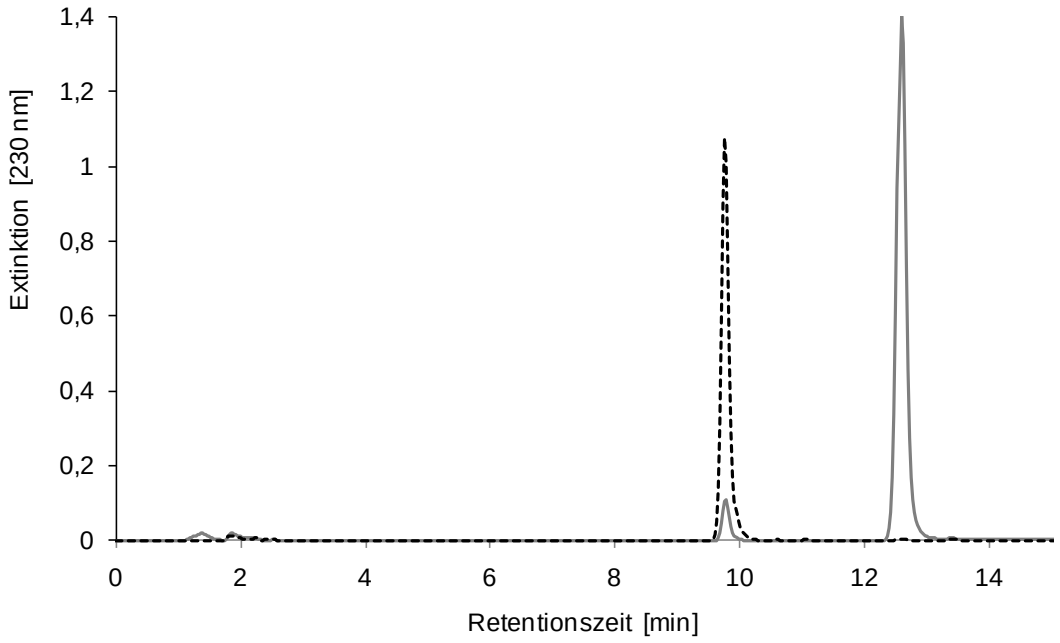


Abbildung 17: HPLC-DAD Chromatogramm einer *in-vitro* Umsetzung von Veratrylalkohol mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*, gestrichelte Linie: Blindprobe, graue Linie: Umsatz nach 24 h

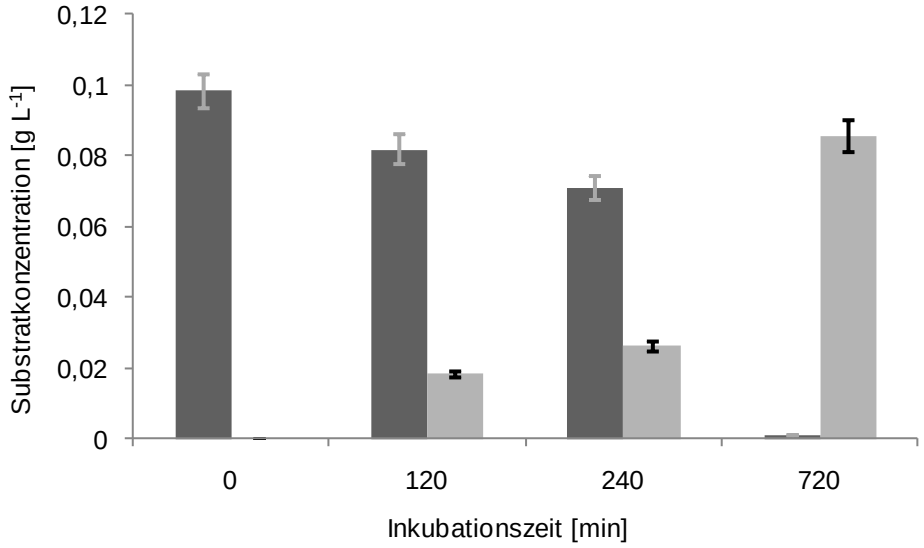


Abbildung 18: *In-vitro* Umsetzung von Veratrylalkohol mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*, dunkelgrau: Edukt Veratrylalkohol, hellgrau: Produkt Veratrumaldehyd

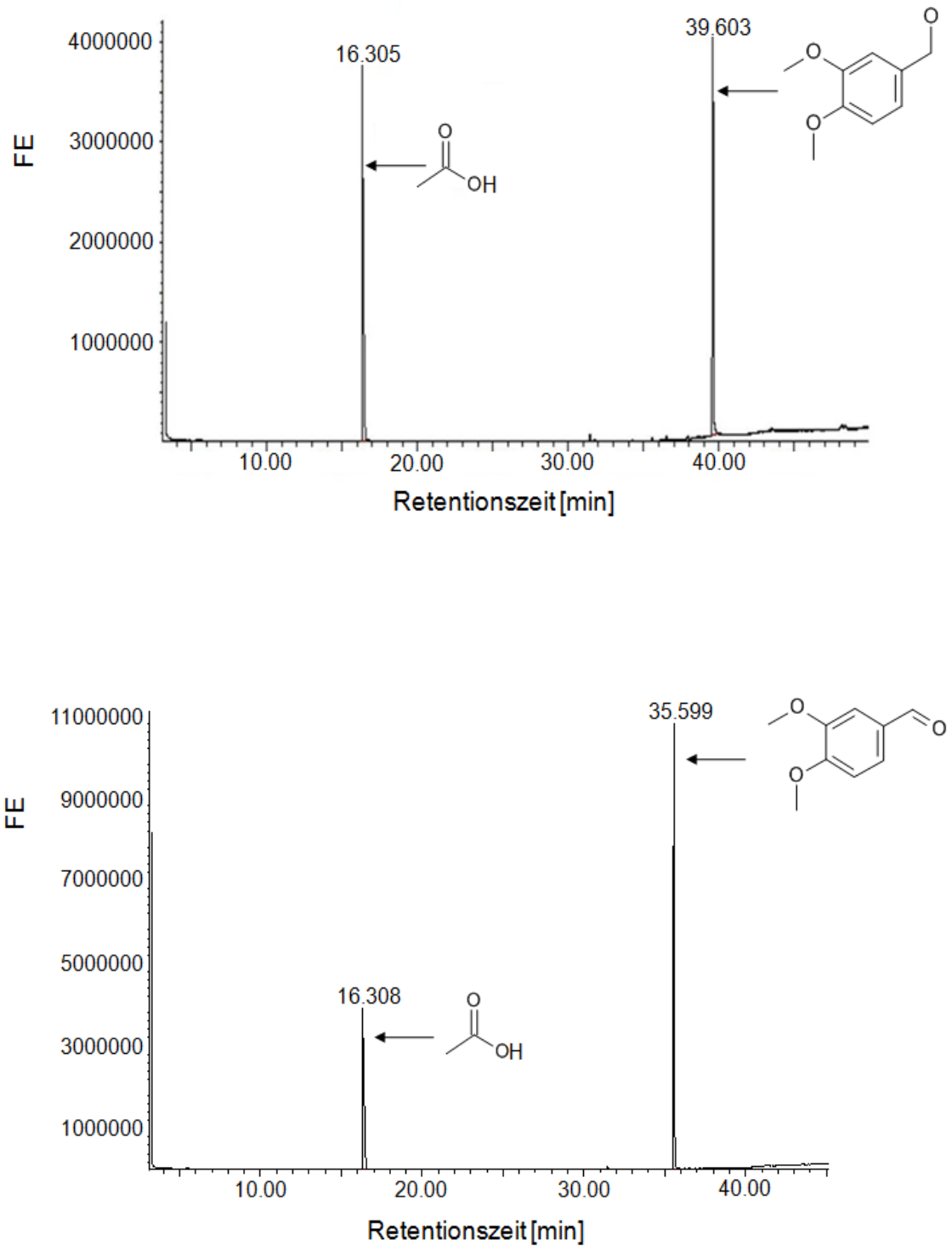


Abbildung 19: GC-MS Chromatogramme der Umsetzung von Veratrylalkohol; Blindprobe (oben) und aktive Probe nach 48 h (unten)

In einer weiteren Modellreaktion wurde das Edukt Coniferylalkkohol durch die gereinigte polyvalente Peroxidase umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 1,5 Stunden entstanden drei neue Produkte (Abbildung 20), die im Laufe der fortschreitenden Reaktion weiter umgesetzt wurden (Abbildung 21). Es entstand ein unlösliches Produkt.

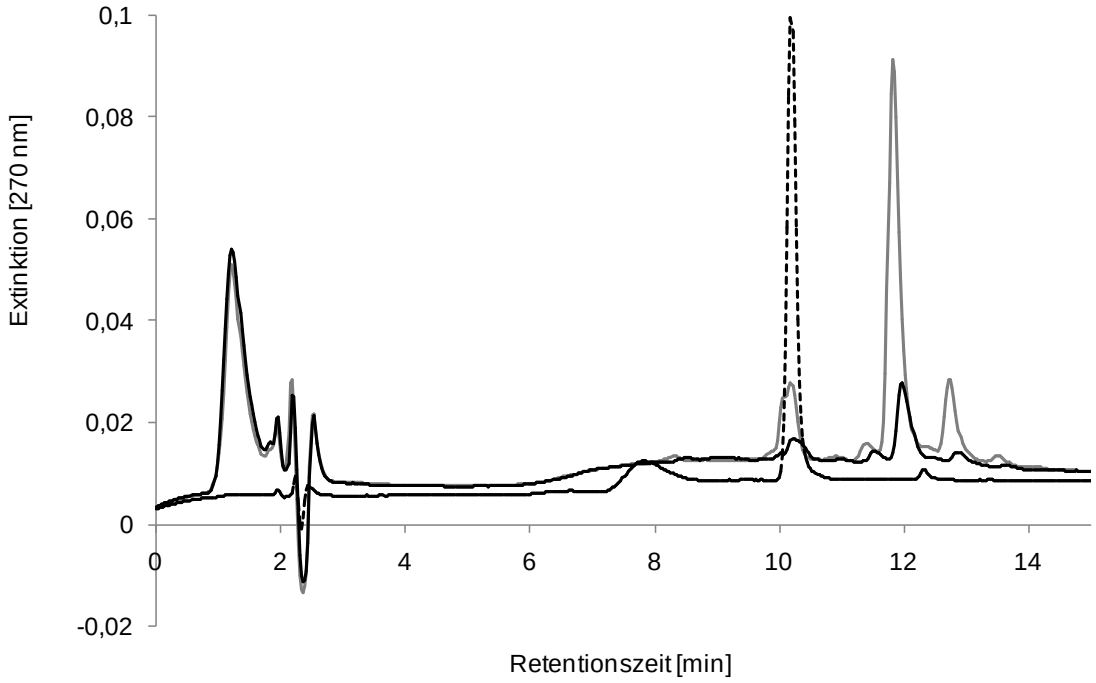


Abbildung 20: HPLC-DAD Chromatogramm, Umsetzung von Coniferylalkohol mit einer gereinigten Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus*, gestrichelte Linie: Blindprobe, hellgraue Linie: Reaktion nach 1,5 h, schwarze Linie: Reaktion nach 3,5 h

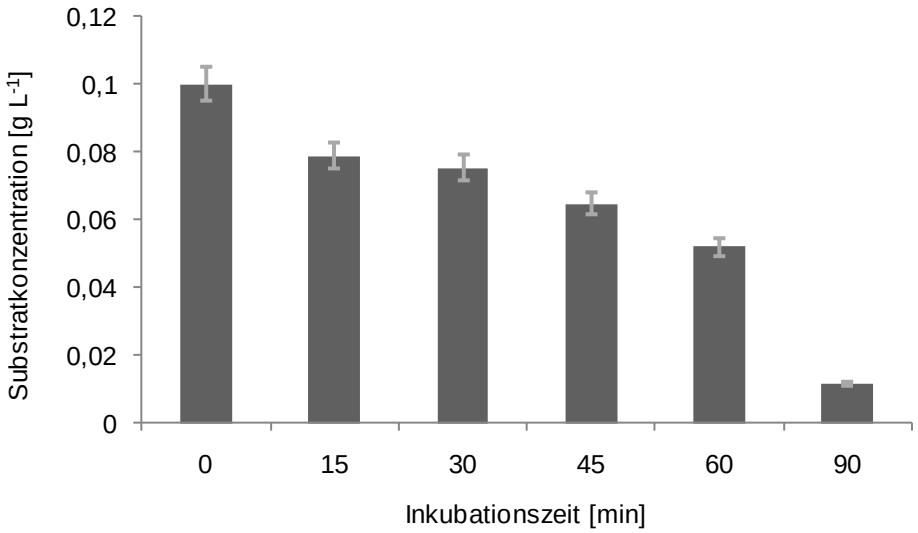


Abbildung 21: Abnahme der Eduktkonzentration in einer *in-vitro* Umsetzung von Coniferylalkohol mit gereinigter polyvalenter Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*, dunkelgrau: Edukt

Lignin organosolv wurde unter Zusatz von 10% Ethanol als Suspension eingesetzt (4.9.1.2). Während der Umsetzung wurde die Partikelgrößenverteilung in der Suspension gemessen. Die Partikelgrößen in der Blindprobe wiesen zwei Bereiche 0,1 bis 1 µm und 10 bis 400 µm (Abbildung 22 oben) auf. In der aktiven Probe war bereits nach 5 Stunden eine Verschiebung des Maximums von 100 auf 20 bis 30 µm zu detektieren (Abbildung 22 oben). Nach einer Inkubationszeit von 240 Stunden wurden mehr kleinere Partikel (0,1 bis 1 µm) detektiert. Die Menge der größeren Partikel von 200 µm war geringer, während die Anzahl der mittleren Partikel mit einem Durchmesser von 5 bis 40 µm anstieg (Abbildung 22 unten).

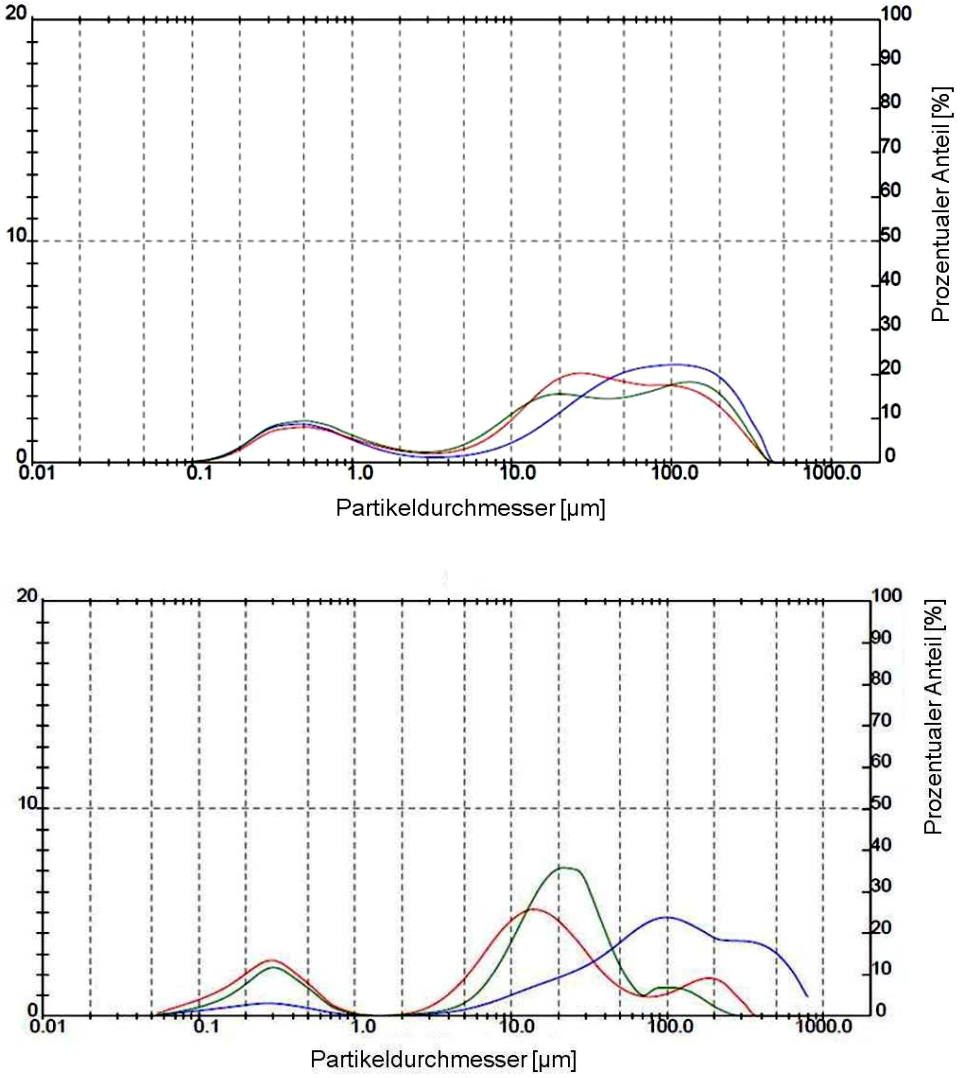


Abbildung 22: Partikelgrößenverteilung des Lignin organosolv (371017, Sigma) nach *in-vitro*-Umsetzung: rot/grün: aktives Enzym in Doppelbestimmung, blau: inaktives Enzym; oben: nach 5 h Reaktionszeit und unten: nach 240 h Reaktionszeit

2.1.2 Rekombinantes Enzym aus *Hansenula polymorpha*

Für die technische Umsetzung von Modellsubstraten wurden große Mengen (~ 10 bis 15 Units pro Ansatz) der polyvalenten Peroxidase benötigt. Aus *Pleurotus sapidus* wurden nur geringe Mengen des Wildtypenzyms isoliert (2.1.1.2). Ausgehend von der bekannten Aminosäuresequenz der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* wurden in Kooperation mit der Firma Artes® Biotechnology GmbH, Langenfeld rekombinante *Hansenula polymorpha* Stämme generiert (6.2). Diese wurden für die Expression und biochemische Charakterisierung zur Verfügung gestellt.

2.1.2.1 Expression der polyvalenten Peroxidase

Für die Maßstabsvergrößerung der Enzymproduktion wurde je Konstrukt ein Stamm in 200 mL Submerskultur überführt (4.6.2.4). Die Derepression wurde in zwei unterschiedlichen Medien durchgeführt. Im YNB ungepuffert/ Glucose/Glycerol-Medium wurde nur für einen rekombinanten *Hansenula polymorpha* Stamm eine Peroxidaseaktiviät (0,18 U L^{-1}) nachgewiesen (Abbildung 23). Im YNB ungepuffert/Glycerol-Medium wurden Aktivitäten von 0,07 U L^{-1} in zwei rekombinanten *Hansenula polymorpha* Stämmen detektiert.

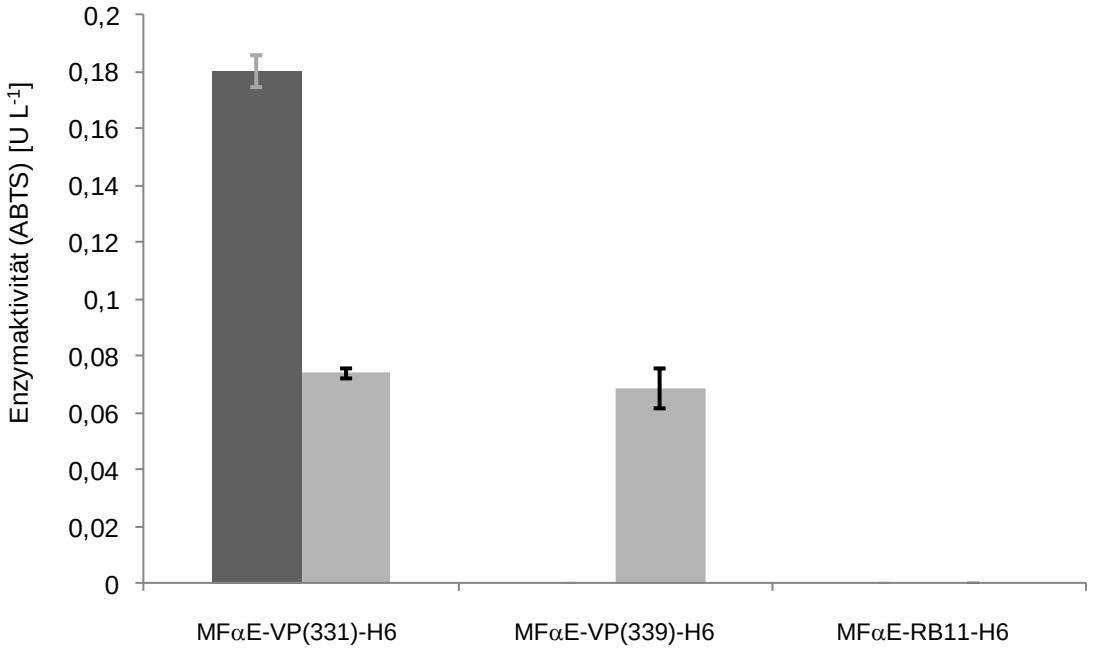


Abbildung 23: Enzymaktivität einer rekombinanten polyvalenten Peroxidase, verwendet wurden unterschiedliche Derepressionsmedien: dunkel: YNB/Glucose/Glycerol; hell: YNB/Glycerol

2.1.2.2 Biochemische Charakterisierung

Für die Charakterisierung wurden die Kulturüberstände von *Hansenula polymorpha* mittels Ultrafiltration konzentriert und zweimal mit Reinstwasser gewaschen (4.6.2.5).

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurde der Kulturüberstand mit Natriumacetatpuffer (50 mM) versetzt und mittels β,β-Carotin Aktivitätsassay analysiert. Der optimale pH-Wert betrug 2,8 (Abbildung 24 oben). Für die Untersuchung niedrigerer pH-Werte musste das Puffersystem gewechselt werden. Mit einem 100 mM Glycin/Salzsäurepuffer konnten pH-Werte bis 1,2

untersucht werden. In diesem Puffer wurde bei pH 1,2 die höchste Aktivität detektiert, daher wurden alle weiteren Messungen bei diesem pH-Wert durchgeführt (Abbildung 24 unten).

Bei der Bestimmung des Temperaturoptimums wurden alle verwendeten Lösungen jeweils fünf Minuten bei der gewünschten Temperatur vorinkubiert, Kulturüberstand zugefügt und die Aktivität bestimmt. Die optimale Reaktionstemperatur betrug 30 °C (Abbildung 25). Diese Temperatur wurde für alle weiteren Messungen verwendet.

Um den Einfluss der Wasserstoffperoxidkonzentration zu bestimmen, wurden Konzentrationen von 0,05 bis 4 mM im Aktivitätstest eingesetzt. Höhere Konzentrationen führten zu stark erhöhten Blindwerten und wurden daher nicht weiter untersucht. Die optimale Konzentration betrug im genannten Messbereich 4 mM (Abbildung 26 oben) und wurde in weiteren Versuchen eingesetzt.

Eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von Mangan wurde untersucht. Dem Reaktionsansatz wurde Mangansulfat zugesetzt und eine Steigerung der Aktivität wurde detektiert. Die optimale Konzentration betrug 0,05 mM (Abbildung 26 unten).

Ein Vergleich der Standardassaybedingungen (4.7.1.3) mit den optimierten Assaybedingungen (4.7.7.2) ergab eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 25 (Abbildung 27).

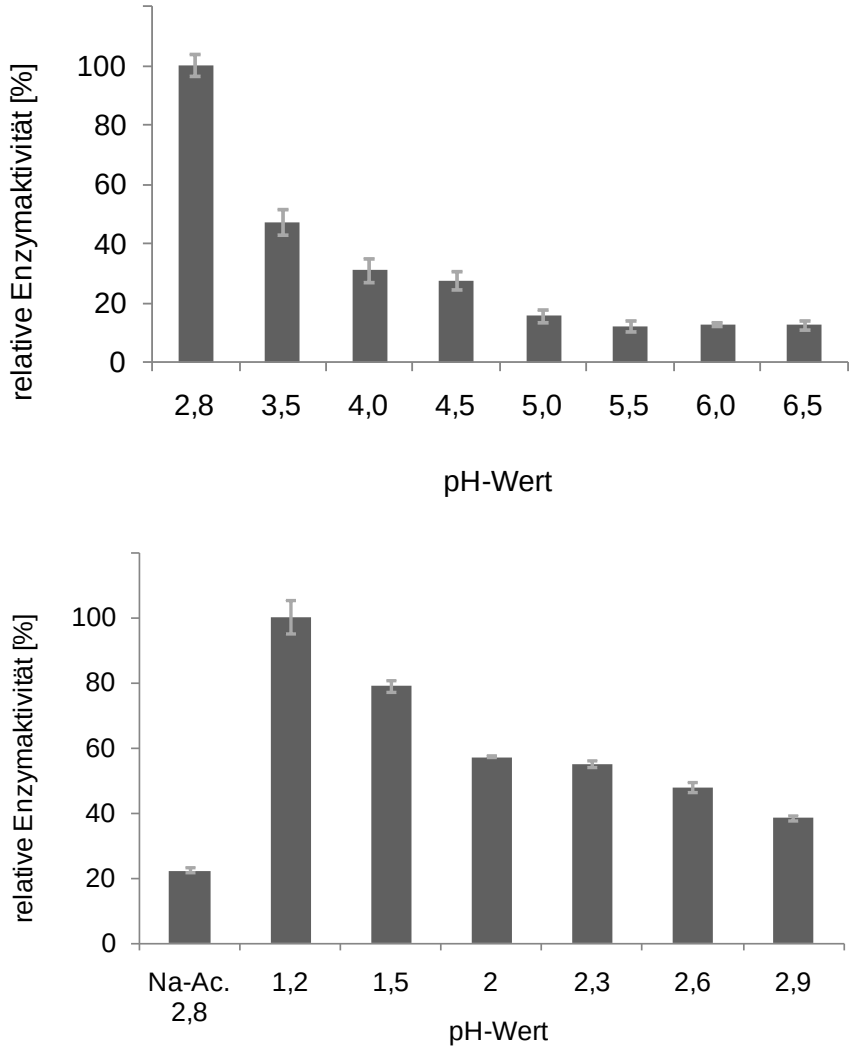


Abbildung 24: relative Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert des 50 mM Natriumacetatpuffers (oben) beziehungsweise vom pH-Wert des 100 mM Tris-Glycin-Puffers (unten)

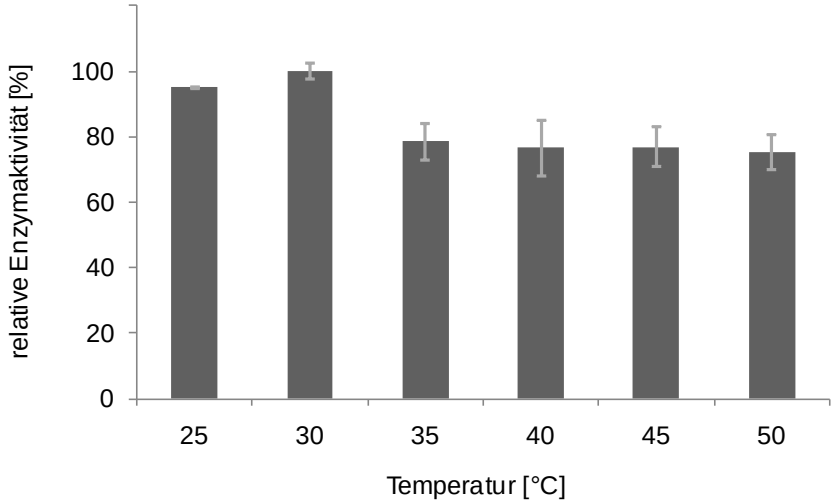


Abbildung 25: relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur

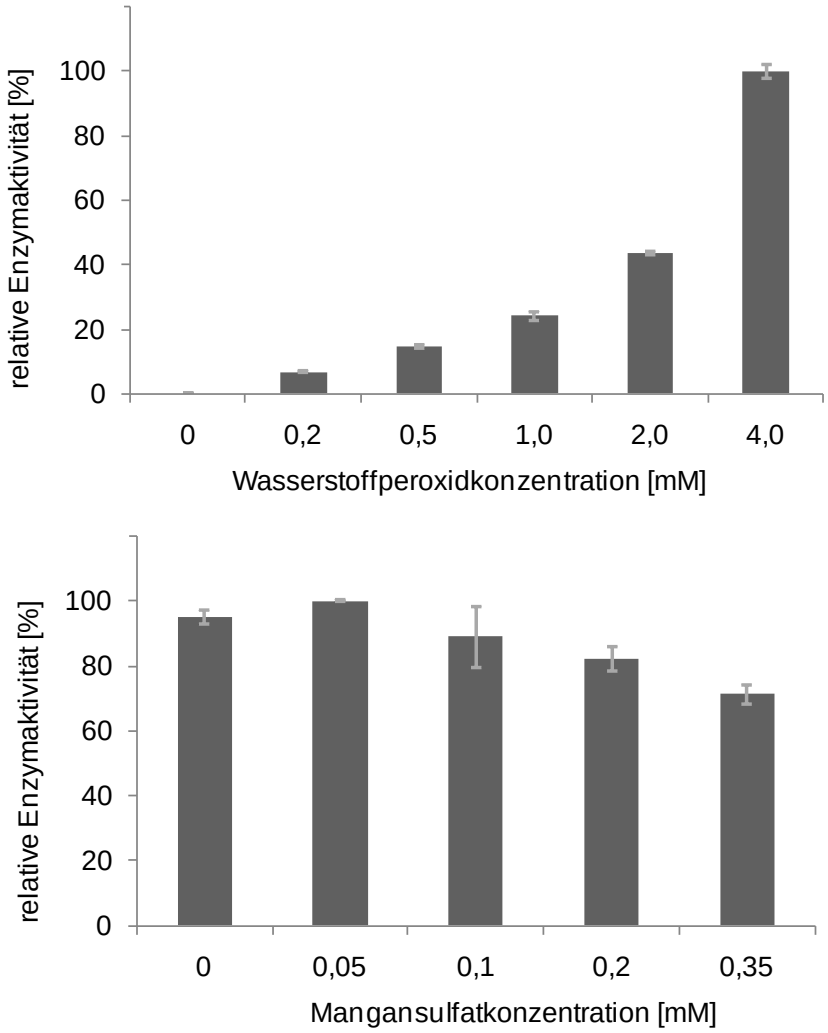


Abbildung 26: relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Wasserstoffperoxidkonzentration (oben) und der Mangansulfatkonzentration (unten)

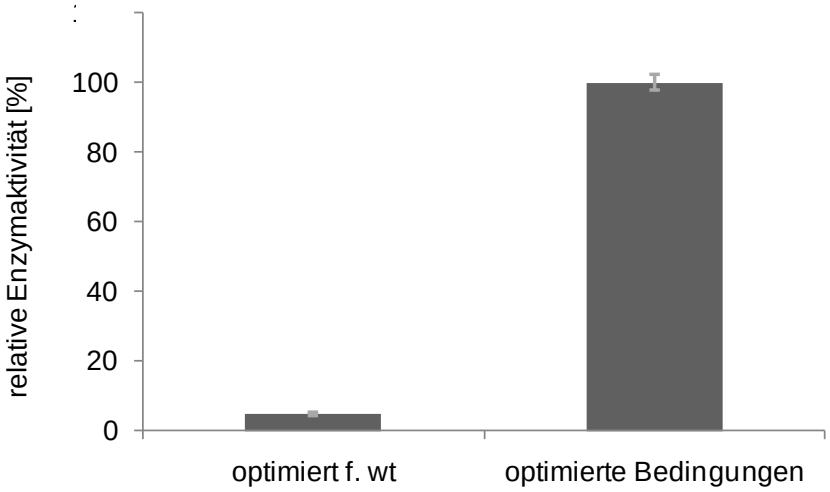


Abbildung 27: relative Enzymaktivität im Vergleich die Standardassaybedingungen mit den optimierten Bedingungen

Mittels SDS-PAGE (4.7.2) wurden heterolog exprimierte Proteine mit Molekulargewichten von 58 und 44 kDa bestimmt (Abbildung 28).

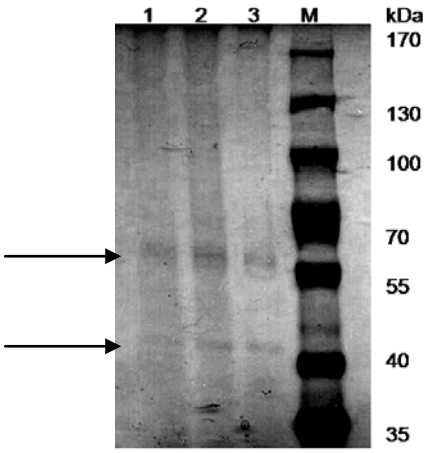


Abbildung 28: SDS-PAGE der *Hansenula polymorpha* Überstände, konzentriert und gewaschen: 1: Negativkontrollstamm, 2: MFαE-VP(331)-H6, 3: MFαE-VP(339)-H6, M: Proteinstandard (Fermentas)

2.2 Sekretomanalyse von *Pleurotus sapidus*

Pleurotus sapidus wurde im Weiteren auf Schlüsselenzyme des Lignocelluloseabbaus hin untersucht. Dazu wurde der Basidiomycet submers und emers auf lignocellulosehaltigen Substraten kultiviert und die sekretierten Enzyme über den Kulturverlauf bestimmt.

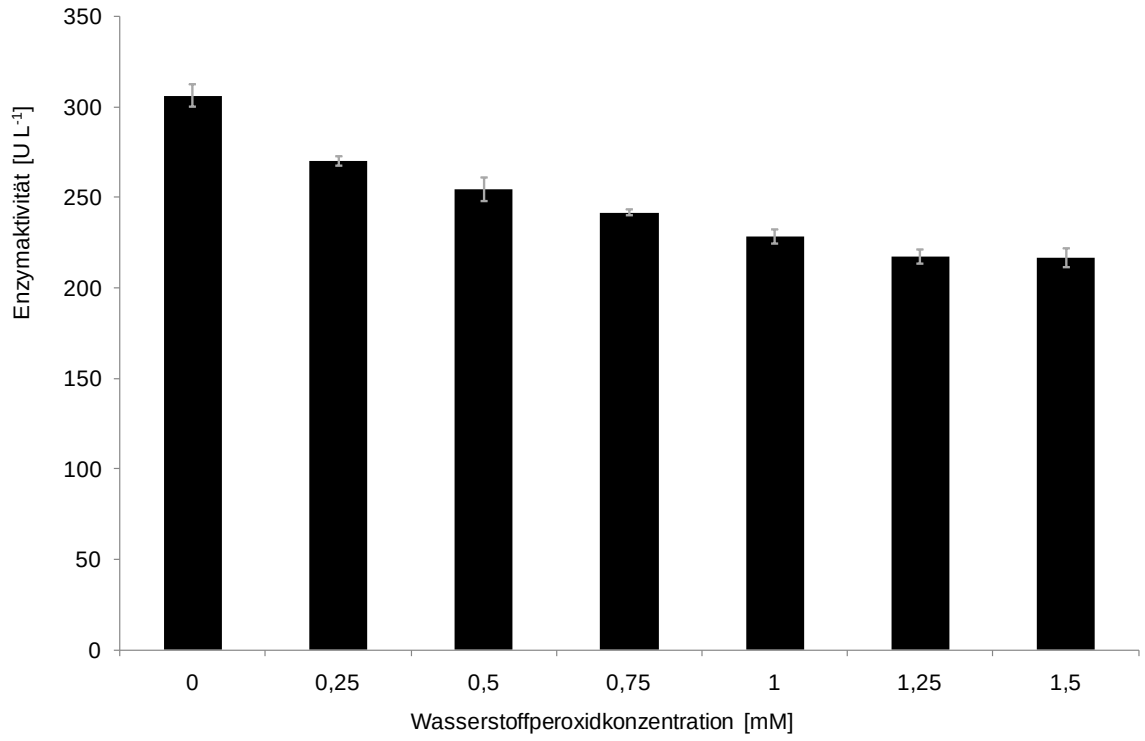
2.2.1 Erfassung von Enzymaktivitäten als Summenparameter

Geführt wurden jeweils drei Kulturreihen mit je drei unabhängigen biologischen Proben. Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte in Dreifachbestimmungen. Rapsstroh und der Rückstand einer Biogasanlage wurden als Substrate verwendet. Die Ernte (4.6.1.12) der Oberflächenkulturen (4.6.1.11) erfolgte nach 28, 42, 56, 84 und 112 Tagen, die Ernte (4.6.1.10) der Flüssigkulturen (4.6.1.8) erfolgte nach 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18 Tagen.

2.2.1.1 Anwendbarkeit der kombinierten Laccase/Peroxidasemessung mittels ABTS

Bevor die Sekretomanalysen begonnen wurden, wurde untersucht, ob sekretierte Laccasen oder Peroxidasen durch Wasserstoffperoxid inhibiert werden. Der optimale pH-Wert der Reaktion wurde ebenfalls bestimmt.

Hierzu wurde eine Laccase aus *Trametes versicolor* (Fluka, 53739) und eine Peroxidase aus *Mycetinis scorodonius* (DSM, MaxiBright^{TM}) bekannter Aktivität mit unterschiedlichen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid versetzt und ein ABTS-Assay (Abbildung 29 oben) durchgeführt. Bereits nach einer Zugabe von 0,25 mM Wasserstoffperoxid wurde eine um 10% geminderte Laccaseaktivität detektiert, bei einer schrittweisen Erhöhung der Konzentration an Wasserstoffperoxid wurde eine weitere Hemmung der Laccaseaktivität beobachtet (Abbildung 29 oben). Das Maximum der Peroxidaseaktivität wurde bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,35 mM beobachtet. Mit weiter steigender Wasserstoffperoxidkonzentration fiel die Aktivität auf <70% der Ausgangsaktivität ab (Abbildung 29 unten). In den weiteren Bestimmungen der Peroxidaseaktivität wurde die optimale Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,35 mM verwendet.



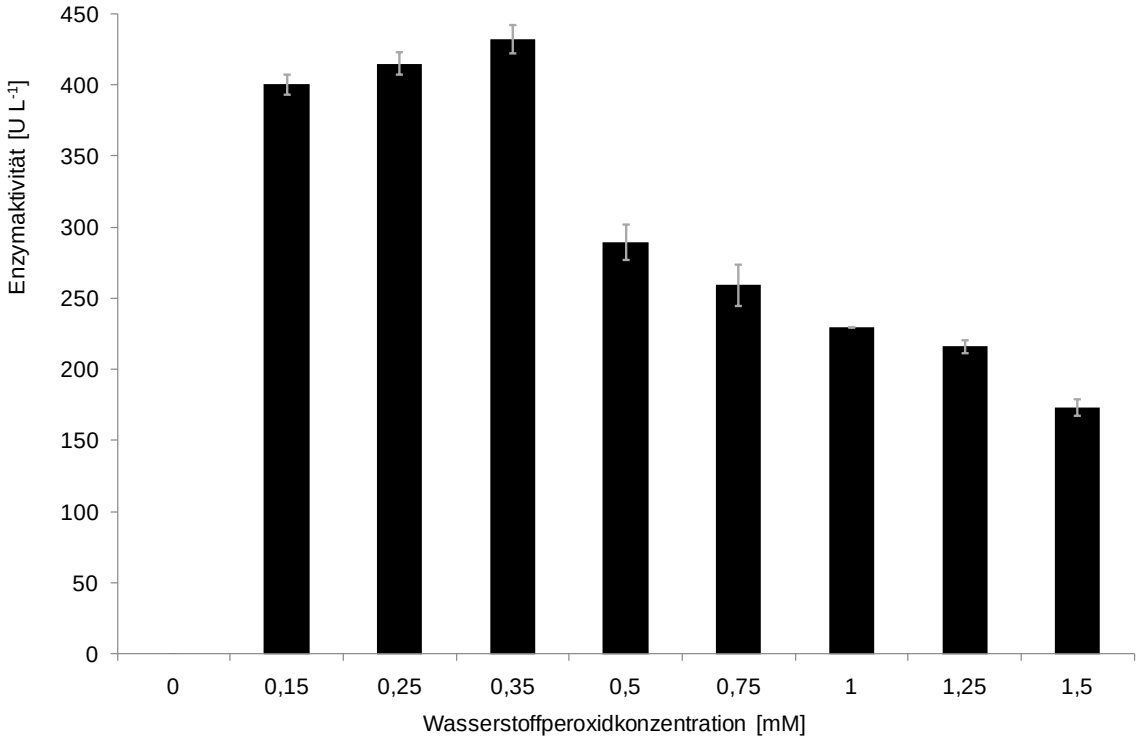


Abbildung 29: Abhängigkeit der Laccaseaktivität von verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen (oben) und Abhängigkeit der Peroxidaseaktivität von verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen (unten)

In einer kombinierten Messung von Laccase und Peroxidase musste im Fall der Laccasebestimmung sichergestellt sein, dass kein Wasserstoffperoxid in der Reaktion enthalten war. Aus diesem Grund wurde eine Laccase aus *Trametes versicolor* (Fluka, 53739) bekannter Aktivität mit unterschiedlichen Konzentrationen an Catalase versetzt und ein ABTS-Assay (4.7.1.1) durchgeführt. Bei einem Catalasegehalt von 300 U pro Reaktionsansatz wurde keine Hemmung der Laccase festgestellt. Höhere Catalasegehalte führten zu einem Abfall der Laccaseaktivität (Abbildung 30 oben). In einem weiteren Versuch wurde die Wirksamkeit der Catalase mit Hilfe einer Peroxidase aus *Mycetinis scorodonius* (DSM, MaxiBright^{TM}) bekannter Aktivität überprüft. Verschiedene Wasserstoffperoxidkonzentrationen (0,15 bis 1 mM) wurden mit 300 U Catalase versetzt und 2 Minuten inkubiert. Eine Peroxidase bekannter Aktivität wurde zugefügt und ein ABTS-Assay durchgeführt (Abbildung 30 unten).

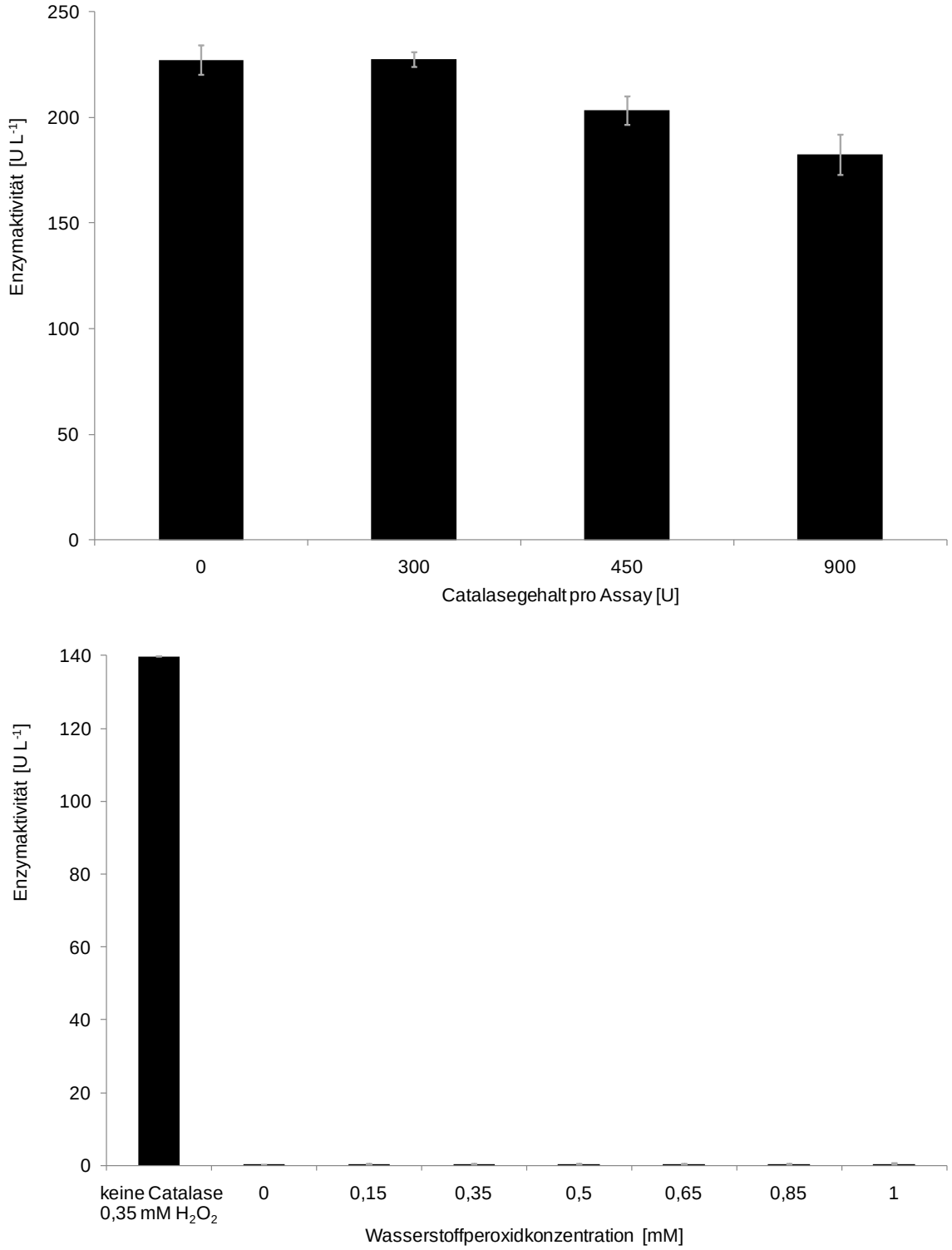
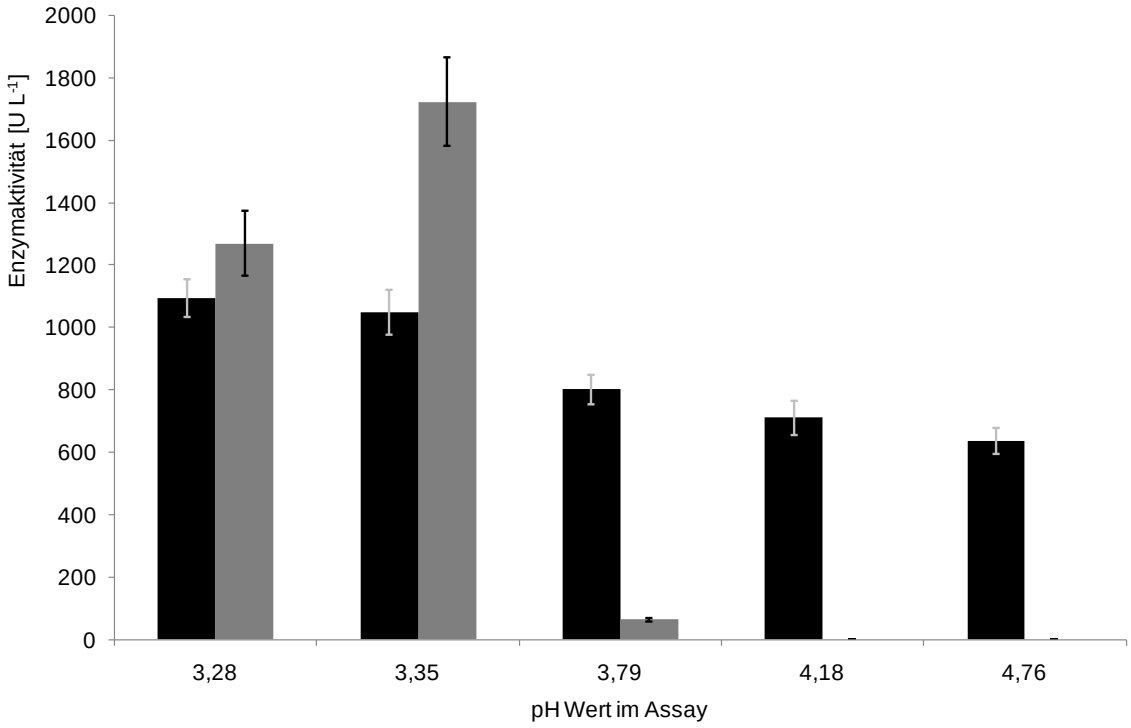


Abbildung 30: Abhängigkeit der Laccaseaktivität von verschiedenen Catalasegehalten (oben) und Bestimmung der Peroxidaseaktivität unter Verwendung von 300 U Catalase pro Ansatz und verschiedenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen (unten)

Zur Bestimmung des optimalen pH Werts der Reaktion wurde Kulturüberstand von Submerskulturen mit unterschiedlichen Substraten im ABTS Assay eingesetzt. Verwendet wurden verschieden Natriumacetatpuffer mit einer Molarität von 50 mM und den pH-Werten 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 und 5,0. Für jeden Ansatz wurden 100 µL Puffer verwendet. Nach der Reaktion wurde der pH-Wert des Reaktionsansatzes bestimmt. Der optimale pH Wert im Assay betrug für die Peroxidaseaktivität pH 3,35, für die Laccase zwischen 3,28 und 3,35 (Abbildung 31). In den nachfolgenden Messungen wurde ein pH Wert von 3,3 eingestellt. Dies geschah durch die Zugabe von 100 µL 50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5 pro Messansatz.



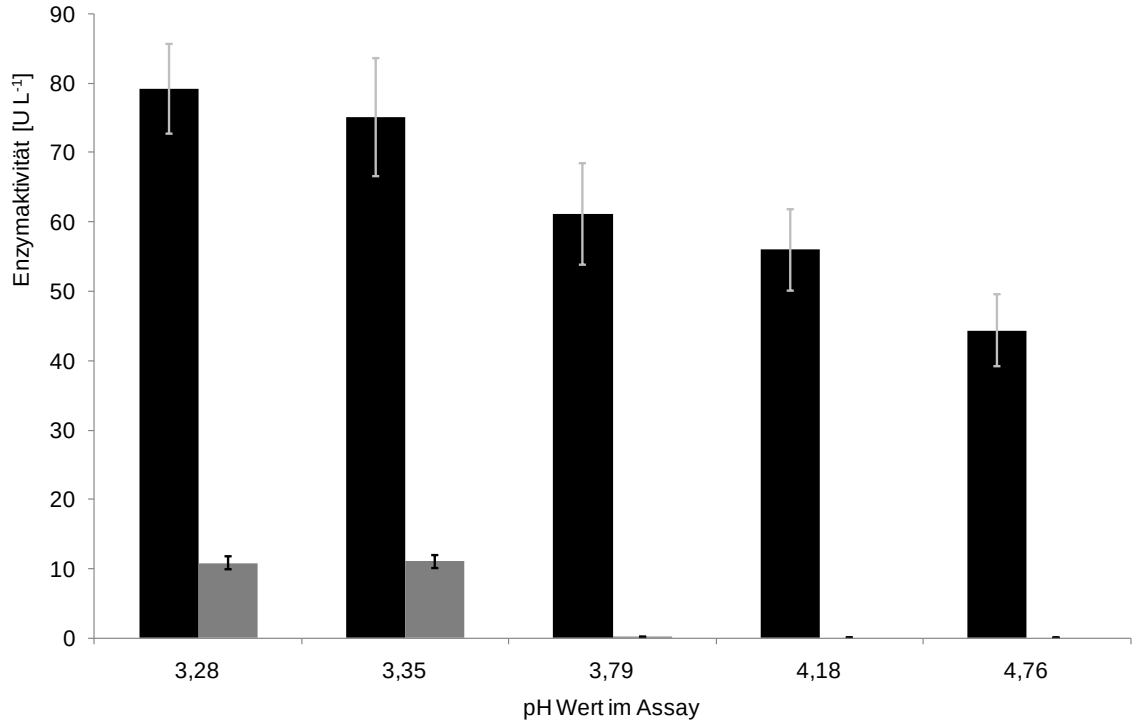


Abbildung 31: Abhängigkeit der Laccase- und Peroxidaseaktivitätaktivität von verschiedenen pH-Werten des 50 mM Natriumacetat-Puffers; Submerskulturen mit den Substraten Rückstand Biogasanlage (oben) und Rapsstroh (unten); schwarz: Laccaseaktivität, grau: Peroxidaseaktivität

2.2.1.2 Oberflächenkulturen auf dem Rückstand einer Biogasanlage

Bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* auf dem Rückstand einer Biogasanlage wurden bereits nach 14 Tagen die ersten Ansätze zur Fruchtkörperbildung beobachtet (Abbildung 32 a). Während der weiteren Kulturdauer wurde kontinuierlich die Bildung neuer Fruchtkörper beobachtet (Abbildung 32 b und c).

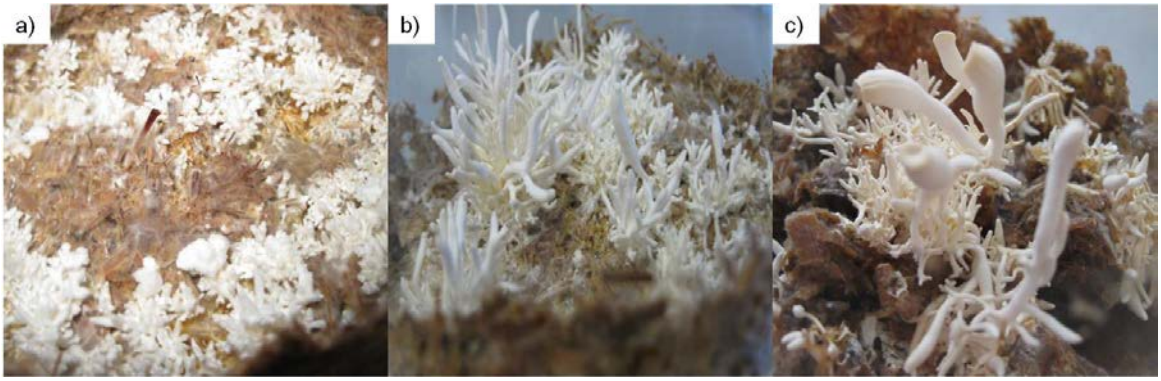


Abbildung 32: *Pleurotus sapidus* in Emerskultur mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; a: nach 14 Tagen, b: nach 28 Tagen und c: nach 56 Tagen

Nach 28 Tagen wurde ein Proteingehalt (4.7.1.11) von 50 mg L^{-1} und während der restlichen Kulturdauer durchgehend ein Proteingehalt von ~ 40 mg L^{-1} detektiert (Abbildung 33).

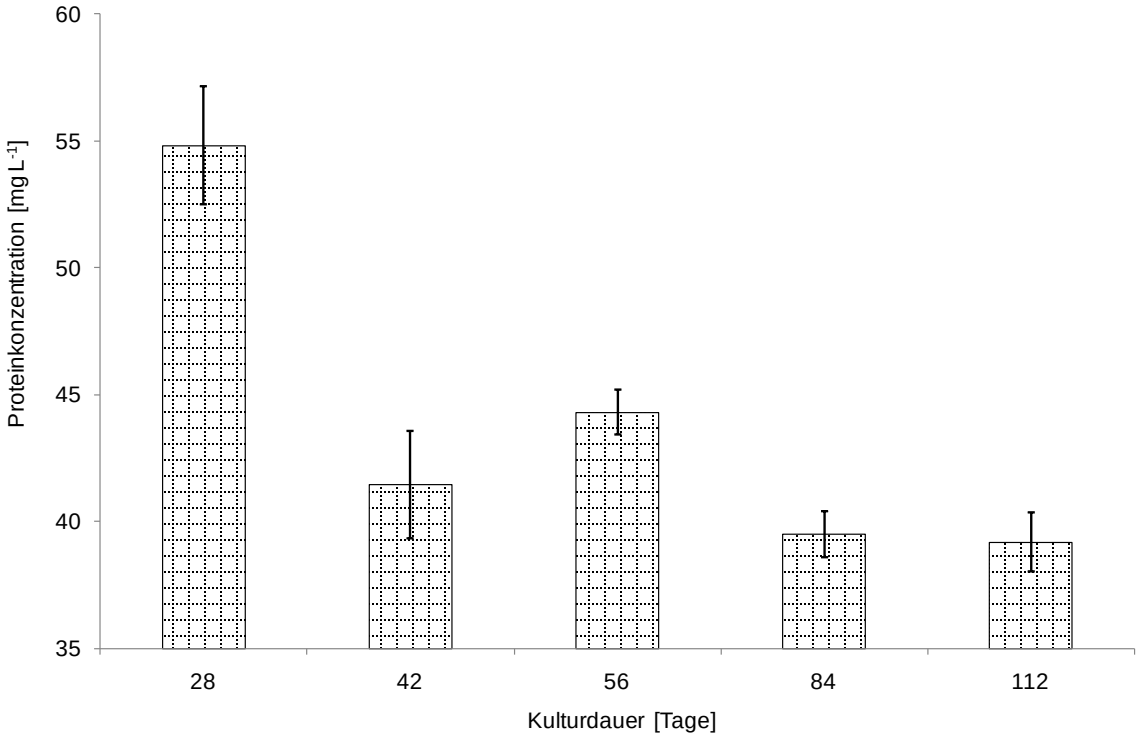


Abbildung 33: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; Proteinkonzentration während des Kulturverlaufs

Nach 28 Tagen wurde ein Wasserstoffperoxidgehalt (4.7.1.10) von 5 mg L^{-1} detektiert, der bis auf 9 mg L^{-1} (42 Kulturtage, Abbildung 34) anstieg. Im weiteren Kulturverlauf fiel der Wasserstoffperoxidgehalt kontinuierlich ab.

Die Laccaseaktivität (4.7.1.1) betrug während der ersten 28 Kulturtage ~ 135 U L^{-1} und fiel im späteren Kulturverlauf ab (Abbildung 35).

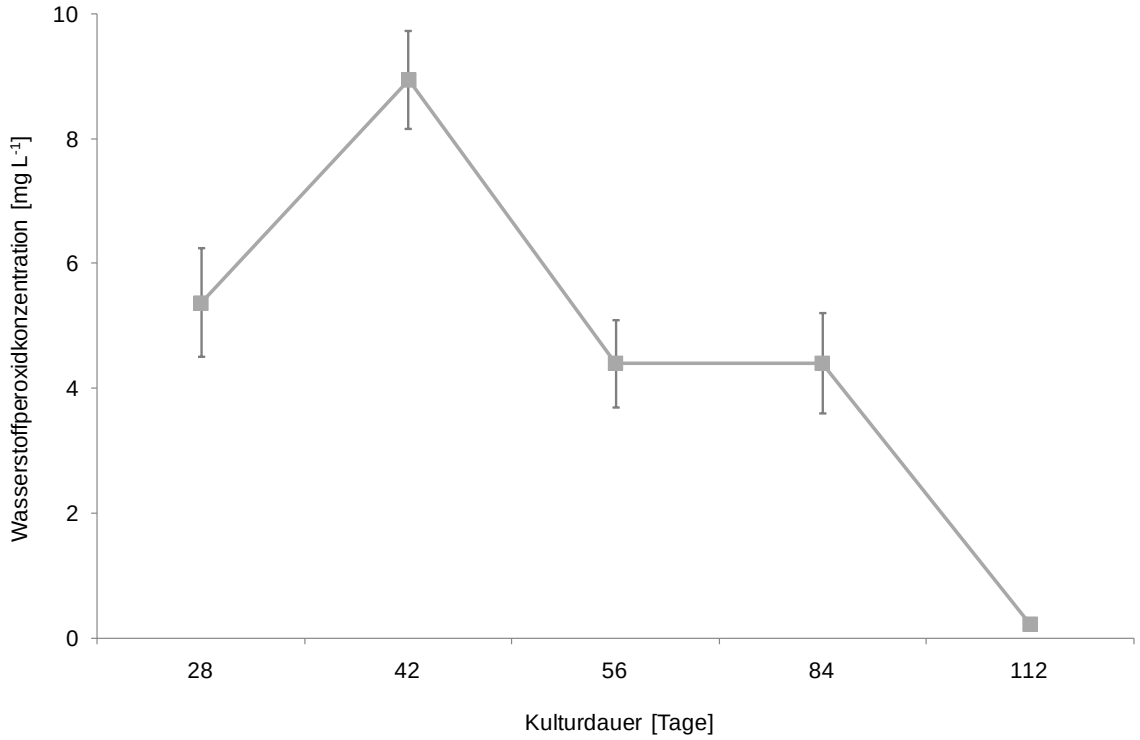


Abbildung 34: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; Wasserstoffperoxidkonzentration während des Kulturverlaufs

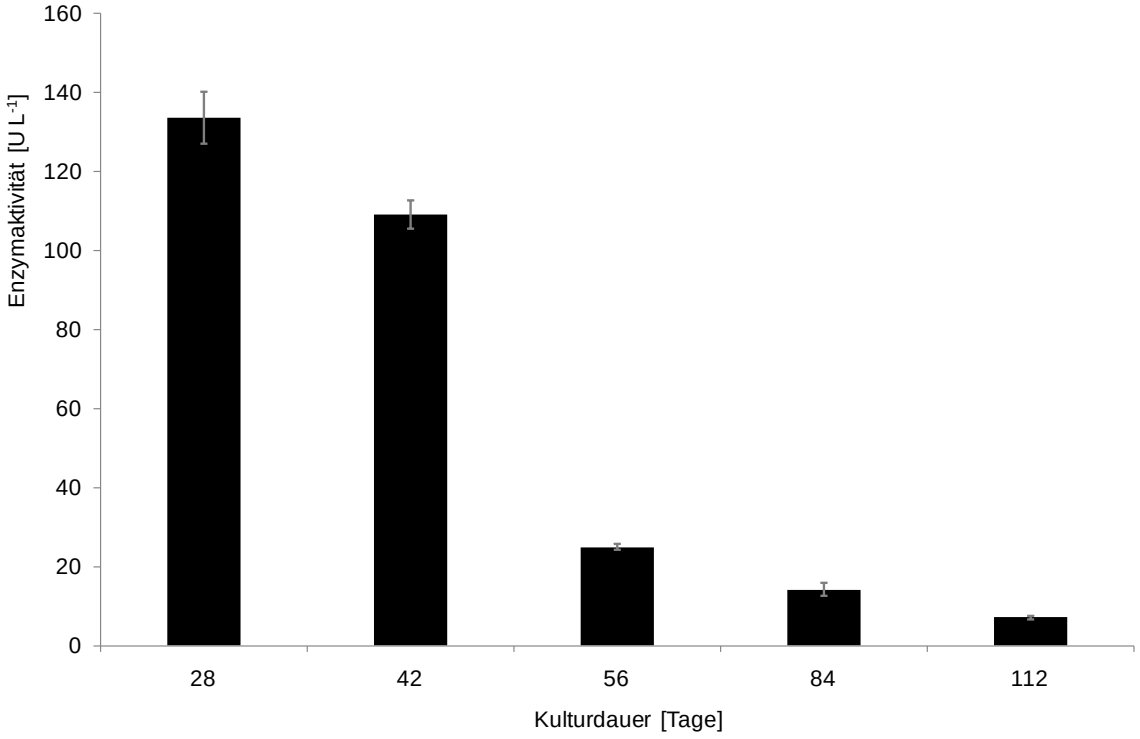
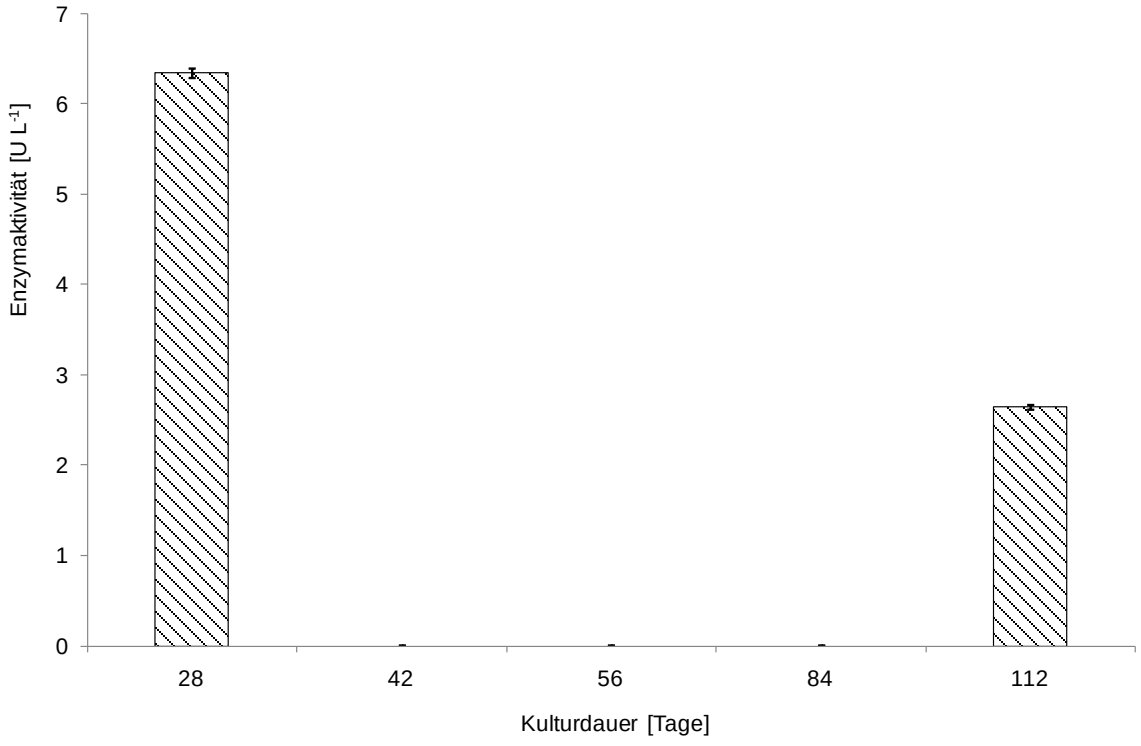


Abbildung 35: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; Laccaseaktivität während des Kulturverlaufs

Nach 28 Kulturtagen wurde eine Peroxidaseaktivität (4.7.1.1) von ~ 6 U L^{1} detektiert. Während der nächsten 84 Tage war keine Peroxidaseaktivität mehr nachweisbar und nach 112 Kulturtagen wurde eine Aktivität von 2,5 U L^{-1} bestimmt (Abbildung 36 oben). Der Aktivitätsverlauf der gesondert vermessenen Manganperoxidasen (4.7.1.2) und der polyvalenten Peroxidasen (4.7.1.3) unterschieden sich deutlich vom Verlauf des Summenparameters. Die Aktivität der Manganperoxidasen wies einen wellenförmigen Verlauf mit zwei Maxima nach 28 (350 U L^{-1}) und 56 Kulturtagen (160 U L^{-1}) auf (Abbildung 36 Mitte). Die Aktivität der polyvalenten Peroxidasen wurde während den ersten 56 Kulturtagen mit einer Aktivität von ~0,75 bis 0,85 U L^{-1} bestimmt (Abbildung 36 unten). Im weiteren Kulturverlauf wurden Aktivitäten < 0,2 U L^{-1} detektiert.



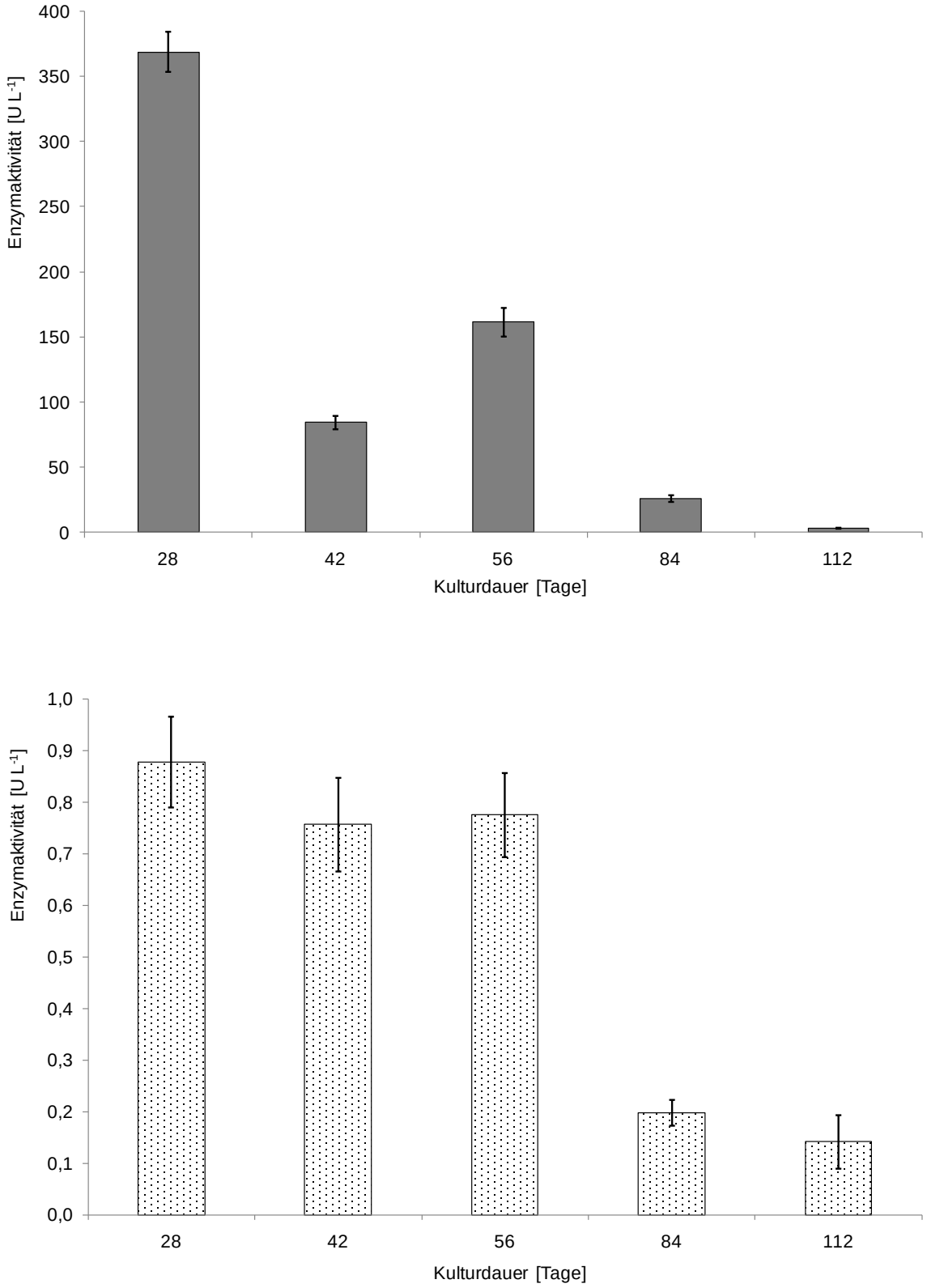


Abbildung 36: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; oben: Peroxidaseaktivität als Summenparameter (ABTS); Mitte: Manganperoxidase-Aktivität und unten: polyvalente Peroxidase-Aktivität

Esteraseaktivität (4.7.1.4) wurde nach 84 Kulturtagen mit einem Maximum von 12 U L^{-1} und während der weiteren Kultivierung im Bereich von 7 bis zu 9 U L^{-1} bestimmt. Die höchste Lipaseaktivität (4.7.1.8) wurde am Kulturtag 28 (5 U L^{-1}) detektiert (Abbildung 37). Im weiteren Kulturverlauf fiel die Lipaseaktivität ab.

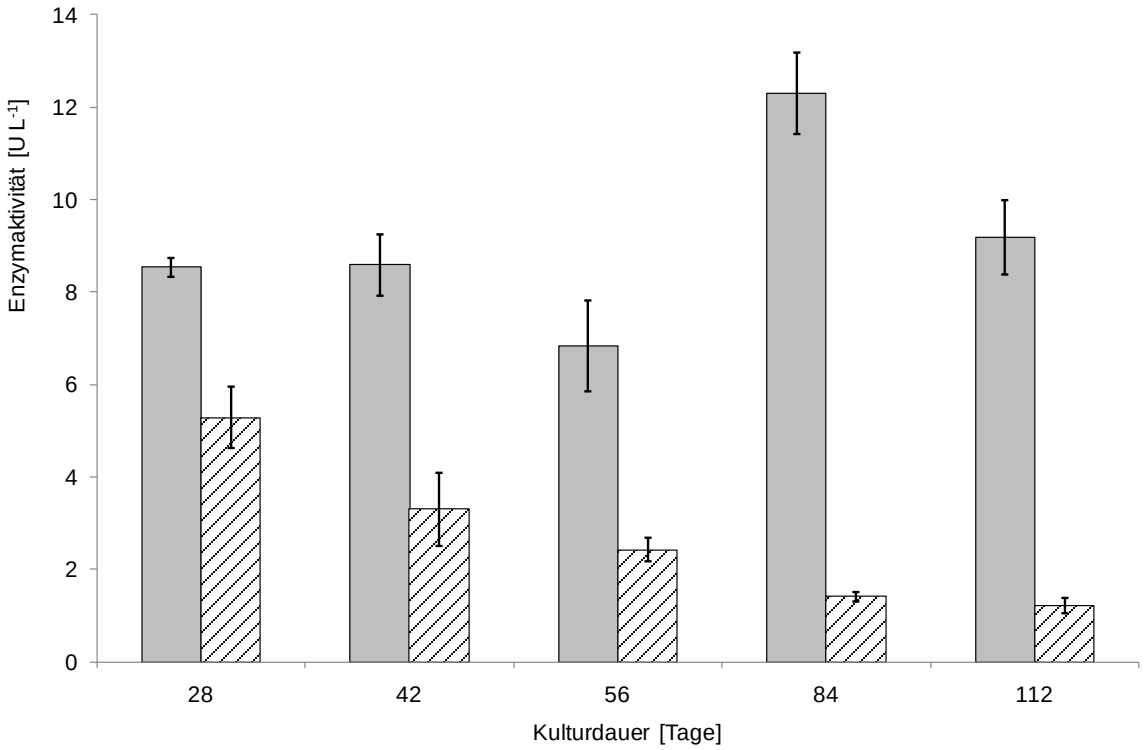


Abbildung 37: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; Esteraseaktivität (grau) und Lipaseaktivität (schraffiert)

Sowohl die Aktivitäten der Cellulasen (4.7.1.6), als auch die der Xylanasen (4.7.1.7) wurden mit nahezu gleichbleibender Aktivität detektiert. Die Cellulaseaktivitäten wurden zu 30 bis 40 U L^{-1} und die Xylanaseaktivität zu 120 bis 130 U L^{-1} bestimmt (Abbildung 38).

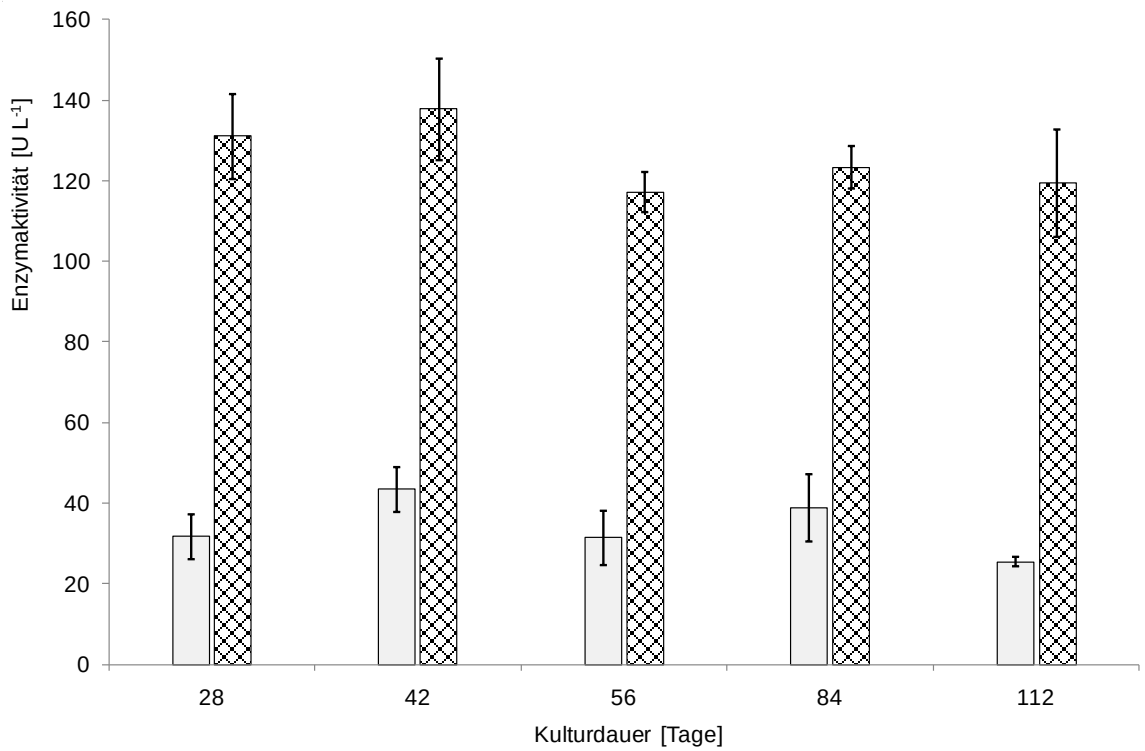


Abbildung 38: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; Cellulase- (hellgrau) und Xylanaseaktivität (gekreuzt)

2.2.1.3 Oberflächenkulturen auf Rapsstroh

Bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* auf Rapsstroh wurden nach 28 Tagen die ersten Ansätze zur Fruchtkörperbildung beobachtet (Abbildung 39 a). Während der weiteren Kulturdauer wurde kontinuierlich das Entstehen neuer Fruchtkörper beobachtet (Abbildung 39 b und c).

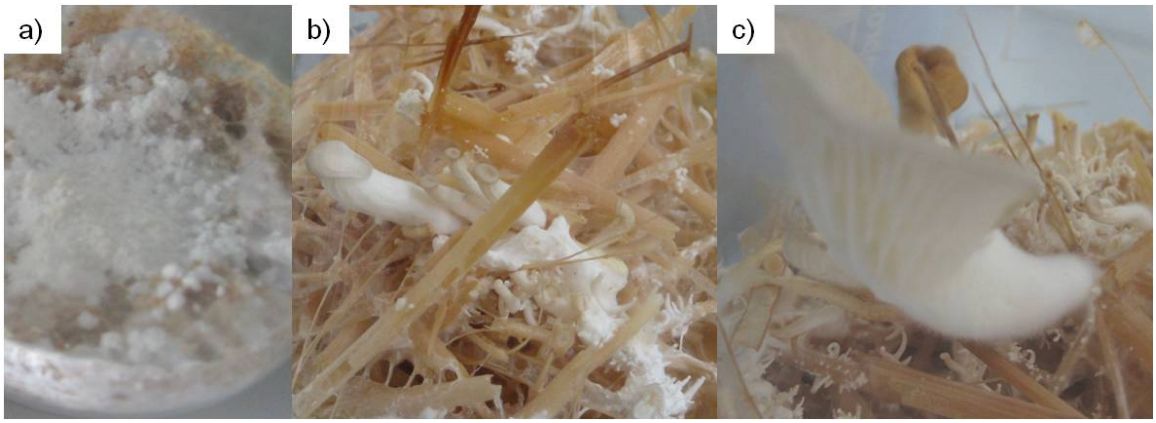


Abbildung 39: *Pleurotus sapidus* in Emerskultur mit Rapsstroh als Substrat; a: nach 28 Tagen, b: nach 56 Tagen und c: nach 84 Tagen

Der Proteingehalt der Extrakte (4.7.1.11) wurde während der ersten 84 Kulturtage zu ~60 mg L^{-1} bestimmt. Danach stieg die Proteinkonzentration innerhalb von 28 weiteren Tagen auf ~ 100 mg L^{-1} (Abbildung 40).

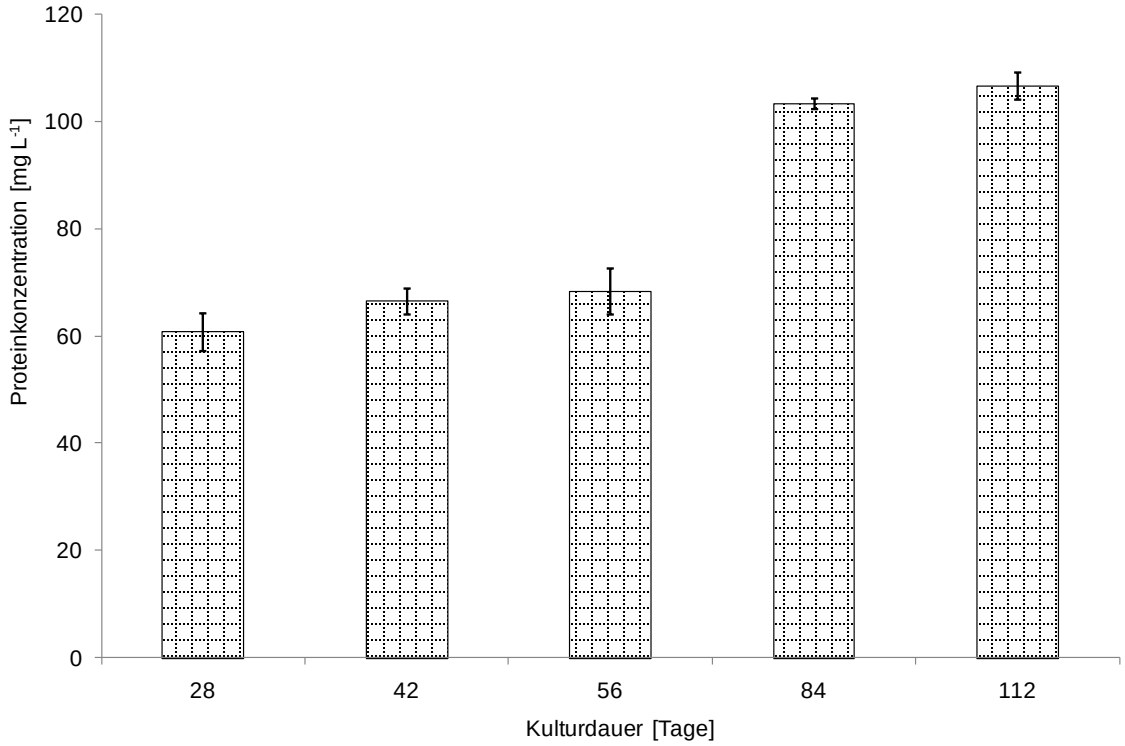


Abbildung 40: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; Proteinkonzentration der Kulturextrakte während des Kulturverlaufs

Nach 28 Tagen wurde eine Wasserstoffperoxidkonzentration (4.7.1.10) von 9 mg L^{-1} detektiert. Ein weiteres Maximum wurde nach 56 Kulturtagen mit 5 mg L^{-1} (Abbildung 41) bestimmt. Im weiteren Kulturverlauf fiel der Wasserstoffperoxidgeahlt kontinuierlich ab.

Das Maximum der Laccaseaktivität (23 U L^{-1}, 4.7.1.1) wurde nach 28 Kulturtagen detektiert (Abbildung 42).

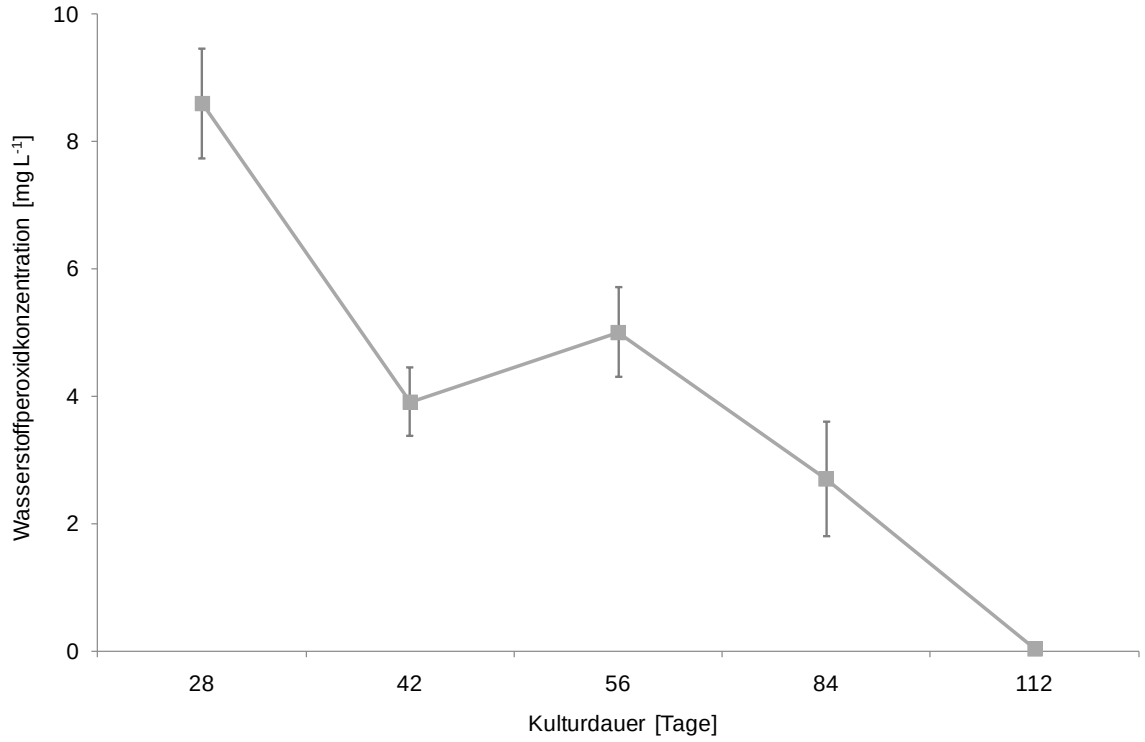


Abbildung 41: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; Wasserstoffperoxidkonzentration während des Kulturverlaufs

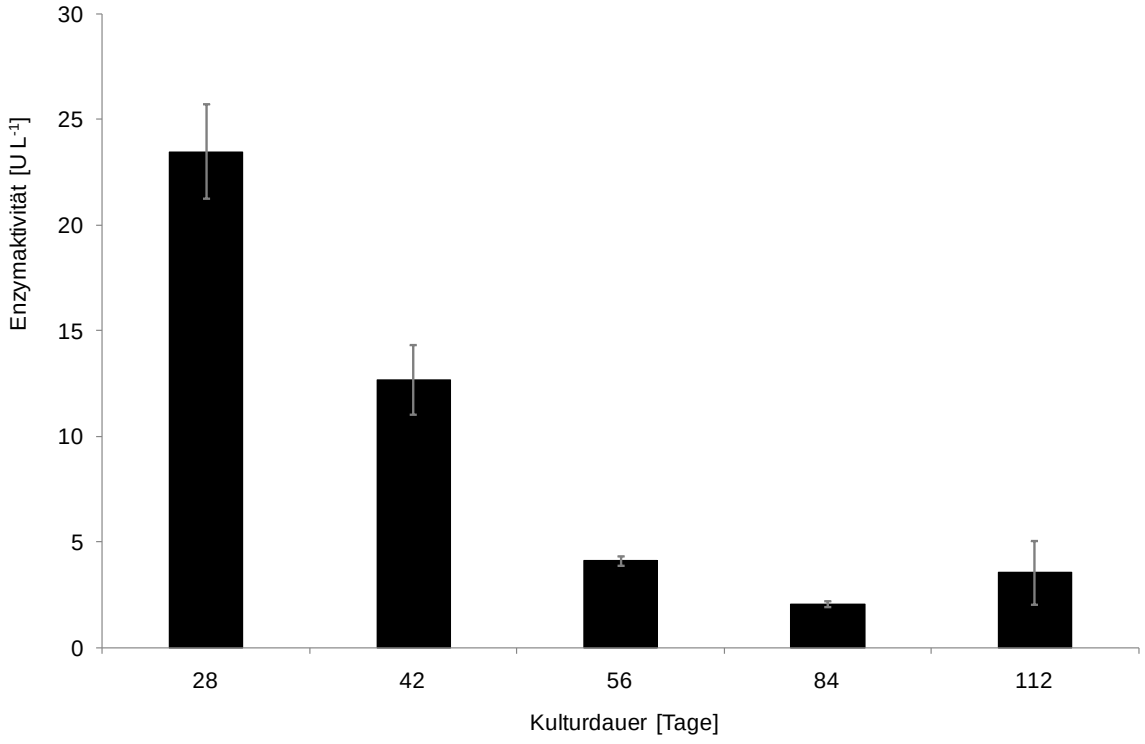
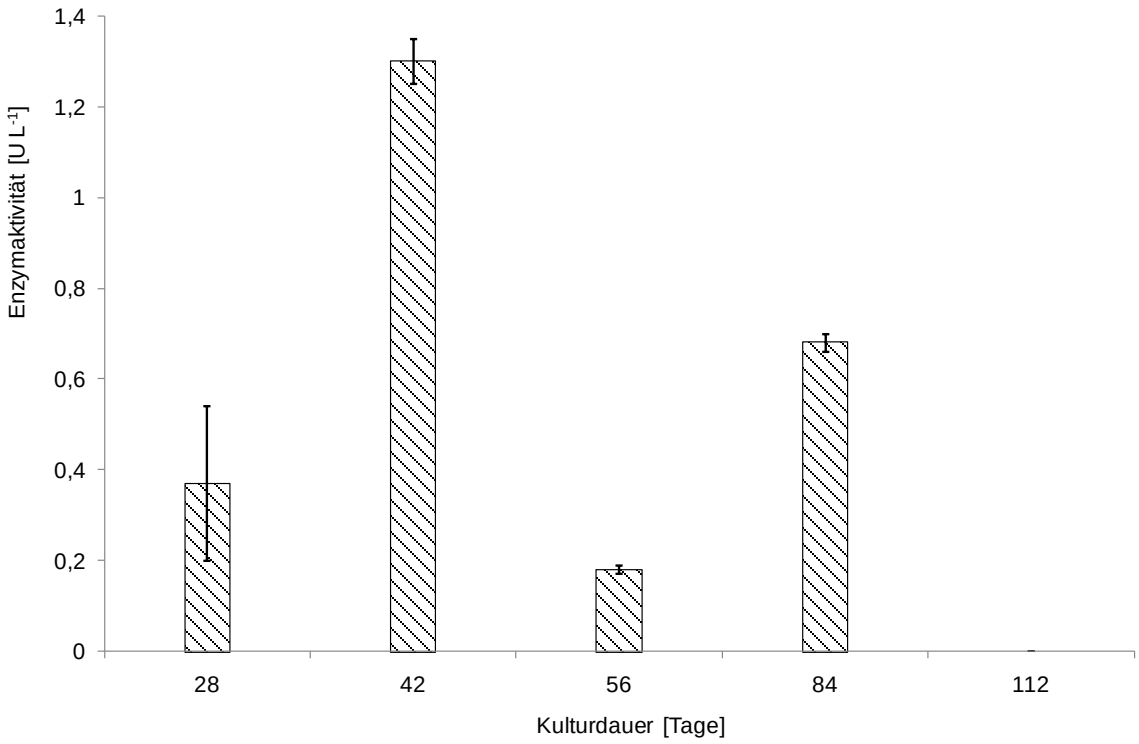
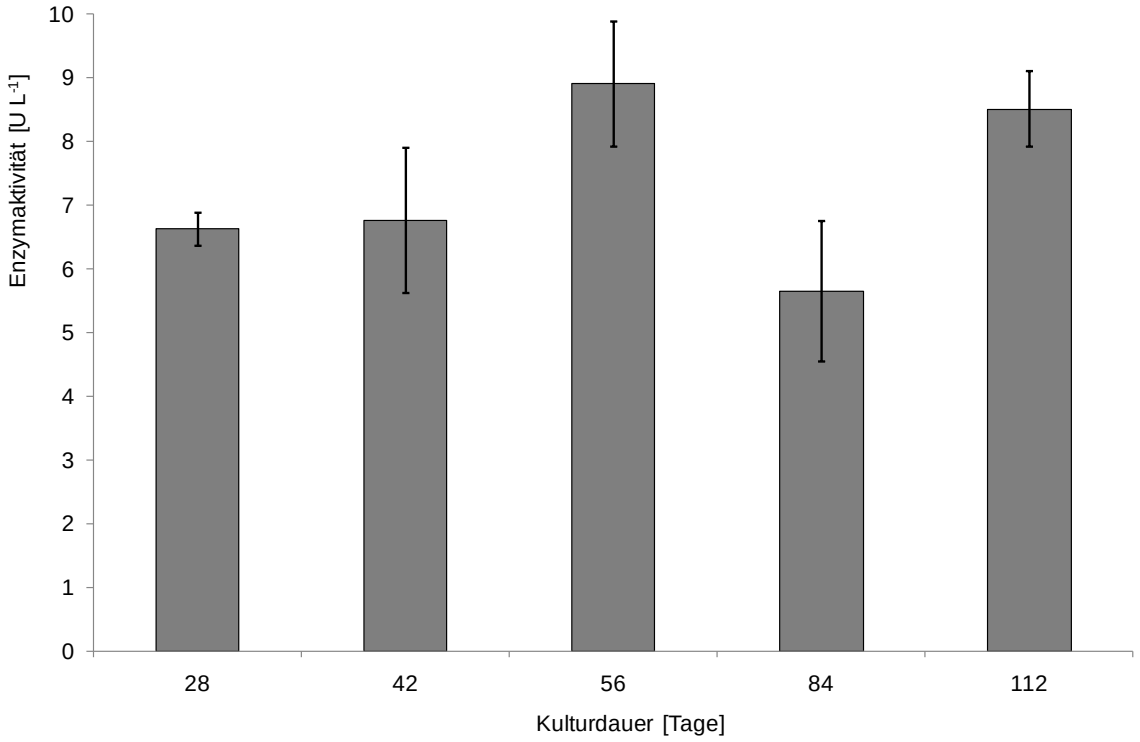


Abbildung 42: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; Laccaseaktivität während des Kulturverlaufs

Die höchste Peroxidaseaktivität (1,3 U L^{-1}, 4.7.1.1) wurde nach 42 Kulturtagen, ein weiteres Maximum nach 84 Kulturtagen detektiert (0,7 U L^{-1}, Abbildung 43 oben). Der Aktivitätsverlauf der gesondert vermessenen Manganperoxidase- (4.7.1.2) und polyvalenten Peroxidase-Aktivität (4.7.1.3) unterschied sich vom Verlauf des Summenparameters. Beide Peroxidase-Aktivitäten zeigten Maxima an den gleichen Kulturtagen (56 und 112). Manganperoxidase-Aktivität wurde während der Kultivierung zu ~5 - 9 U L^{-1} bestimmt (Abbildung 43 Mitte). Die maximale Aktivität der polyvalenten Peroxidasen wurde während der Kultivierung bei 0,4 und 0,7 U L^{-1} detektiert (Abbildung 43 unten).





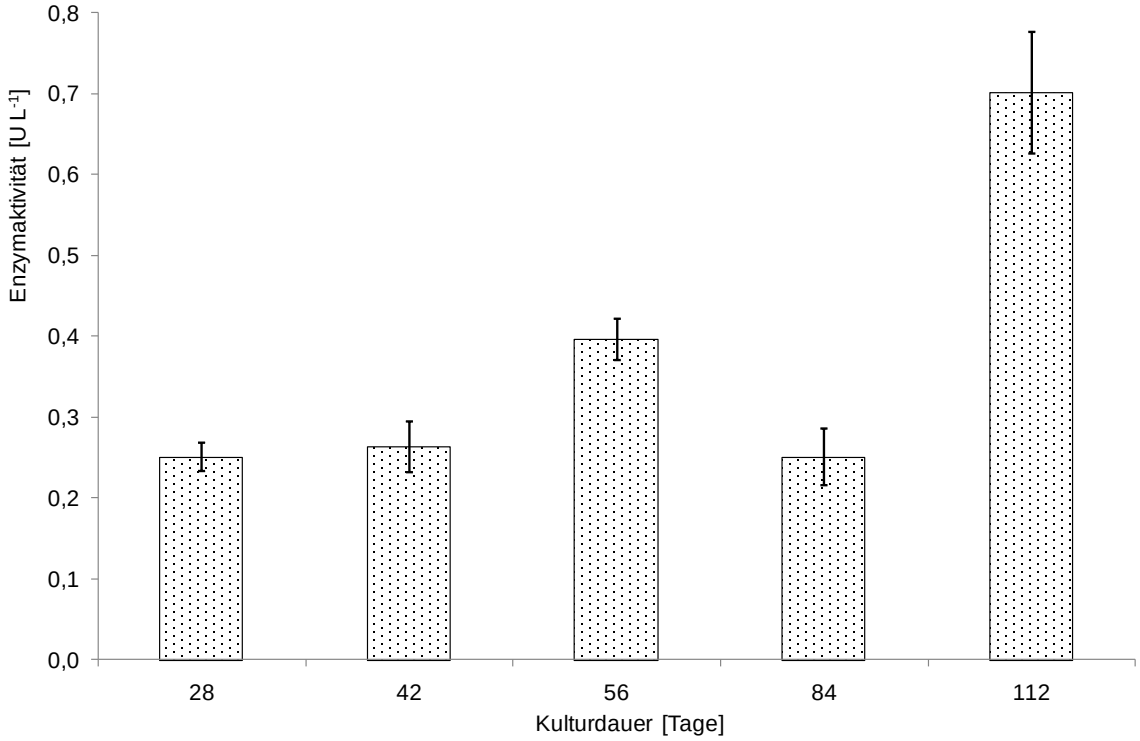


Abbildung 43: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat;
oben: Peroxidaseaktivität als Summenparameter (ABTS); Mitte: Manganperoxidase-Aktivität und unten: polyvalente Peroxidase-Aktivität

Maxima der Esteraseaktivität (4.7.1.4) wurden an den Tagen 28 (18 U L^{-1}) und 56 (20 U L^{-1}) detektiert (Abbildung 44). Lipaseaktivität (4.7.1.8) wurde während der gesamten Kultivierung gleichbleibend mit ~ 2 U L^{-1} bestimmt (Abbildung 44).

Während der gesamten Kulturdauer wurden Cellulaseaktivitäten (4.7.1.6) von ~ 25 U L^{-1} und Xylanaseaktivitäten (4.7.1.7) von ~ 110 U L^{-1} detektiert (Abbildung 45).

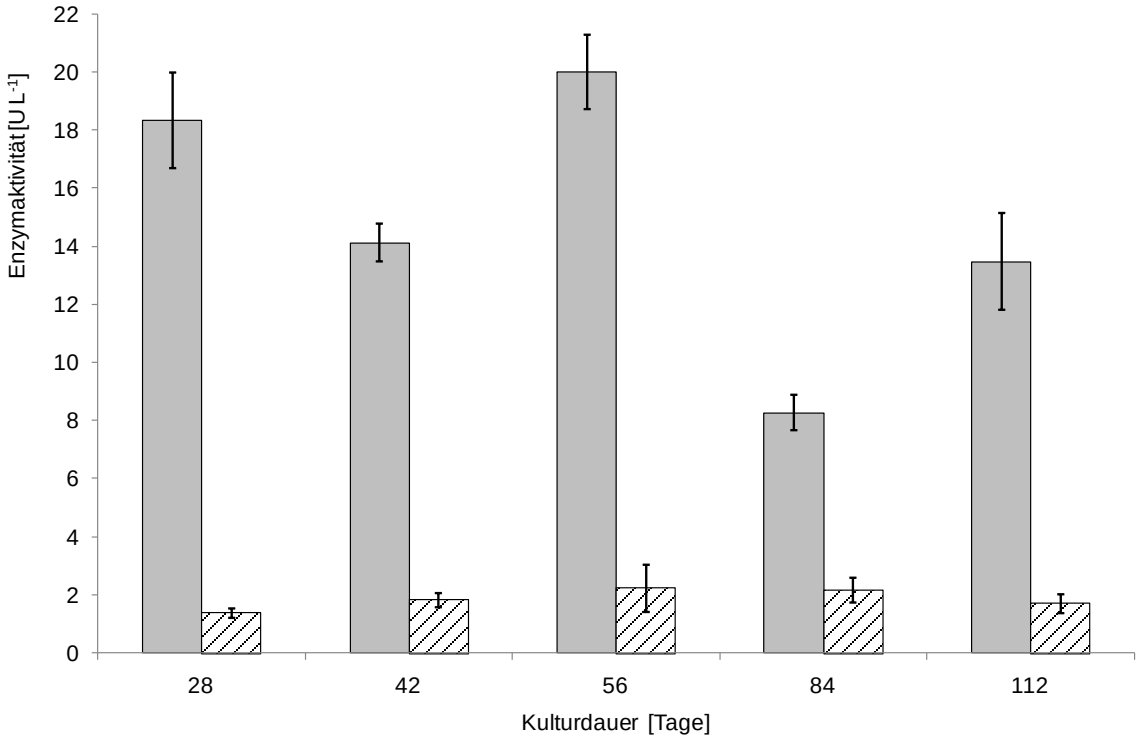


Abbildung 44: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; Esteraseaktivität (grau) und Lipaseaktivität (schraffiert)

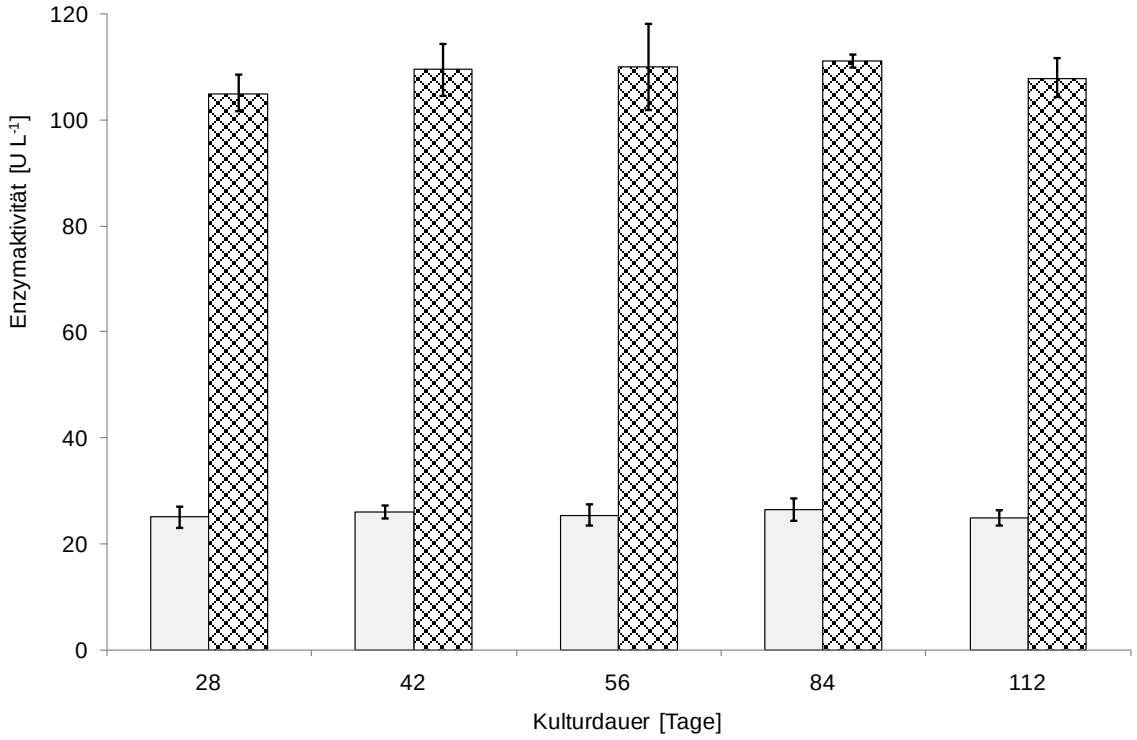


Abbildung 45: Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; Cellulase- (hellgrau) und Xylanaseaktivität (gekreuzt)

2.2.1.4 Submerskulturen mit dem Rückstand einer Biogasanlage

Der pH-Wert stieg während des Kulturverlaufs an und erreichte ab dem zehnten Kulturtag ein Plateau bei einem pH-Wert von 6,7 (Abbildung 46). Der Wasserstoffperoxidgehalt (4.7.1.10) in den Kulturen fiel in den ersten sechs Tagen ab und erreichte an Tag zehn das Maximum mit 12 mg L^{-1} (Abbildung 46). Der Proteingehalt (4.7.1.11) der Kulturen stieg während der ersten vier Kulturtage auf 120 mg L^{-1}. Das Maximum wurde mit 135 mg L^{-1} am zwölften Tag detektiert (Abbildung 47).

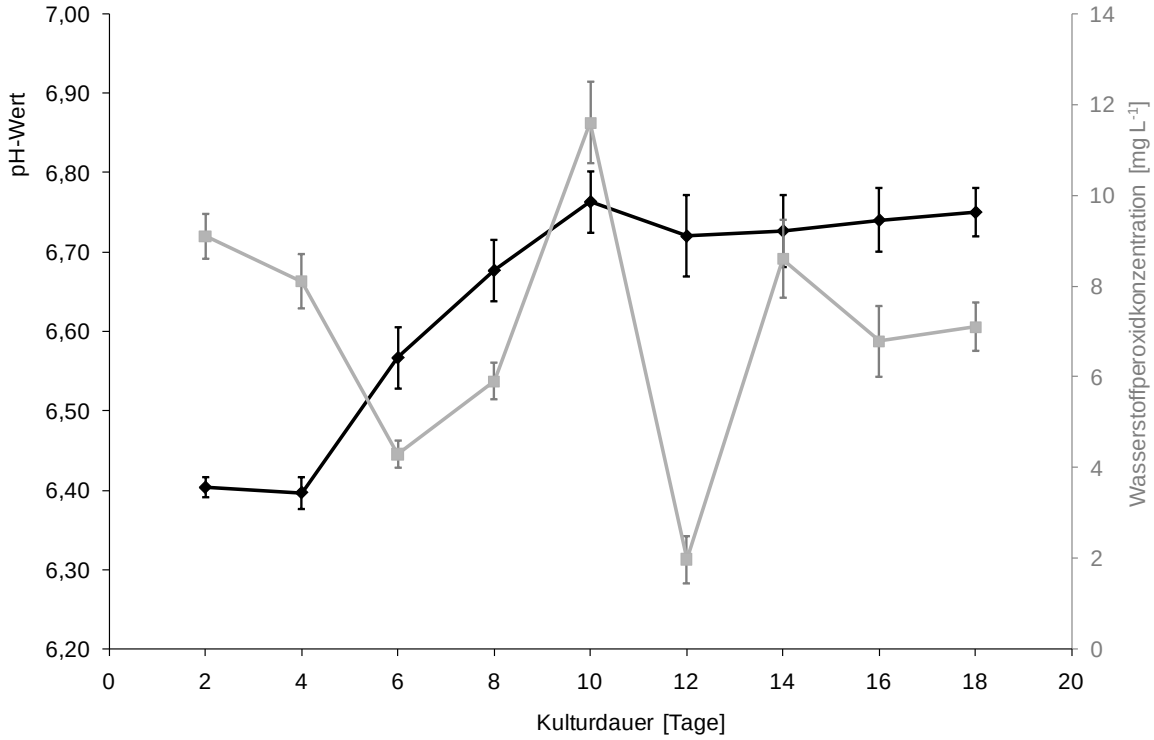


Abbildung 46: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; pH-Wert und Wasserstoffperoxidkonzentration während des Kulturverlaufs

Bis zum Maximum am achten Kulturtag stieg die Laccaseaktivität (1880 U L^{-1}, 4.7.1.1) an und blieb für sechs Tage nahezu konstant. Danach fiel die Aktivität bis zum vierzehnten Kulturtag stark ab (920 U L^{-1}), um im weiteren Kulturverlauf erneut anzusteigen (Abbildung 48).

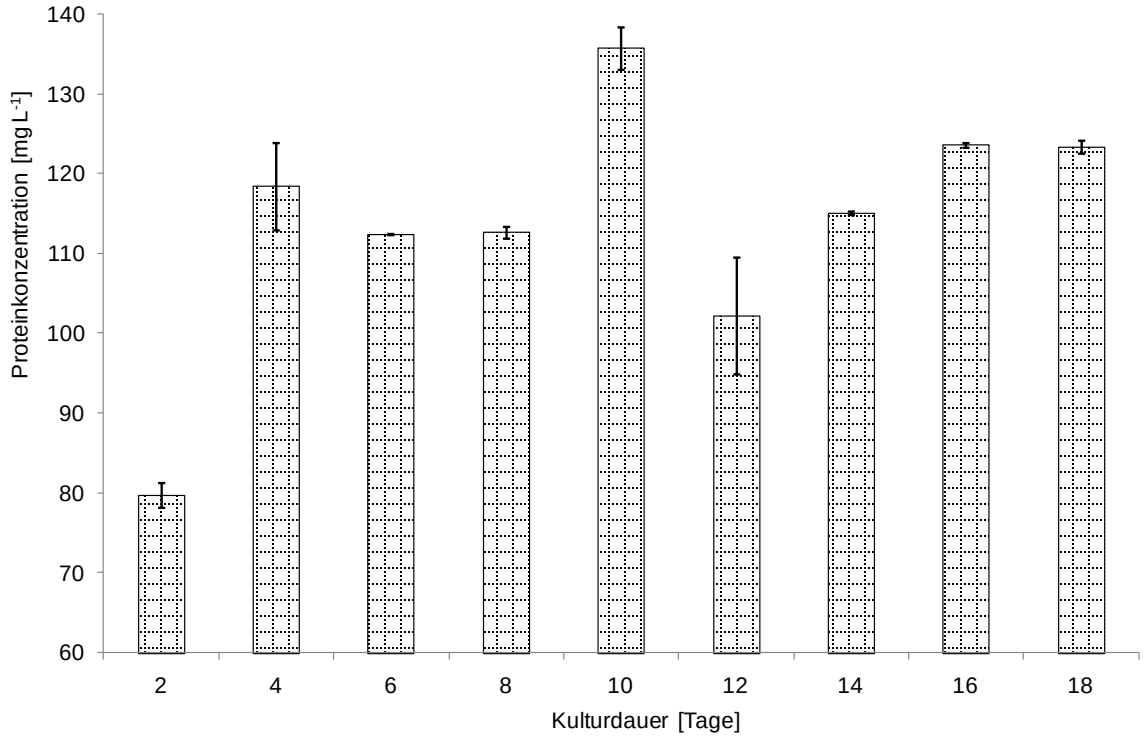


Abbildung 47: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; Proteinkonzentration während des Kulturverlaufs

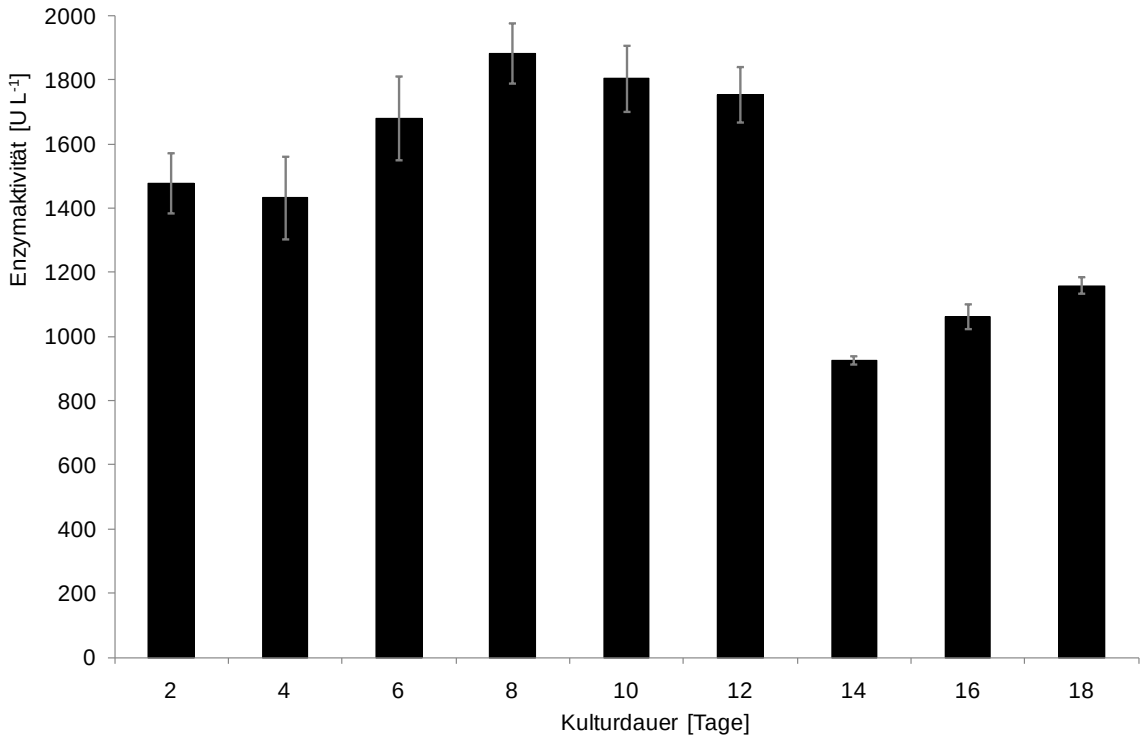
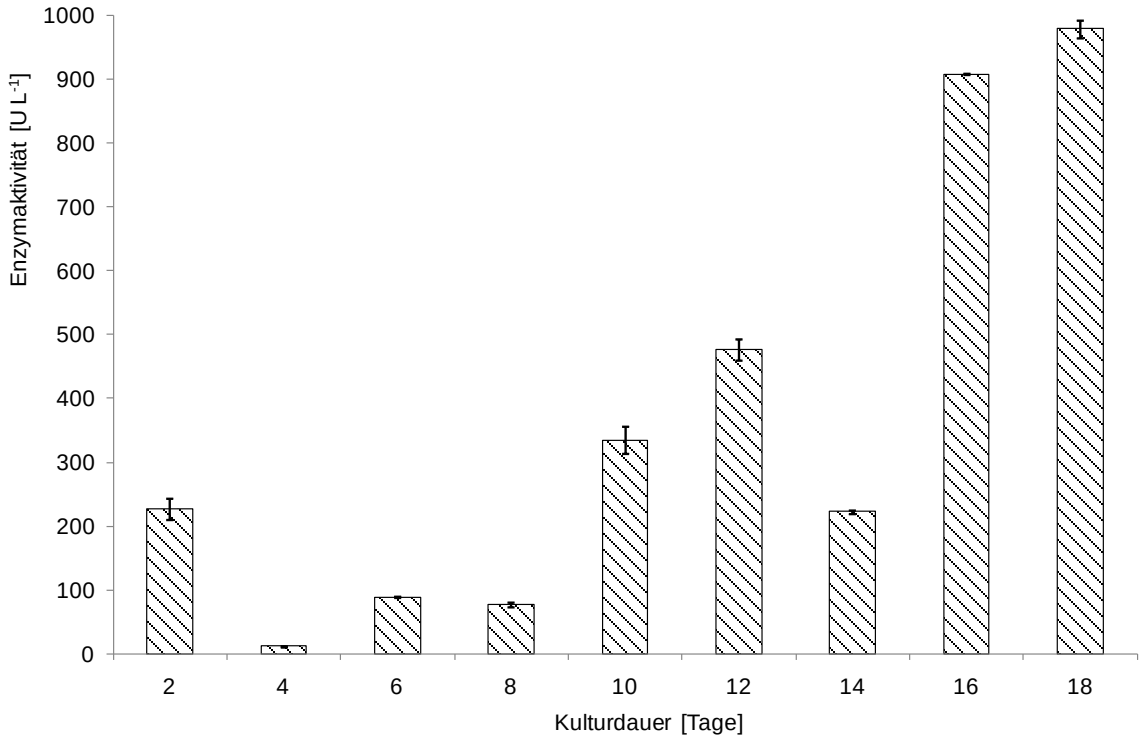


Abbildung 48: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; Laccaseaktivität während des Kulturverlaufs

Die höchste Peroxidaseaktivität (980 U L^{-1}, 4.7.1.1) wurde am achtzehnten Kulturtag detektiert. Weitere Maxima wurde am zweiten und zwölften Tag (220 bzw. 470 U L^{-1}) beobachtet (Abbildung 49 oben). Der Aktivitätsverlauf der gesondert vermessenen Manganperoxidasen (4.7.1.2) unterschied sich vom Verlauf des Summenparameters. Das Aktivitätsmaximum wurde am zweiten Kulturtag (160 U L^{-1}) detektiert. Im weiteren Kulturverlauf fiel die Aktivität ab und zwei weitere Aktivitätsmaxima wurden mit 40 (Tag 14) und 30 U L^{-1} (Tag 18) bestimmt (Abbildung 49 Mitte). Die Aktivität der polyvalenten Peroxidasen (4.7.1.3) dagegen wies zwei Maxima auf: am achten Kulturtag mit 22 U L^{-1} und am sechzehnten Kulturtag mit 10 U L^{-1} (Abbildung 49 unten).



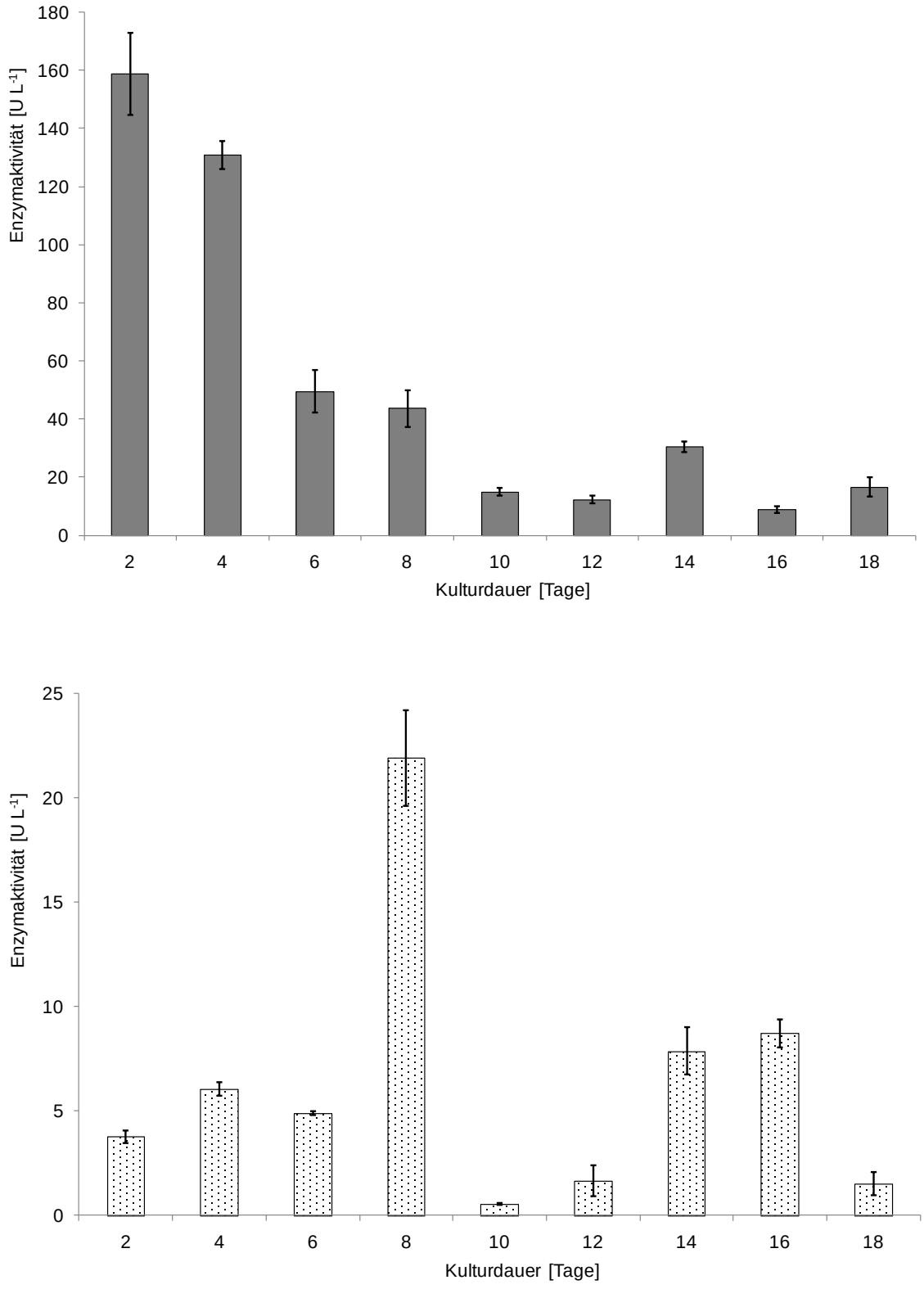


Abbildung 49: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat; oben: Peroxidaseaktivität als Summenparameter (ABTS), Mitte: Manganperoxidase-Aktivität und unten: polyvalente Peroxidase-Aktivität

Die Esteraseaktivität (4.7.1.4) stieg während der ersten acht Kulturtage stark an und erreichte mit 100 U L^{-1} ein Maximum (Abbildung 50). Die Lipaseaktivität (4.7.1.8) stieg während der ersten zehn Kulturtage stark an und erreichte mit 170 U L^{-1} ein erstes Maximum.

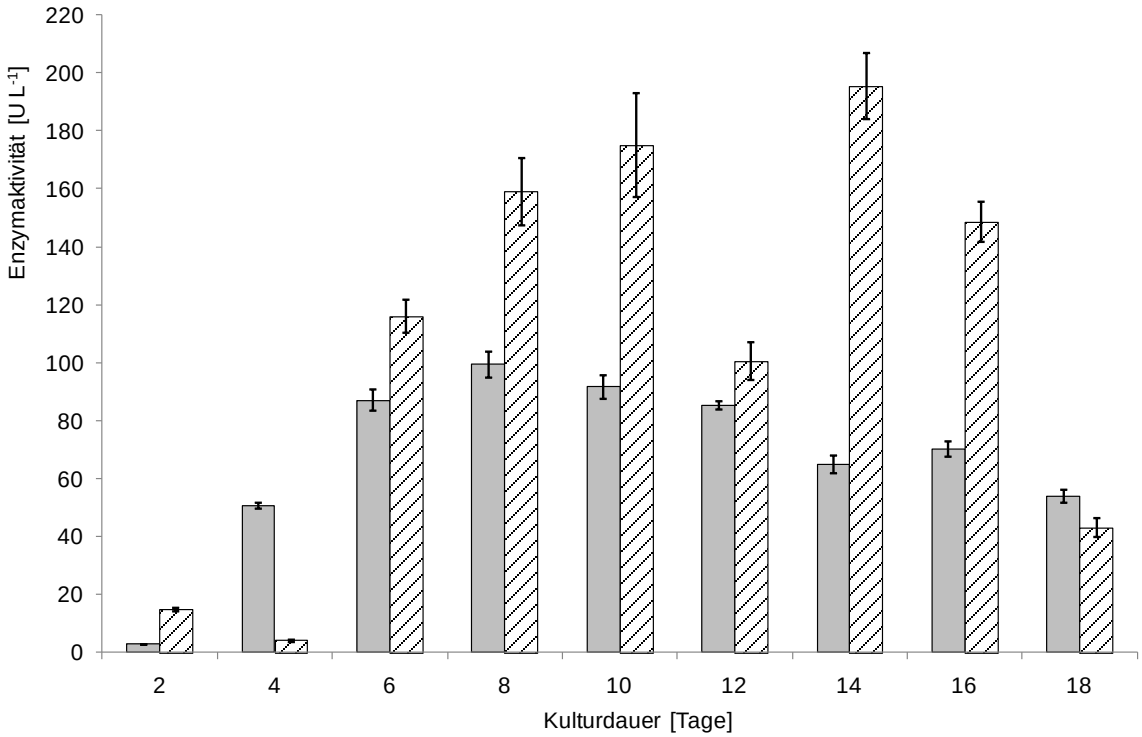


Abbildung 50: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat: Esteraseaktivität (grau) und Lipaseaktivität (schraffiert)

Die Cellulaseaktivität (4.7.1.6) stieg während der ersten zehn Kulturtage bis zu einem Maximum von 170 U L^{-1} (Abbildung 51) stetig an. Xylanaseaktivität (4.7.1.7) wurde erst ab dem vierten Kulturtag detektiert (570 U L^{-1}) (Abbildung 51).

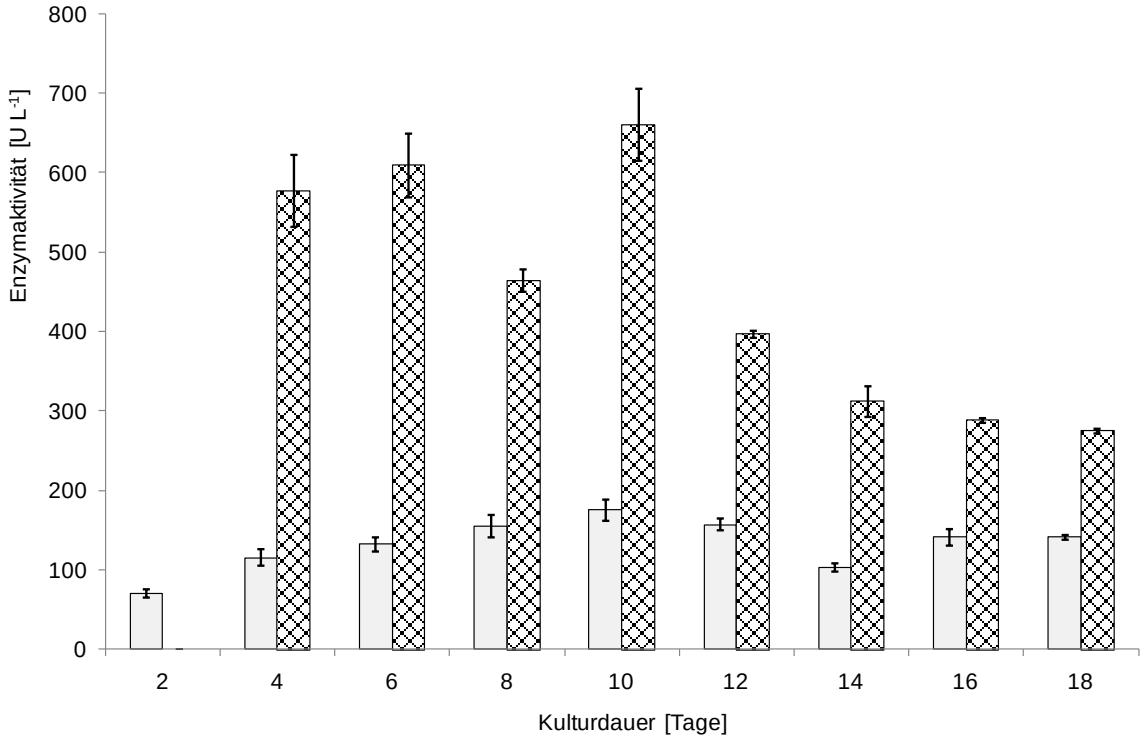


Abbildung 51: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Substrat: Cellulase- (hellgrau) und Xylanaseaktivität (gekreuzt)

2.2.1.5 Submerskulturen mit Rapsstroh

Der pH-Wert stieg während des Kulturverlaufs an und erreichte ab dem zehnten Kulturtag ein Plateau bei einem pH-Wert von 6,8 (Abbildung 52). Der Wasserstoffperoxidgehalt (4.7.1.10) in der Kultur erreichte das Maximum an Tag zwölf mit 30 mg L^{-1}. Während der weiteren Kultivierung wurden Konzentrationen von fünf bis zwölf mg L^{-1} Wasserstoffperoxid detektiert (Abbildung 52). Der Proteingehalt (4.7.1.11) der Kulturen stieg bis zum zehnten Kulturtag auf 120 mg L^{-1} an (Abbildung 53).

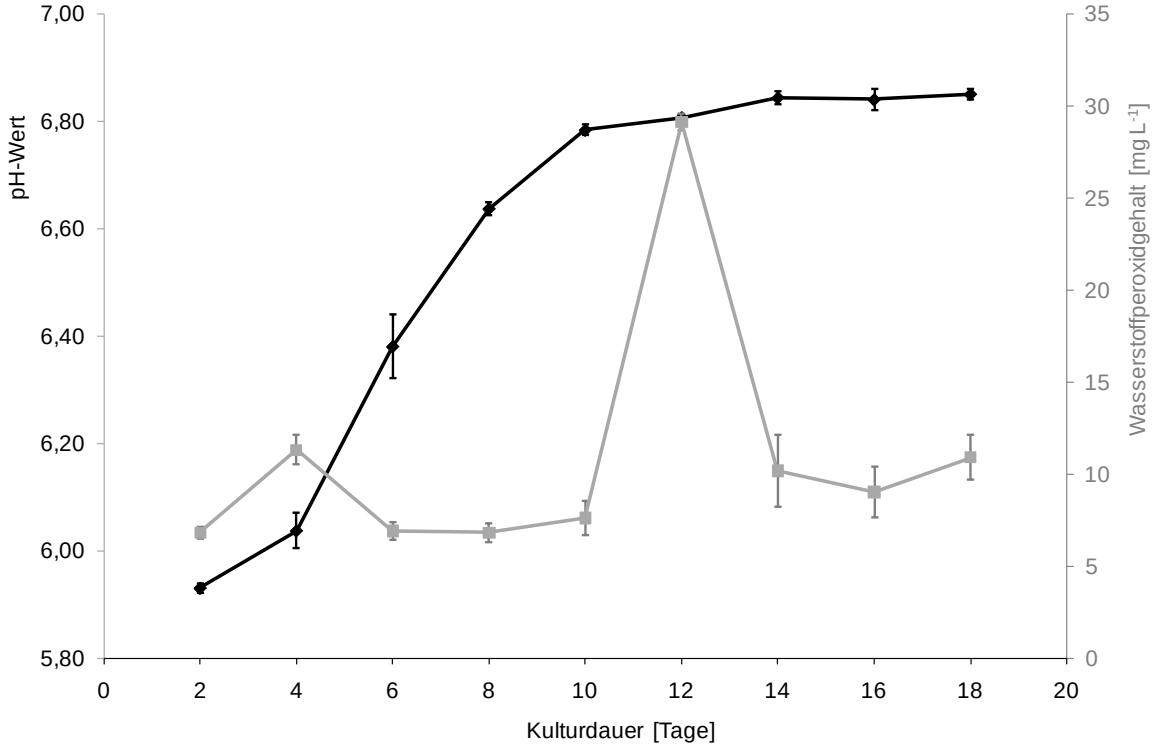


Abbildung 52: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; pH-Wert und Wasserstoffperoxidgehalt während des Kulturverlaufs

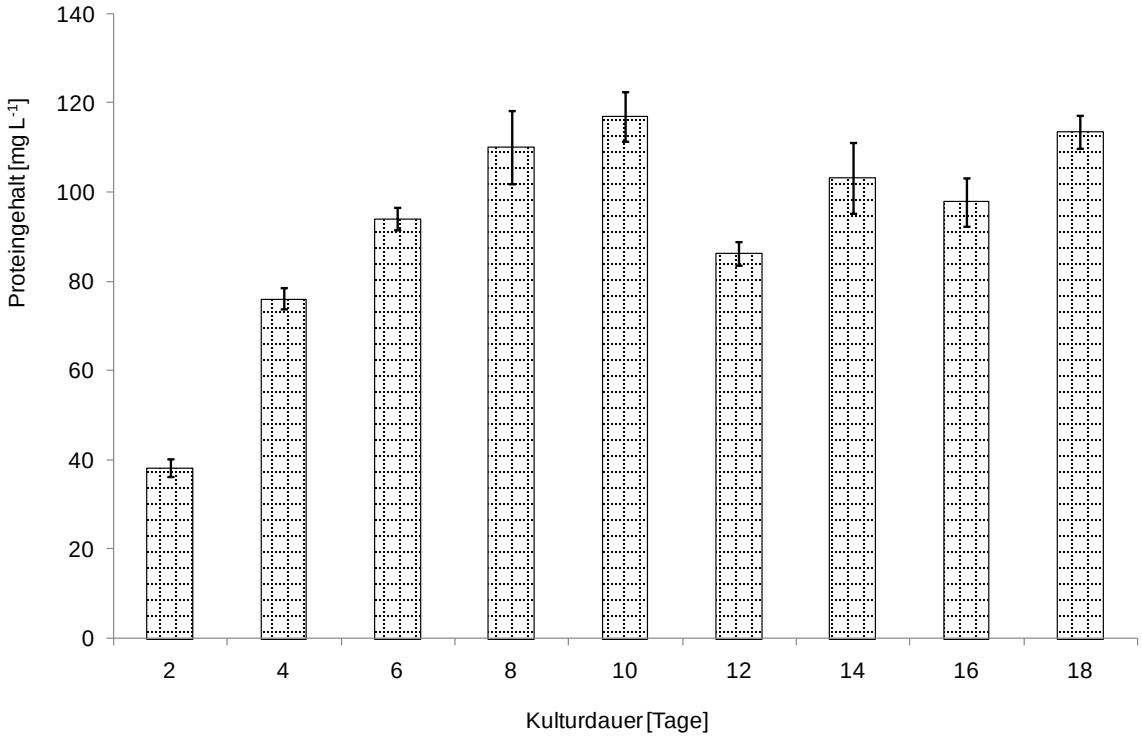


Abbildung 53: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; Proteinkonzentration während des Kulturverlaufs

Das Maximum der Laccaseaktivität (4.7.1.1) wurde am zweiten Kulturtag mit 950 U L^{-1} detektiert. Danach fiel die Aktivität bis zum achten Kulturtag ab (230 U L^{-1}) (Abbildung 54).

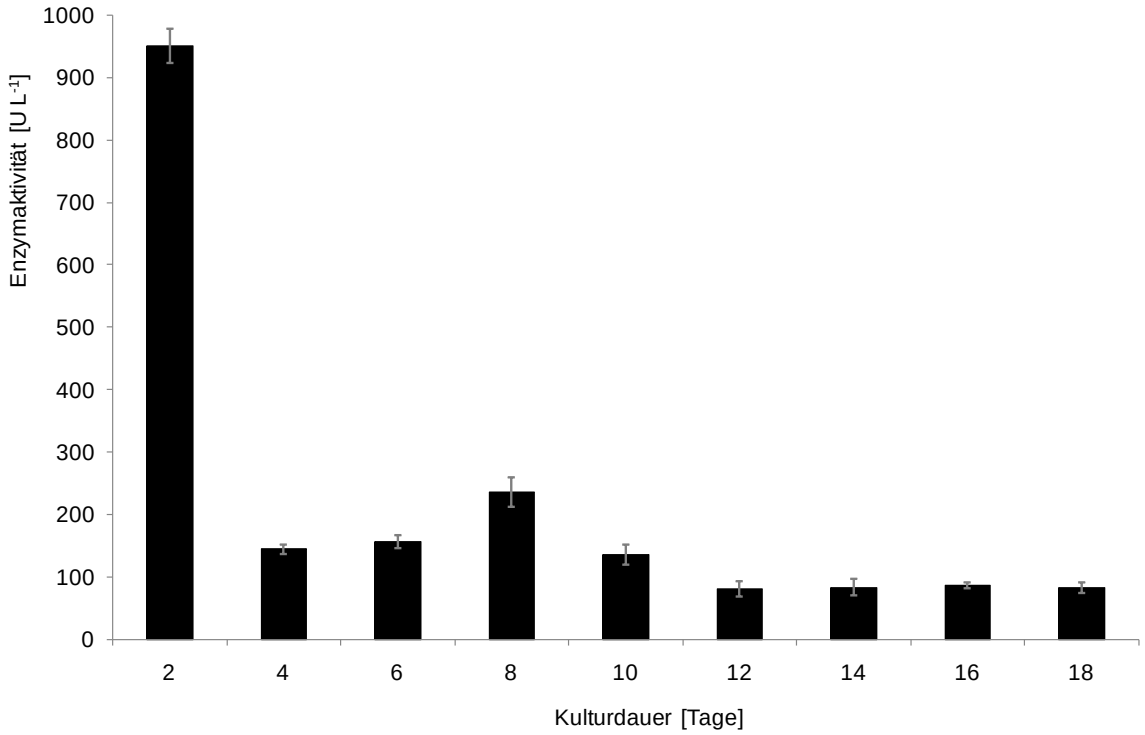


Abbildung 54: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; Laccaseaktivität während des Kulturverlaufs

Maximale Peroxidaseaktivität (4.7.1.1) wurde ebenfalls am zweiten Kulturtag mit 76 U L^{-1} detektiert (Abbildung 55 oben). Der Aktivitätsverlauf der gesondert vermessenen Manganperoxidasen (4.7.1.2) und polyvalenten Peroxidasen (4.7.1.3) unterschied sich vom Verlauf des Summenparameters. Die Manganperoxidaseaktivität war am zweiten Kulturtag (3,6 U L^{-1}) und an den Tagen zehn bis vierzehn maximal (2,4 U L^{-1}). Die Aktivität der polyvalenten Peroxidasen stieg während der ersten acht Kulturtage stetig (2,7 bis 8,2 U L^{-1}) an (Abbildung 55 unten).

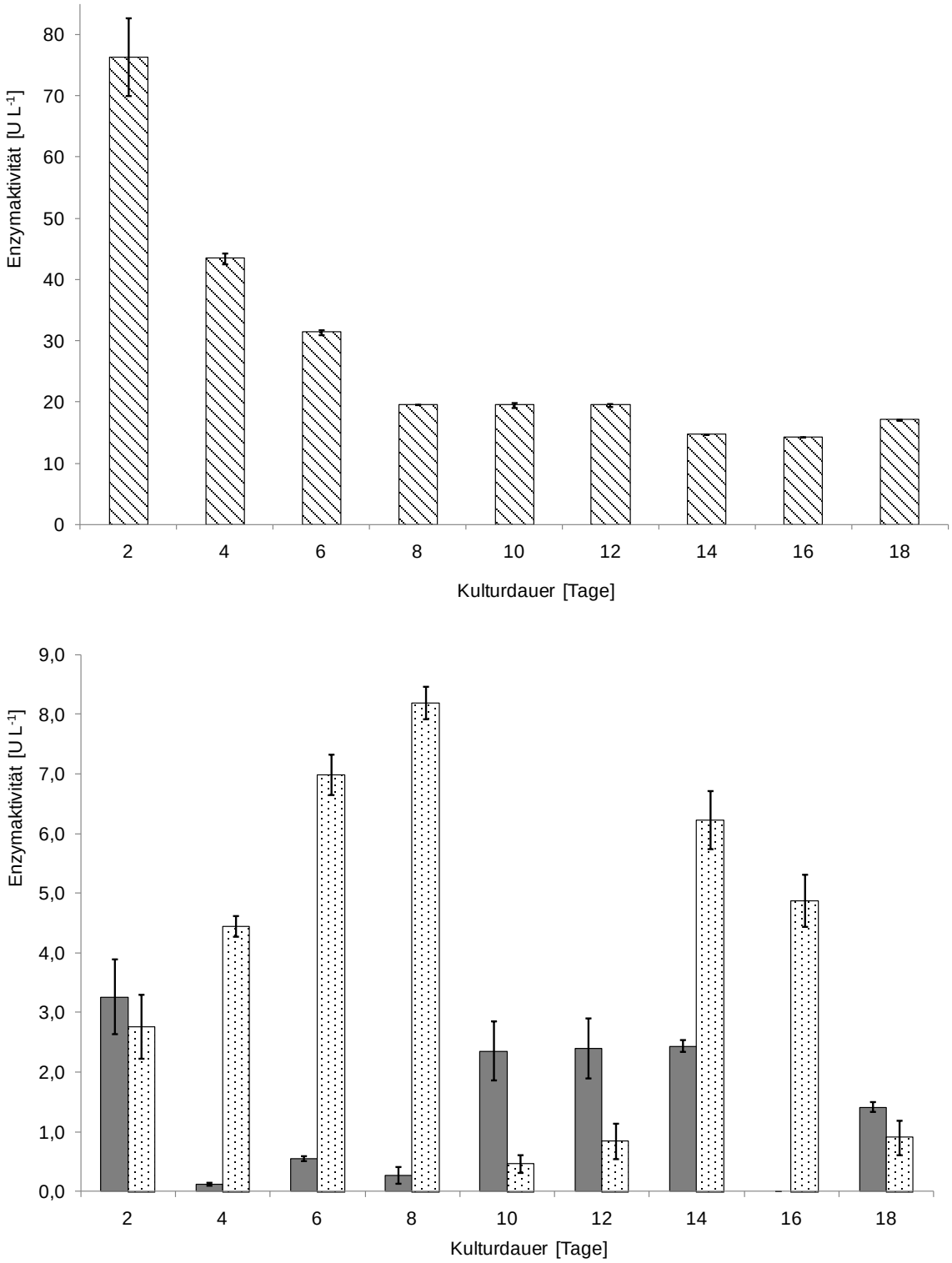


Abbildung 55: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat; oben: Peroxidaseaktivität als Summenparameter (ABTS); unten: Manganperoxidase-Aktivität (dunkelgrau) und polyvalente Peroxidase-Aktivität (gepunktet) während des Kulturverlaufs

Die Esteraseaktivität (4.7.1.4) stieg während der ersten sechs Kulturtage stark an und erreichte mit 160 U L^{-1} am sechsten Kulturtag ein Maximum (Abbildung 56). Die Lipaseaktivität (4.7.1.8) stieg während der Kultivierung an und erreichte ihr Maximum am vierzehnten Kulturtag (93 U L^{-1}) (Abbildung 56).

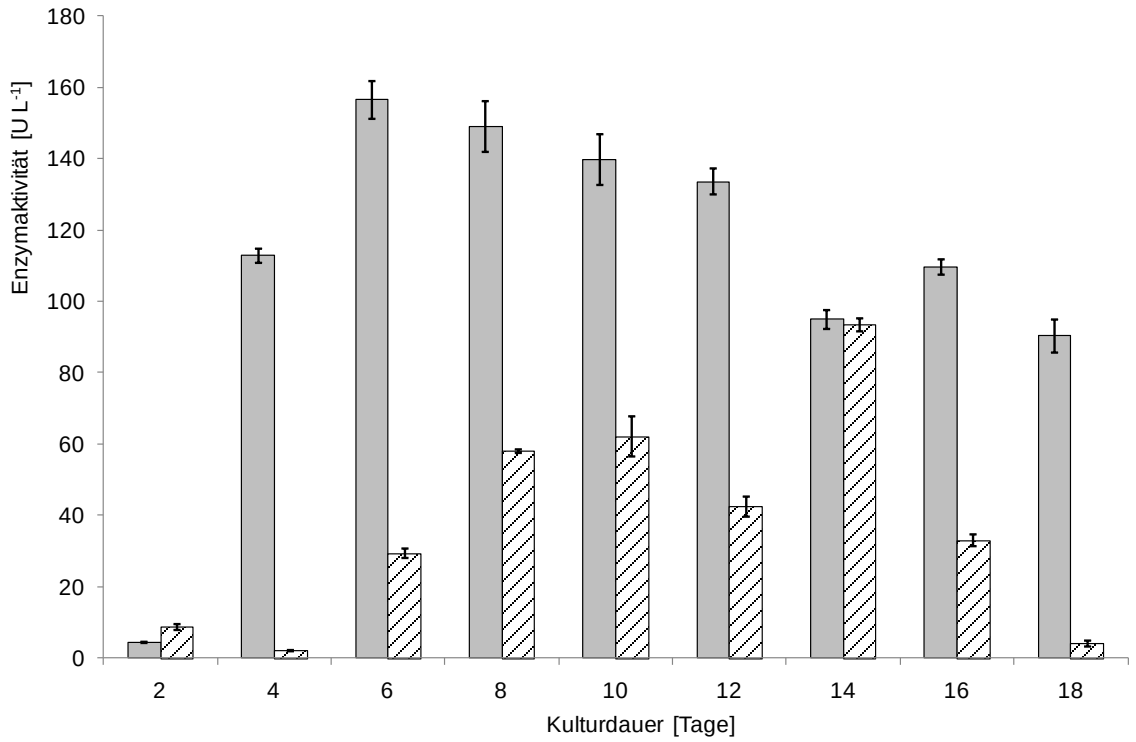


Abbildung 56: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat: Esteraseaktivität (grau) und Lipaseaktivität (schraffiert)

Das Maximum der Cellulaseaktivität (4.7.1.6) wurde an den Tagen sechs und acht (140 U L^{-1}) (Abbildung 57) detektiert. Im weiteren Kulturverlauf lag die Aktivität bei 70 bis 120 U L^{-1}. Xylanaseaktivität (4.7.1.7) wurde erst am vierten Kulturtag detektiert (750 U L^{-1}) und stieg bis zum Maximum an Tag sechs an (1030 U L^{-1}). Im weiteren Kulturverlauf fiel die Aktivität der Xylanasen kontinuierlich ab und wurde ab dem vierzehnten Kulturtag nicht mehr detektiert (Abbildung 57).

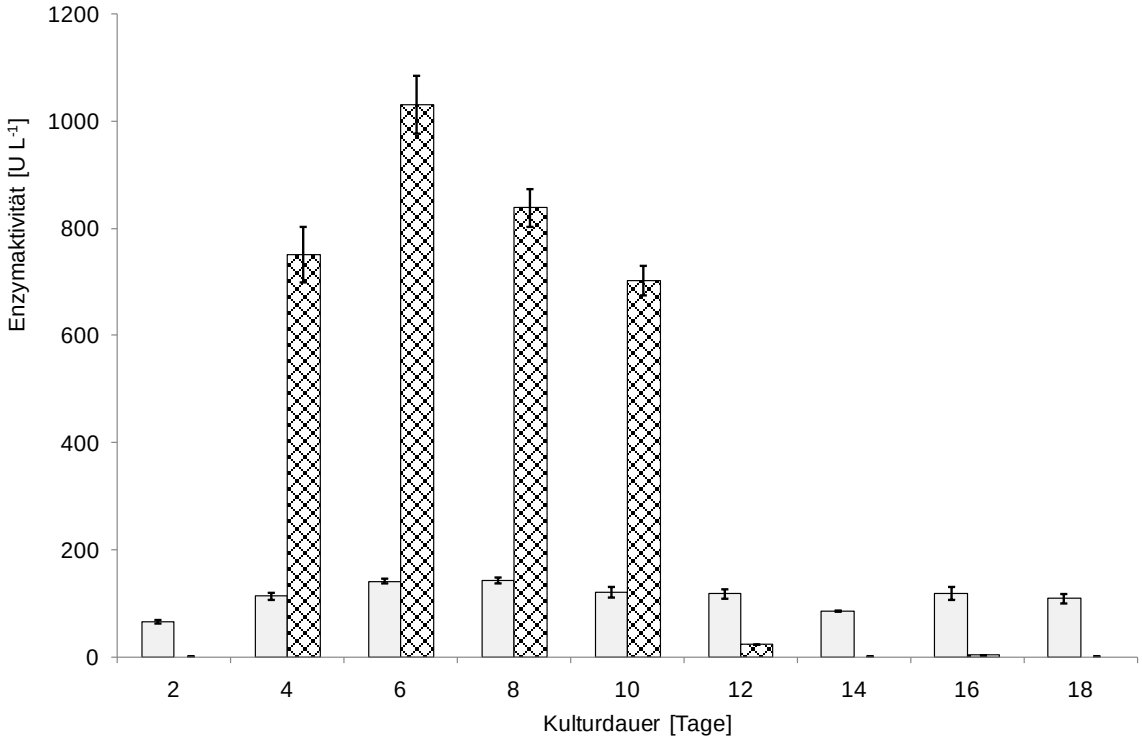


Abbildung 57: Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Substrat: Cellulase- (hellgrau) und Xylanaseaktivität (gekreuzt)

2.2.1.6 Zellfreie Umsetzung von Rapsstroh

Bei den Umsetzungen von Rapsstroh mit Überständen von Submerskulturen wurde die Glucosefreisetzung (4.7.1.12) als Indikator für den Abbau der Lignocellulose verwendet. In den eingesetzten Kulturüberständen wurde keine Glucose detektiert. Die optimale Reaktionstemperatur wurde bei 40 °C festgestellt (Abbildung 58). In weiteren zellfreien Umsetzungen wurden die Überstände in Laufe der Inkubationszeit gewechselt (dynamischer Ansatz, 4.9.2.1). Die größte Glucosemenge wurde bei einem Wechsel zwischen den Überständen der Tage 3, 6 und 9 detektiert (Abbildung 59).

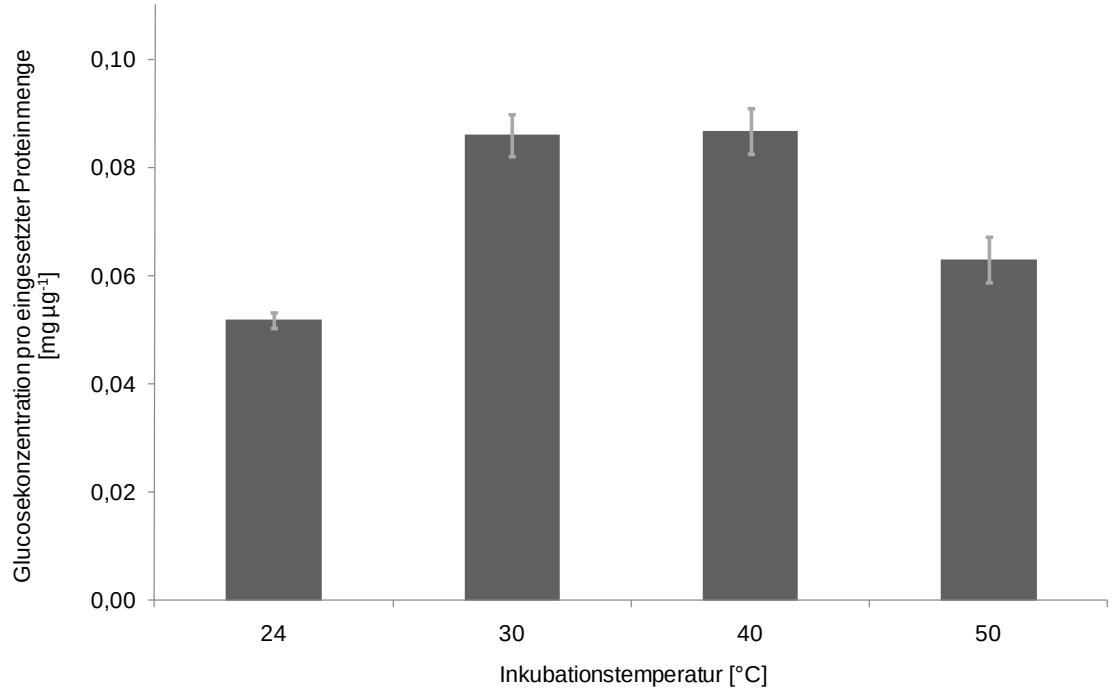


Abbildung 58: Umsetzung von feingemahlenem Rapsstroh mit Überständen von *Pleurotus sapidus*, detektiert wurde die freigesetzte Glucose in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur

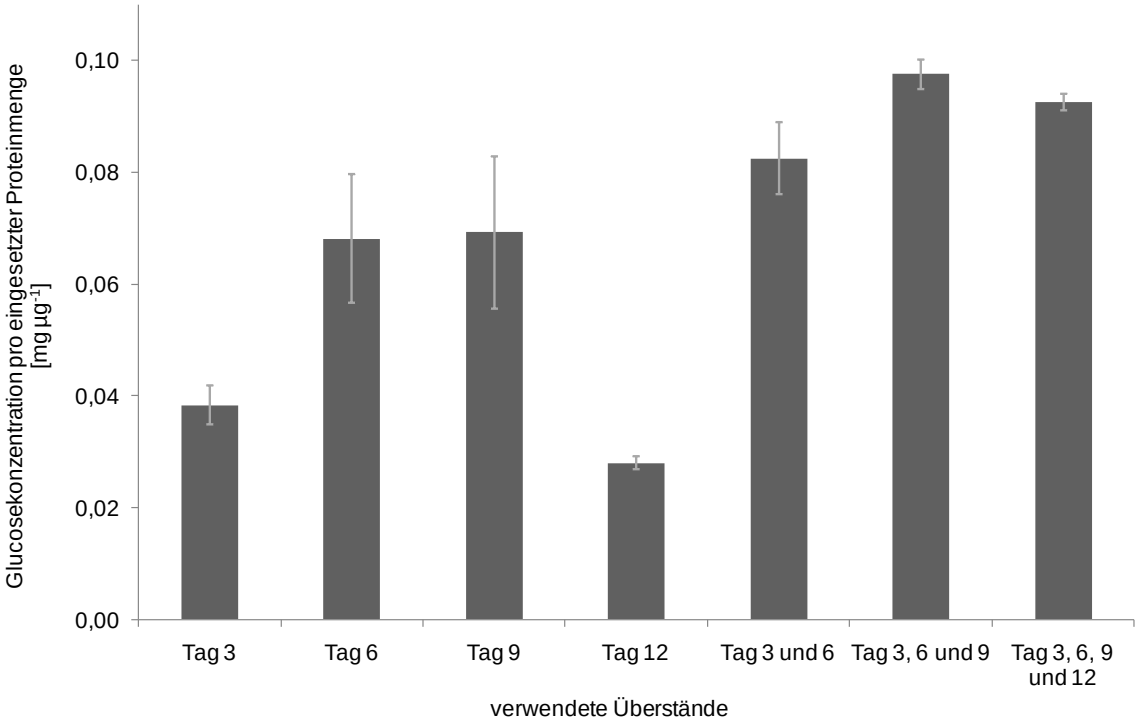


Abbildung 59: Umsetzung von feingemahlenem Rapsstroh mit Überständen von *Pleurotus sapidus*, detektiert wurde die freigesetzte Glucose in Abhängigkeit von den verwendeten Überständen

Nach viertägiger Inkubationsdauer (4.9.2.1) im dynamischen Ansatz wurde das Rapsstroh extrahiert (4.9.4). Die Extrakte wurden mittels HPSEC untersucht (4.8.2.2). Sowohl bei dem Extraktblindwert als auch bei der Umsetzung mit hitzeinaktiviertem Kulturüberstand wurden lösliche Fragmente im Bereich von neun bis elf Minuten beobachtet. Gemäß der durchgeführten Kalibrierung besaßen die gelösten Fragmente Größen von ~ 50 bis ~ 150 kDa (Abbildung 60). Bei aktiven Überständen waren geringe Mengen löslicher Fragmente bereits ab sechs Minuten zu detektieren. Auch die Konzentration der löslichen Fragmente war in den aktiven Proben höher (Abbildung 61 oben). In den Doppelbestimmungen zeigten beide aktiven Proben ein identisches HPSEC-Profil (Abbildung 61 unten).

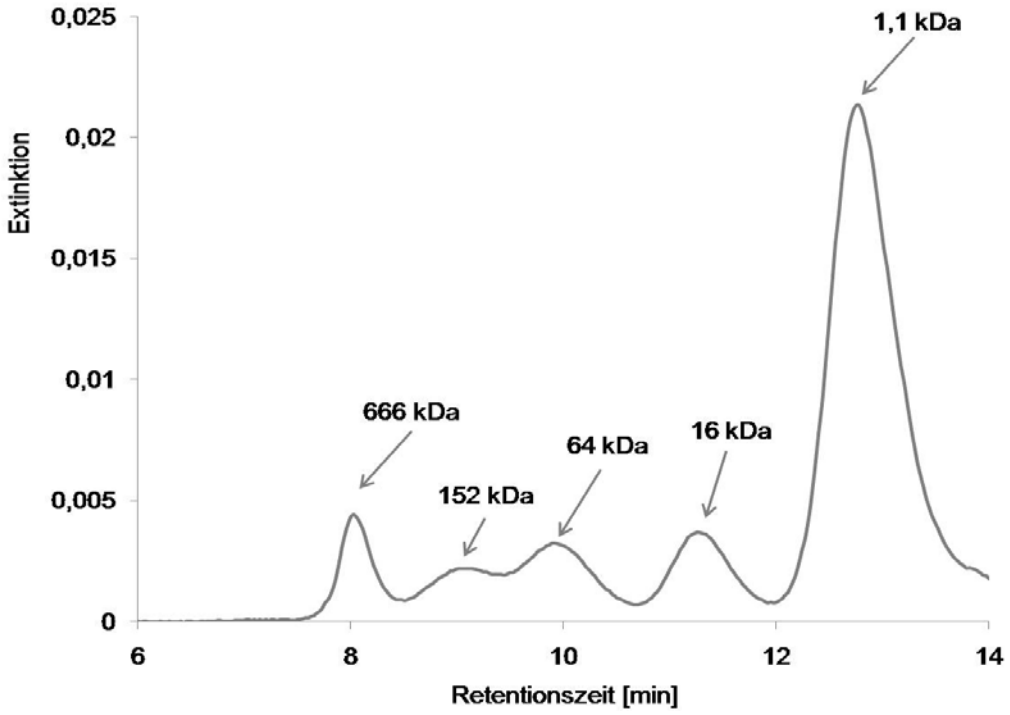


Abbildung 60: HPSEC-Chromatogramm von Polystyrolstandardsubstanzen, die Detektion erfolgte bei 280 nm

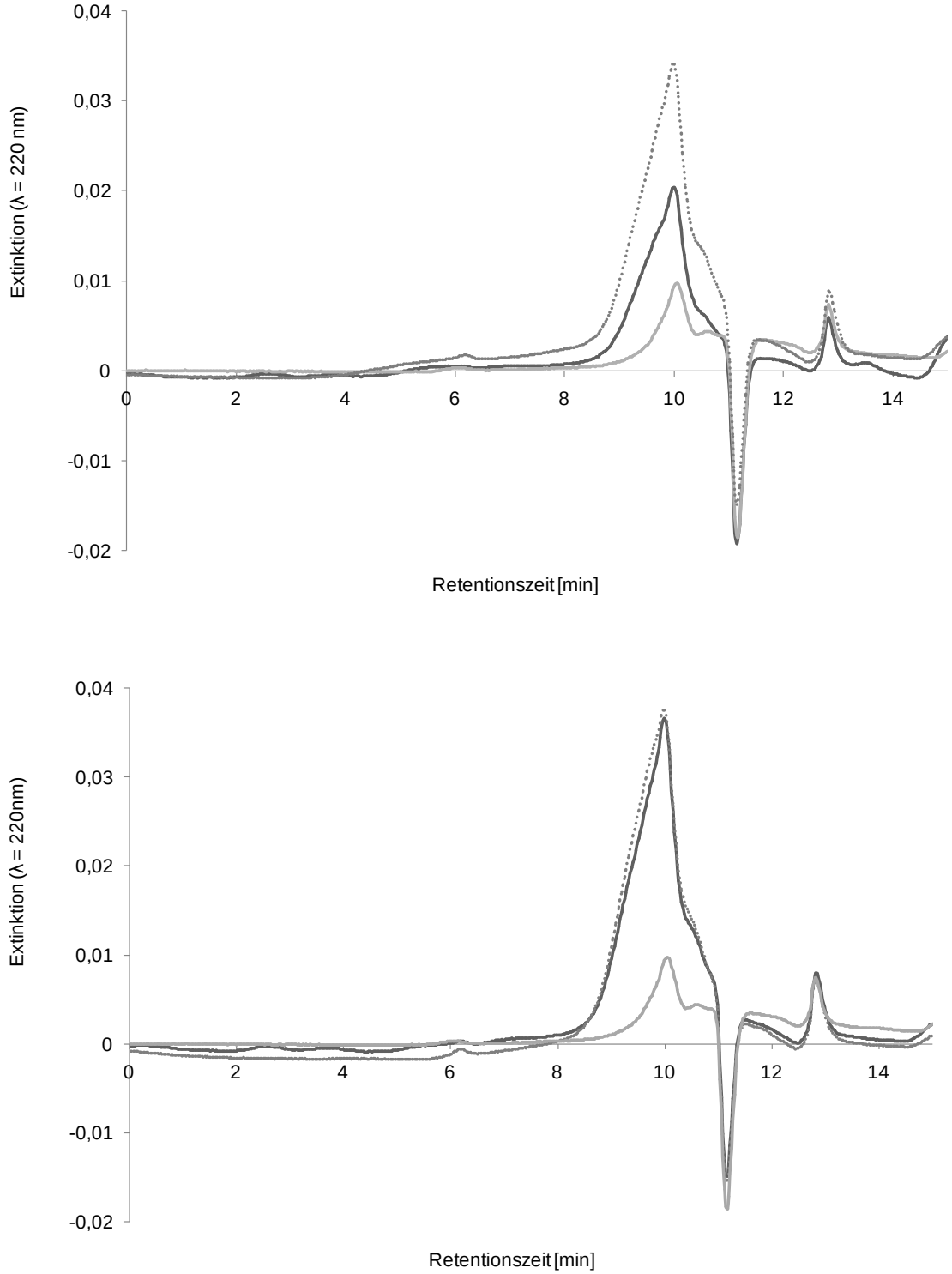


Abbildung 61: HPSEC-Elutionsprofil eines *in-vitro* Verdaus von Rapsstroh mit Kulturüberständen von *Pleurotus sapidus*; oben: hellgrau: Extraktionsblindwert, dunkelgrau: inaktive Überstände, gepunktet: aktive Überstände; unten: grau: Extraktionsblindwert, gepunktet/dunkelgrau: aktive Überstände (Doppelbestimmung)

2.2.2 Zweidimensionale elektrophoretische Analyse des Sekretoms

2.2.2.1 Optimierung der Probenvorbereitung und Visualisierung von Proteinmustern

Die Probenvorbereitung für eine elektrophoretische Trennung von Proteingemischen muss für jedes Kultursystem optimiert werden. Daher wurden zunächst drei verschiedene Parameter untersucht, um eine gleichbleibende Probenqualität zu gewährleisten.

a) Degradation von Proteinen während der Probenvorbereitung

Eine Degradation von Proteinen lässt sich auf Peptidaseaktivitäten zurückführen. Bei einer Kulturdauer von 30 Tagen wurde in Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* Peptidaseaktivitäten von 30 bis 350 U L^{-1} bestimmt (4.7.1.5). Das Maximum der Aktivität wurde am sechsten Kulturtag detektiert (350 U L^{-1}) (Abbildung 62).

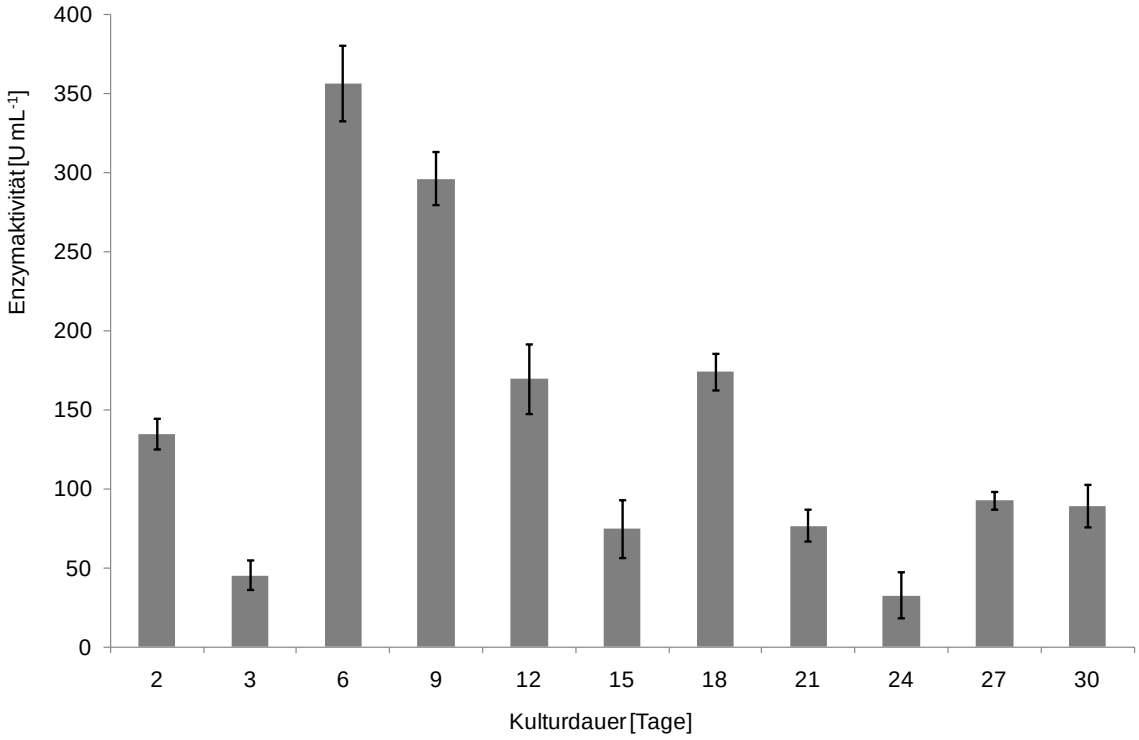


Abbildung 62: Peptidaseaktivität in Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* mit dem Substrat Rapsstroh während des Kulturverlaufs

Mit einem komplexen Peptidaseinhibitorcocktail (Mix 1, 4.6.1.5) wurde die Peptidaseaktivität vollständig gehemmt (Abbildung 63). Eine Verdünnung des komplexen Inhibitors von 1:5 (Abbildung 63) reichte hierfür nicht mehr aus. Eine Wirkung von Pepstatin wurde nicht detektiert. Durch das Einsetzen verschiedener Inhibitorkonzentrationen und –kombinationen wurde der Mix weiter optimiert. Der optimale Peptidaseinhibitor (Mix 2, Abbildung 63, 4.6.1.5) wurde bei den Sekretomstudien durchgehend eingesetzt.

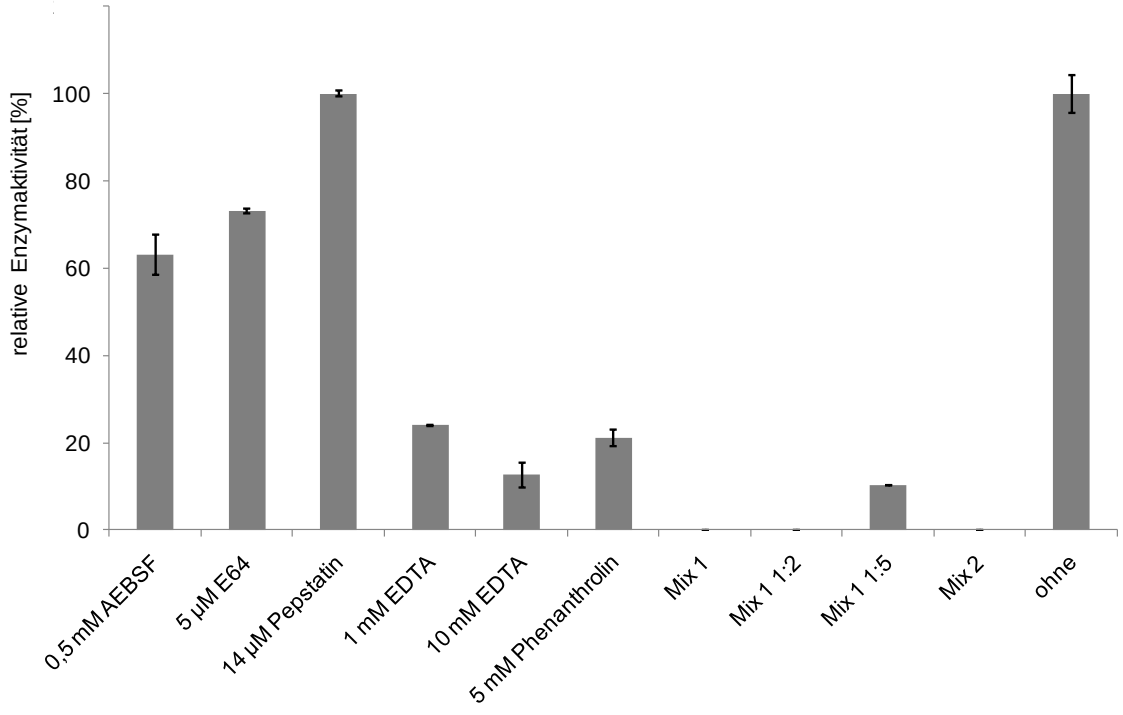


Abbildung 63: relative Peptidaseaktivität bei Zusatz von verschiedenen Peptidaseinhibitoren bezogen auf die Aktivität ohne Inhibitoren und Vergleich verschiedener Konzentrationen an Peptidaseinhibitorgemischen (Mix 1, Mix 2 siehe 4.6.1.5)

b) Konzentrierung der extrazellulären Proteine

Zur Gewährleistung einer ausreichenden Proteinmenge wurden die extrazellulären Enzyme mittels Ultrafiltration (UF) konzentriert. Zwei zur Verfügung stehende Ultrafiltrationseinheiten (4.4) mit einem Größenausschluss von 10 kDa wurden auf ihre Effizienz getestet. Bei der Amicon® Ultrafiltrationseinheit wurde eine Filterkuchenbildung auf der Membran beobachtet. Dies führte zu einem Proteinverlust von 40%. Bei der Macrosep® Einheit wurde lediglich ein Verlust von 7% bestimmt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich zweier Ultrafiltrationsmodule an Hand des Protein- und Phenolgehaltes aufgearbeiteter Submerskulturüberstände

	Amicon Ultra®		Macrosep®	
	Proteinmenge [µg]	**Phenole [µg Gallussäure-equivalent]**	**Proteinmenge [µg]**	**Phenole [µg Gallussäure-equivalent]**
Ausgangs-menge	1150 µg	240 µg	1150 µg	240 µg
Retentat der UF	687 µg	115 µg	1058 µg	208 µg
Permeat der UF	3,4 µg	40 µg	5,8 µg	17 µg

c) Proteinfällung

Proteinextrakte, die wie unter 4.6.1.10 und 4.6.1.12 beschrieben erhalten wurden, wiesen eine tiefbraune Färbung auf. Zur Entfernung störender Substanzen wurden die Proteine zunächst gefällt. Zwei Fällungsmethoden wurden hierzu miteinander verglichen. Ein Extrakt einer Emerskultur nach vierzehn Tagen wurde aufgearbeitet (4.6.1.12) und die Proteine gefällt (4.7.5.1 und 4.7.5.2). Beide Präzipitate wiesen eine starke Braunfärbung auf.

Nach der Trichloressigsäure-Fällung wurde im Elektropherogramm eine vertikale Schlierenbildung über den gesamten Molekülgrößenbereich im sauren pI-Bereich beobachtet (Abbildung 64). Bei der Methanol/Chlorform-Fällung wurden dagegen, neben einer geringen Schlierenbildung im oberen Molekülmassenbereich des sauren pI-Bereichs, zweidimensional getrennte Proteine detektiert (Abbildung 65).

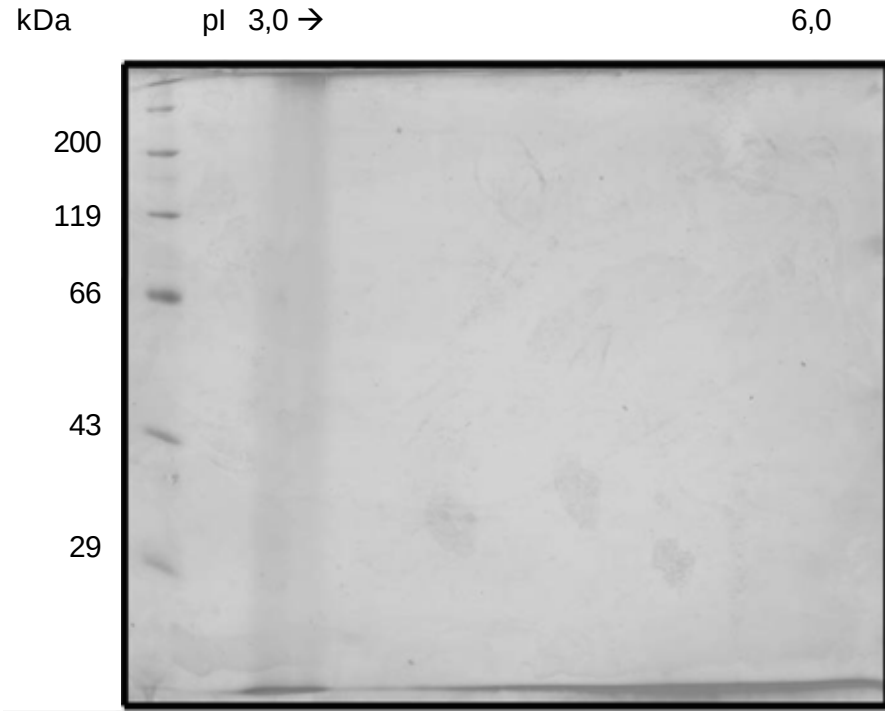


Abbildung 64: zweidimensionales Elektropherogramm extrazellulärer Enzyme einer *Pleurotus sapidus* Emerskultur auf Rapsstroh, Extrakte nach 14 Kulturtagen, mit Silber gefärbt; nach Ultrafiltration und Trichloressigsäure-Fällung (4.7.5.1)

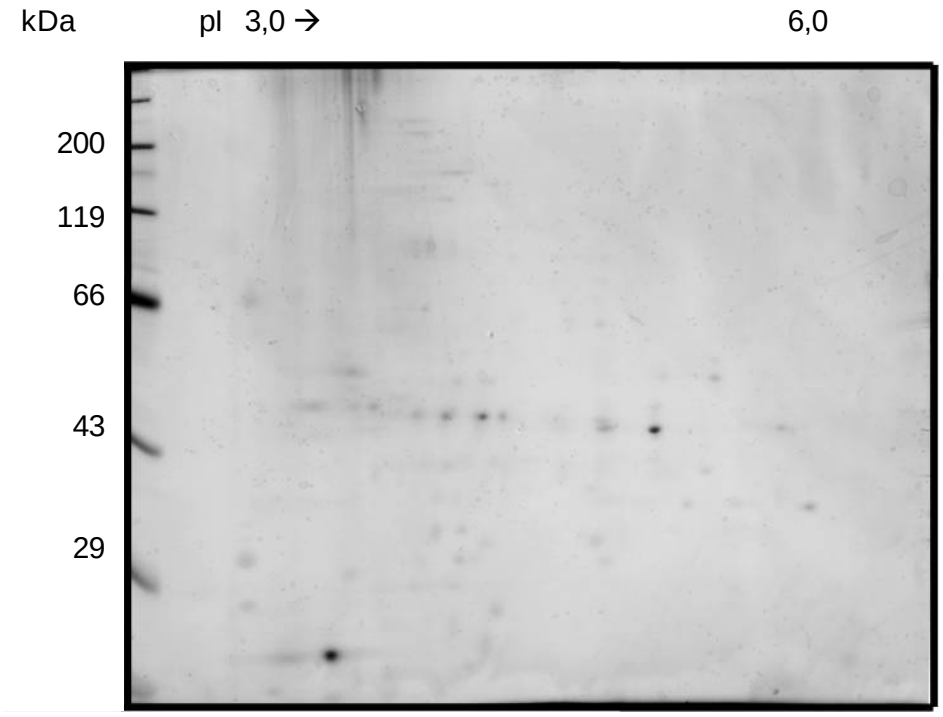


Abbildung 65: zweidimensionales Elektropherogramm extrazellulärer Enzyme einer *Pleurotus sapidus* Emerskultur auf Rapsstroh: Extrakte nach 14 Kulturtagen, mit Silber gefärbt; nach Ultrafiltration und Methanol/Chloroform Fällung (4.7.5.2)

2.2.2.2 Übersichtsanalyse von Oberflächenkulturen auf Rapsstroh

Die Emerskulturen von *Pleurotus sapidus* wurden am Erntetag extrahiert (4.6.1.12) und aufgearbeitet (4.7.5.2). Nach zwei Wochen Inkubationszeit, waren wenige Spots im niederen Molekulargewichtsbereich (~ 35 kDa) zu detektieren (Abbildung 66, oben links). Nach weiteren zwei Wochen waren zusätzliche Spots im mittleren (~ 50 kDa) und niederen Molekulargewichtsbereich (~ 29 kDa) zu detektieren. Im späteren Kulturverlauf (42 und 56 Tage) wurden insgesamt mehr Proteinspots nachgewiesen (Abbildung 66 unten). Die Schlierenbildung im gesamten Molekülgewichtsbereich des sauren pI-Bereichs wurde im Kulturverlauf stärker (Abbildung 66). Die Proteinspots waren im pI- Bereich von drei bis sechs zu finden und wiesen eine Größenverteilung von 30 bis 100 kDa (Tag 42) und 30 bis 60 kDa (Tag 56) auf.

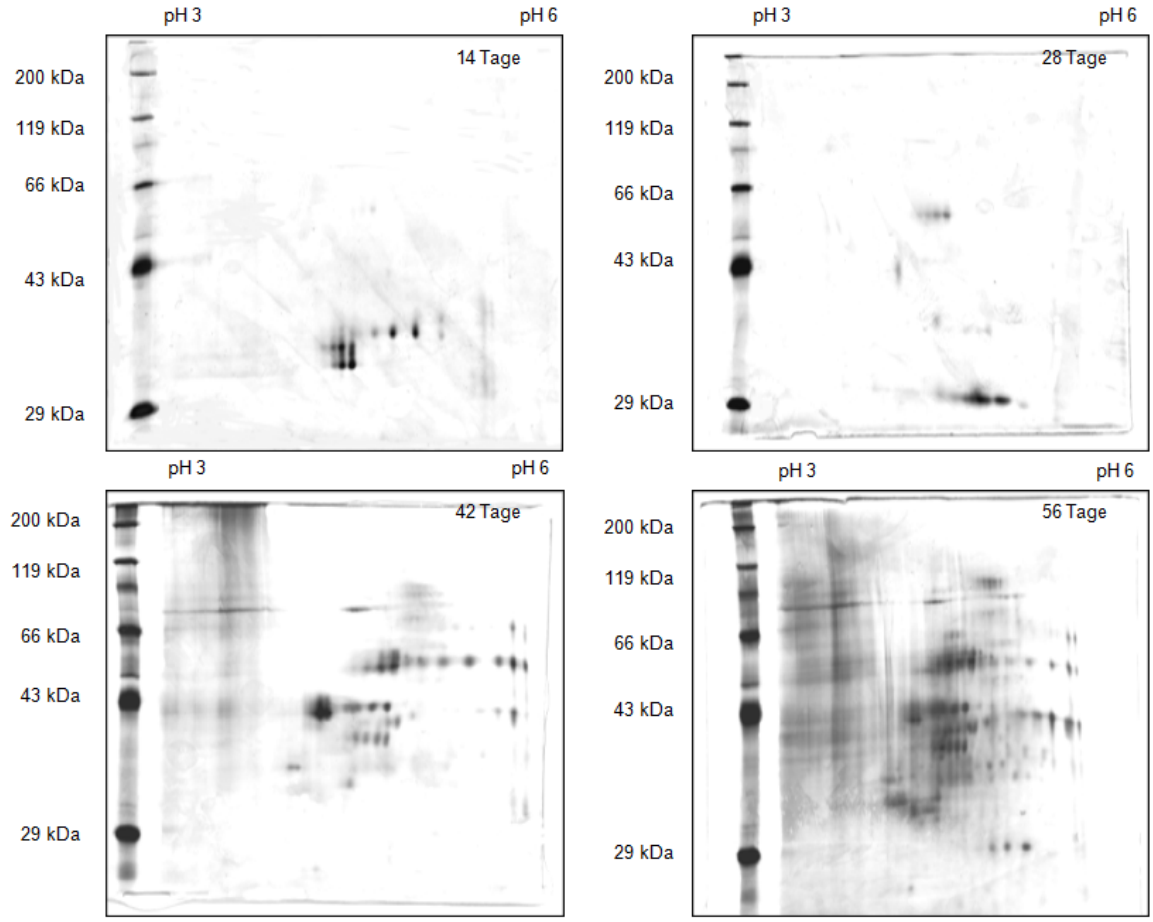


Abbildung 66: zweidimensionale Elektropherogramme extrazellulärer Enzyme von *Pleurotus sapidus*: Extrakte nach 14, 28, 42 und 56 Kulturtagen, mit Colloidal-Coomassie gefärbt

2.2.2.3 Übersichtsanalyse von Submerskulturen mit Rapsstroh

Bei der Kultivierung von *Pleurotus sapidus* in Schüttelkulturen mit Rapsstroh als Substrat wurde der neunte Kulturtag zur Übersichtsanalyse ausgewählt. Aus dem zweidimensionalen Elektropherogramm wurden insgesamt 30 Spots ausgewählt und diese mittels ESI-MS/MS partiell *de novo* sequenziert (Protagen AG, Abbildung 67). Von den 30 ausgewählten Proteinspots wurden 163 Peptidsequenzen generiert (siehe 6.3). Über Homologievergleiche (BLAST-Datenbank-Recherche) wurden Enzyme, die am Lignocelluloseabbau beteiligt sind, identifiziert. Die in der Übersichtsprobe enthaltenen Proteine gehörten zu den Proteinfamilien der Oxidoreduktasen, Peptidasen und Esterasen (Tabelle 6).

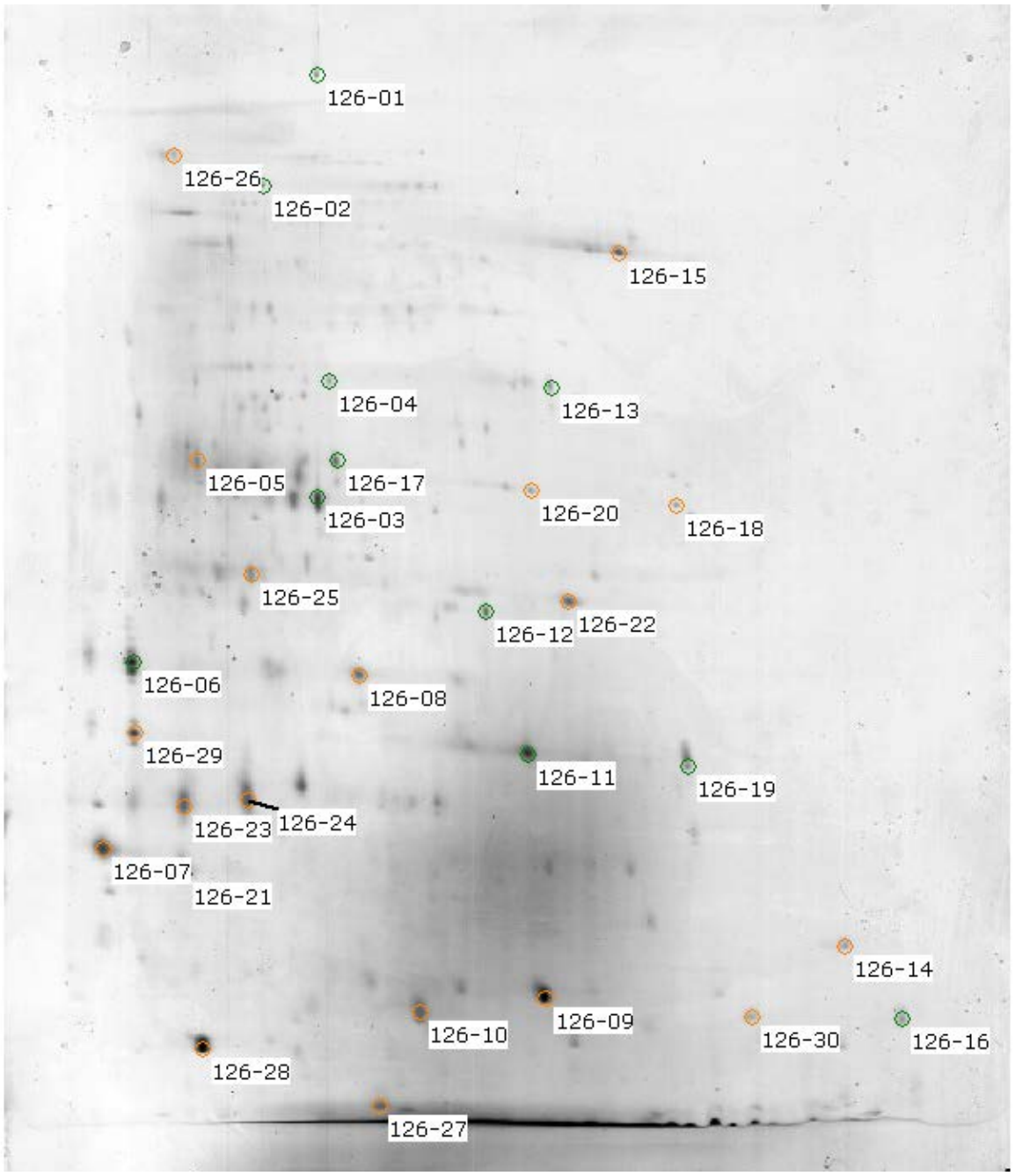


Abbildung 67: zweidimensionales Elektropherogramm extrazellulärer Enzyme von *Pleurotus sapidus* Submerskultur auf Rapsstroh, Extrakt nach 9 Kulturtagen, Auswahl von 30 Proteinspots zur massenspektrometrischen Analyse

Tabelle 6: Proteinidentifizierung anhand von Peptidsequenz-Datenbankrecherchen; (*)Protein Blast NCBI (Altschul *et al.* 1997) und MS Blast EMBL (Shevchenko *et al.* 2001); ≠: Peptide wurden Proteinen unbekannter Funktion zugeordnet; Sequenzdaten siehe 6.3

Spotnummer	Identifizierte Proteine/Homologien	Homologie
126-01*	Laccase 2, *P. sapidus*	100%
126-02	Arylalkoholoxidase Vorläufer, *P. eryngii*	94%
126-03*	Laccase 2, *P. sapidus*	92%
126-04	Xanthophyllester-Lipase Vorläufer, *P. sapidus*	88 - 100%
126-05	Serinprotease aus *X. campestris*	75 - 100%
126-06*	Laccase Untereinheit POXA 3a/b, *P. ostreatus*	84 – 92%
126-07	≠	≠
126-08	≠	≠
126-09	Phosphatidylglycerol spezifische Phospholipase C, *T. stipitatus*	74%
126-10	Alkoholoxidase, *P. glucozyma, P. trehalophila*	75%
126-11	Peptidyl-Lysyl-Metallendopeptidase, *P. ostreatus*	93%
126-12	div. Peptidasen, *V. vulnificus*	77%
126-13	Methanoldehydrogenase, *Acinetobacter sp.*	66 – 85%
126-14	Serin/Threonin-Kinase, *O. sativa*	75 – 100%
126-15	≠	≠
126-16	Laccase 2, *P. sapidus*	75 – 85%
126-17	Laccase, *P. ostreatus*	90 – 100%
126-18	≠	≠
126-19*	≠	≠
126-20	Peroxidase, *L. plantarum*	100%
126-21	Laccase, *P. ostreatus*	75%
126-22	≠	≠
126-23	≠	≠
126-24	extrazelluläre Dioxygenase, *A. flavus*	74%
126-25*	Aldehydreduktase II, *A. fumigatus*	100%
126-26	Glycosid Hydrolase Familie 72, *L. bicolor*	99%
126-27	Xanthophyllester-Lipase Precursor, *L. bicolor*	72%
126-28	≠	≠
126-29*	Laccase Untereinheit POXA 3a/b, *P. ostreatus*	70 – 90%
126-30*	Aldehydreduktase II, *A. fumigatus*	88%

Zur qualitativen Beurteilung der Proteinexpression an unterschiedlichen Kulturtagen wurden zusätzlich zweidimensionale Elektrophoresen der Kulturtage 6 und 12 erstellt (Protagen AG) (Abbildung 68 und 69). Die 30 sequenzierten Spots (Abbildung 67) wurden hinsichtlich einer Intensitätsänderung von Tag 6 nach Tag 9 (Abbildung 68), sowie von Tag 9 nach Tag 12 (Abbildung 69), untersucht. Nur bei wenigen Proteinspots (~20%) wurde eindeutig eine Regulation beobachtet (Tabelle 7).

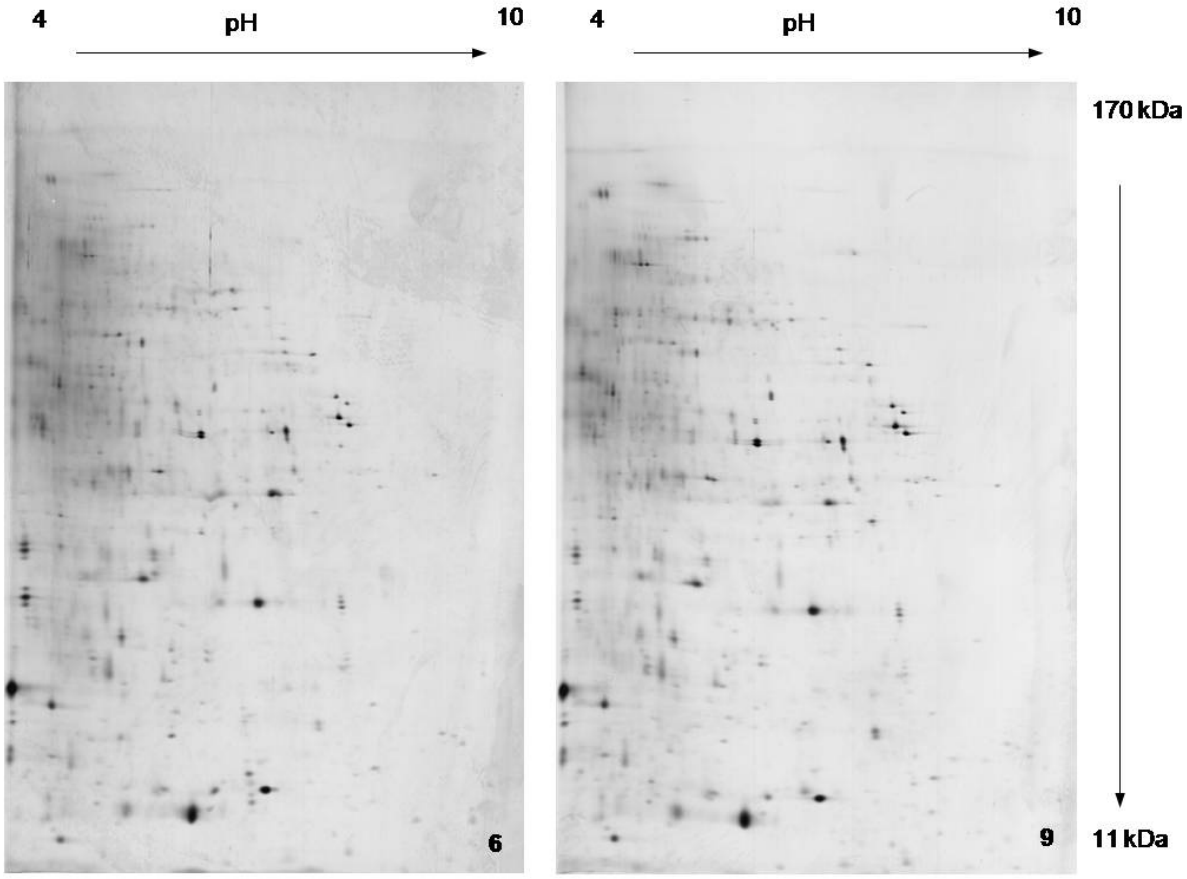


Abbildung 68: zweidimensionale Elektropherogramme extrazellulärer Enzyme von *Pleurotus sapidus* Submerskulturen auf Rapsstroh: Extrakte nach 6 und 9 Kulturtagen

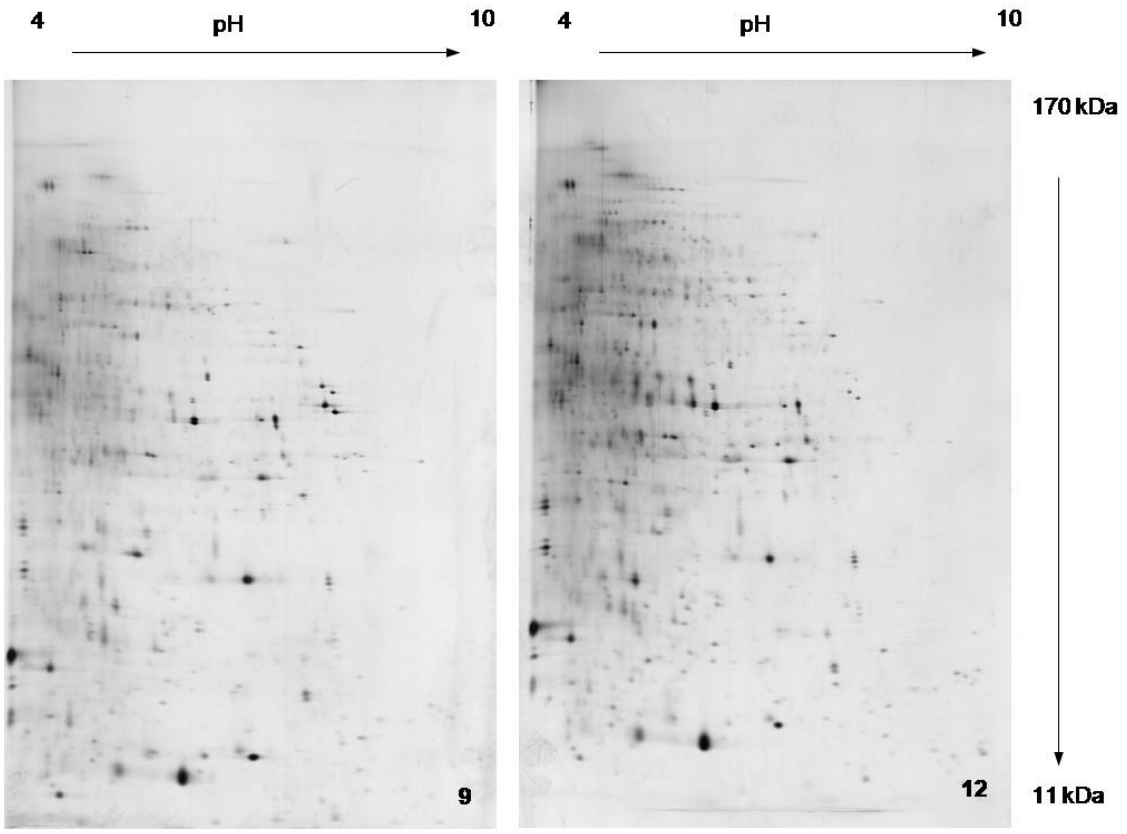


Abbildung 69: zweidimensionale Elektropherogramme extrazellulärer Enzyme von *Pleurotus sapidus* Submerskulturen auf Rapsstroh: Extrakte nach 9 und 12 Kulturtagen

Tabelle 7: Zuordnung der identifizierten Proteine zu den Spotintensitäten (Abbildung 68 und Abbildung 69); nd: nicht detektiert; ↑: vermehrte Proteinexpression; ↓: verminderte Proteinexpression; -: gleichbleibende Proteinexpression; ≠: Peptide konnten keinem bekannten Protein zugeordnet werden; Sequenzdaten siehe 6.3

Spotnummer	**ID**	**Tag 6 → Tag 9**	**Tag 9 → Tag 12**
126-01	Laccase 2 (100%), *P. sapidus*	nd	nd
126-02	Arylalkoholoxidase Vorläufer (94%), *P. ostreatus*	nd	–
126-03	Laccase 2 (92%), *P. sapidus*	↑	↑
126-04	Carotinoidester Lipase Vorläufer (78%), *P. sapidus*	↓	↑
126-05	Serinprotease (75%), *X. campestris*	–	–
126-06	Laccase Untereinheit POXA 3a/b, *P. ostreatus* (83%)	–	–
126-07	≠	↓	↑
126-08	≠	–	–
126-09	Phosphotidylglycerol spezifische Phospholipase (74%), *T. stipitatus*	–	–
126-10	Alkoholoxidase (75%), *P. glucozyma* und *P. trehalophila*	↓	↑
126-11	Peptidyl-Lys Metalloendopeptidase (93%), *P. ostreatus*	–	–
126-12	Peptidasen (77%), *V. vulnificus*	↑	–
126-13	Methanoldehydrogenase (66%), *Acinobacter. sp.*	–	nd
126-14	Serin/Threonin-Kinase (75%), *O. sativa*	–	–
126-15	≠	nd	nd
126-16	Laccase 2 (76%) aus *P. sapidus*	nd	nd
126-17	Laccase (90%) aus *P. sapidus*	–	–
126-18	≠	↑	–

126-19	≠	–	–
126-20	Peroxidase (100%), *L. plantarum*	–	nd
126-21	Laccase 2 (85%) aus *P. sapidus*	–	–
126-22	≠	↓	↑
126-23	≠	nd	↓
126-24	extrazelluläre Dioxygenase (74%), *A. flavus*	–	↓
126-25	Aldehydreduktase II (100%), *A. fumigatus*	–	–
126-26	Glycosid Hydrolase (83%), *L. bicolor*	–	↑
126-27	Xanthophyllester-Lipase Vorläufer (72%), *L. bicolor*	–	–
126-28	≠	↑	↓
126-29	Laccase Untereinheit POXA 3a/b, (84%), *P. ostreatus*	–	–
126-30	Aldehydreduktase II (88%), *A. fumigatus*	nd	nd

2.2.2.4 Kinetische Analyse von Submerskulturen mit Rapsstroh

Für die kinetischen und massenspektrometrischen Untersuchungen wurden Kulturüberstände aus Submerskulturen, wie unter (4.7.5.2) beschrieben, vorbereitet und dem Projektpartner Protagen AG zur Verfügung gestellt.

Für jeden Projekttag wurden zweidimensionale Elektropherogramme der Proben angefertigt. Die isoelektrischen Punkte der Proteine an den verschiedenen Kulturtagen lagen in einem pI-Bereich von $4 \leq pI \leq 8$ und einem Molekulargewichtsbereich von 10 – 170 kDa (Abbildung 70).

Für die Identifizierung einzelner Proteine mittels Massenspektrometrie wurde eine Mischprobe der Einzelzeitpunkte erstellt, um alle vorkommenden Spots in

einem Gel zu detektieren (Abbildung 71). Aus der Mischprobe wurden insgesamt 214 Spots vermessen.

Die erhaltenen Peptiddaten eines Proteinspots wurden zunächst mit dem nicht annotiertem Genom des Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* mittels BLAST-Analyse einem Protein zugeordnet. Danach wurden sämtliche Peptide eines Spots über ein Alignment dem gefundenen Protein zugeordnet. Das im *Pleurotus ostreatus* Genom gefundene Protein wurde parallel mittels Datenbanksuchen über NCBI BLAST (pBLAST Stand: 15.04.2010) und PFAM (http://pfam.sanger.ac.uk/; Stand: 15.04.2010) identifiziert. Die zugehörigen Peptiddaten sind im Anhang aufgelistet (6.4).

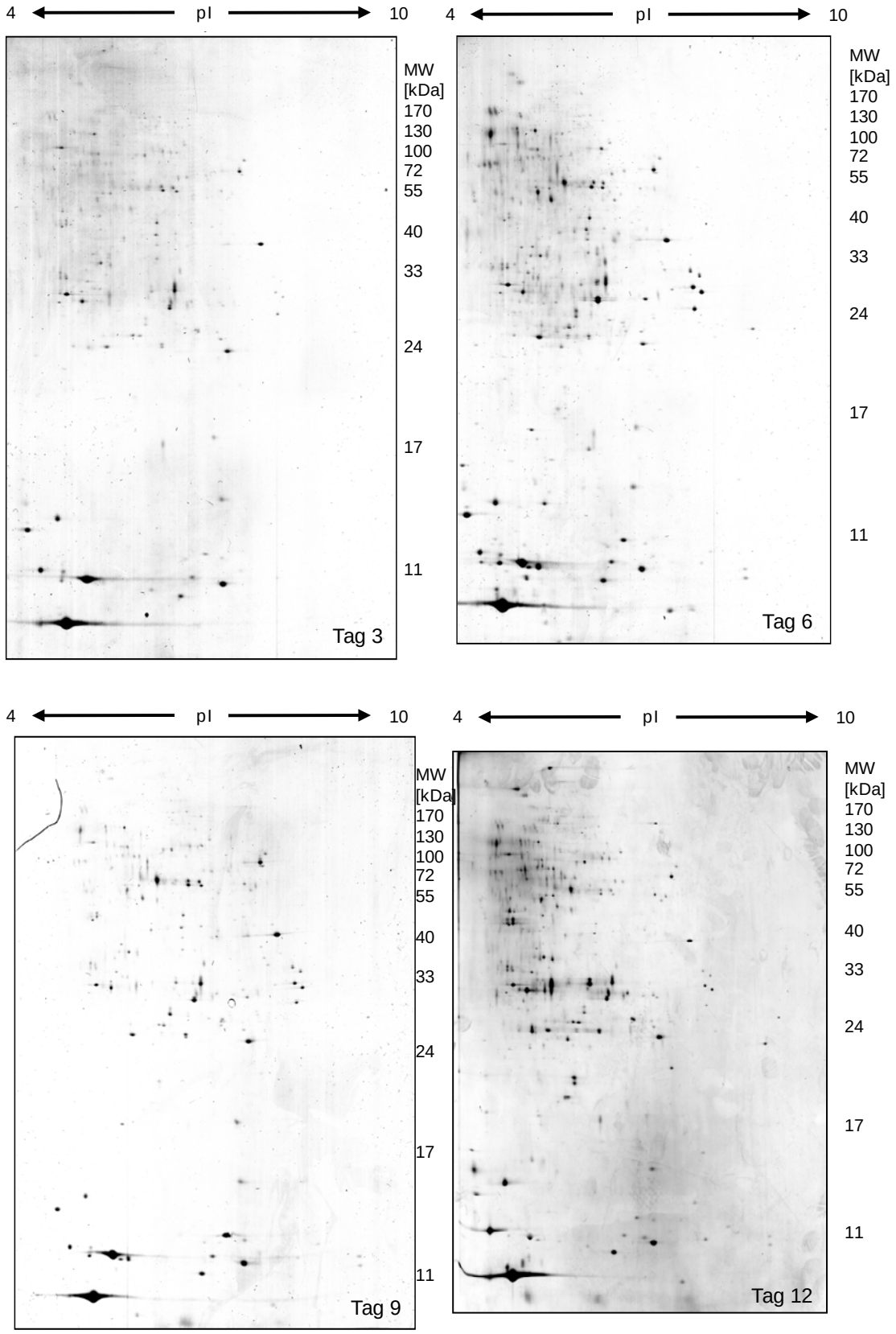


Abbildung 70: zweidimensionale Elektropherogramme extrazellulärer Enzyme von *Pleurotus sapidus* Submerskulturen nach 3, 6, 9 und 12 Kulturtagen.

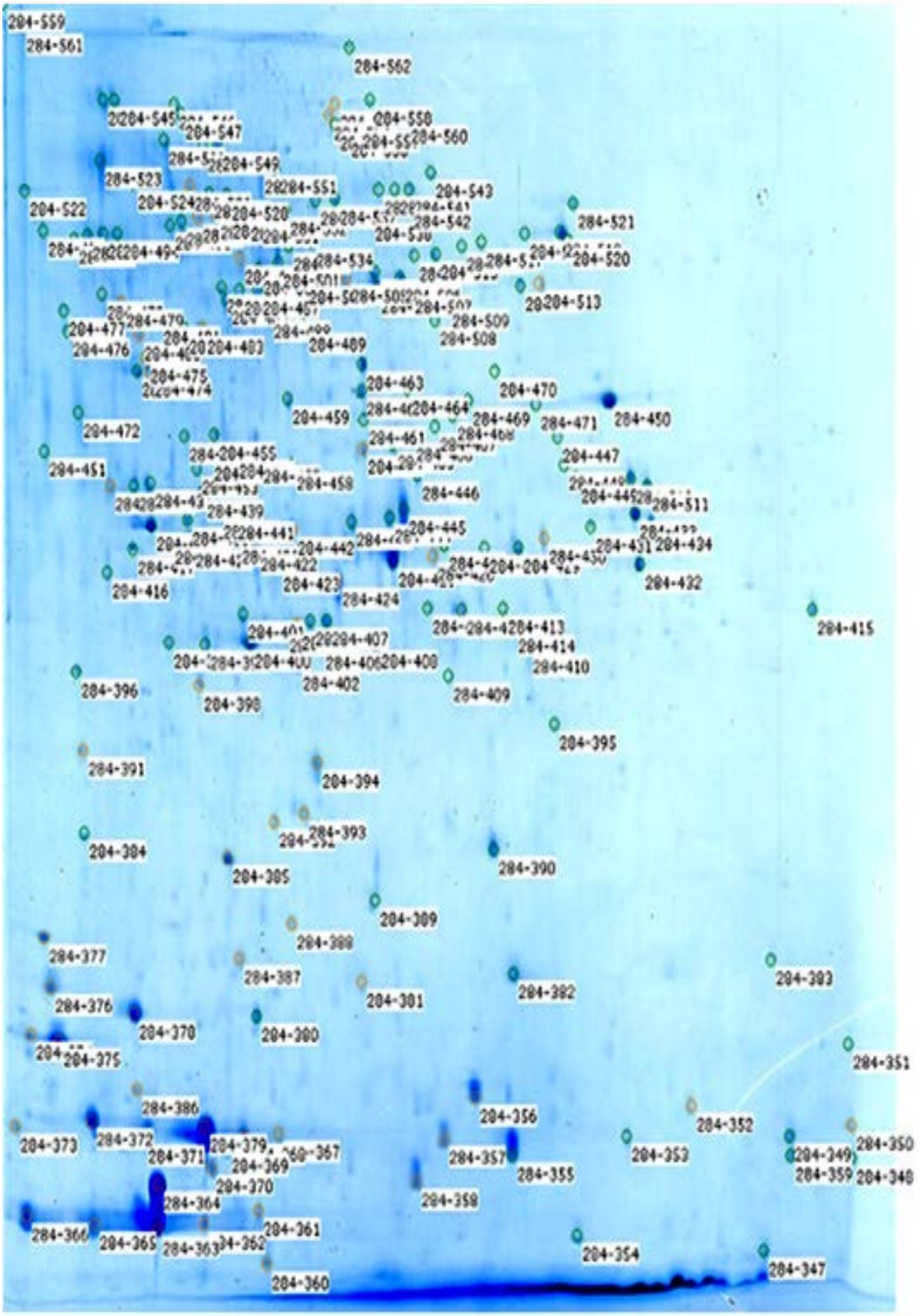


Abbildung 71: Zweidimensionales Elektropherogramm mit allen mittels MALDI-MS/MS analysierten Proteinen. Insgesamt wurden 214 Proteinspots vermessen.

Nur ein kleiner Anteil (10%) der Proteine konnte so nicht identifiziert werden. Die in der Mischprobe enthaltenen 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 (Abbildung 72). Identifiziert wurden daneben Lyasen und zelluläre Hilfsenzyme wie zum Beispiel Ubiquitin oder Cyclophilin.

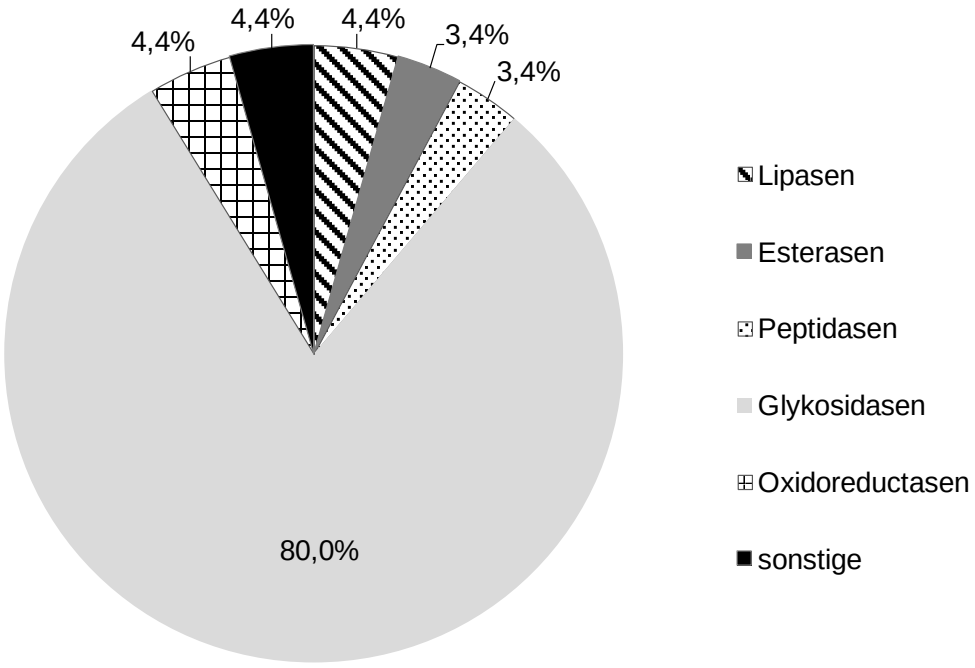


Abbildung 72: schematische Darstellung der Zuordnung der identifizierten Proteine aus der 2D-Elektrophorese zu verschiedenen Proteinfamilien; hellgrau: Glycosidasen; kariert: Oxidoreduktasen; schwarz: sonstige Enzyme; schraffiert: Lipasen; grau: Esterasen; gepunktet: Peptidasen

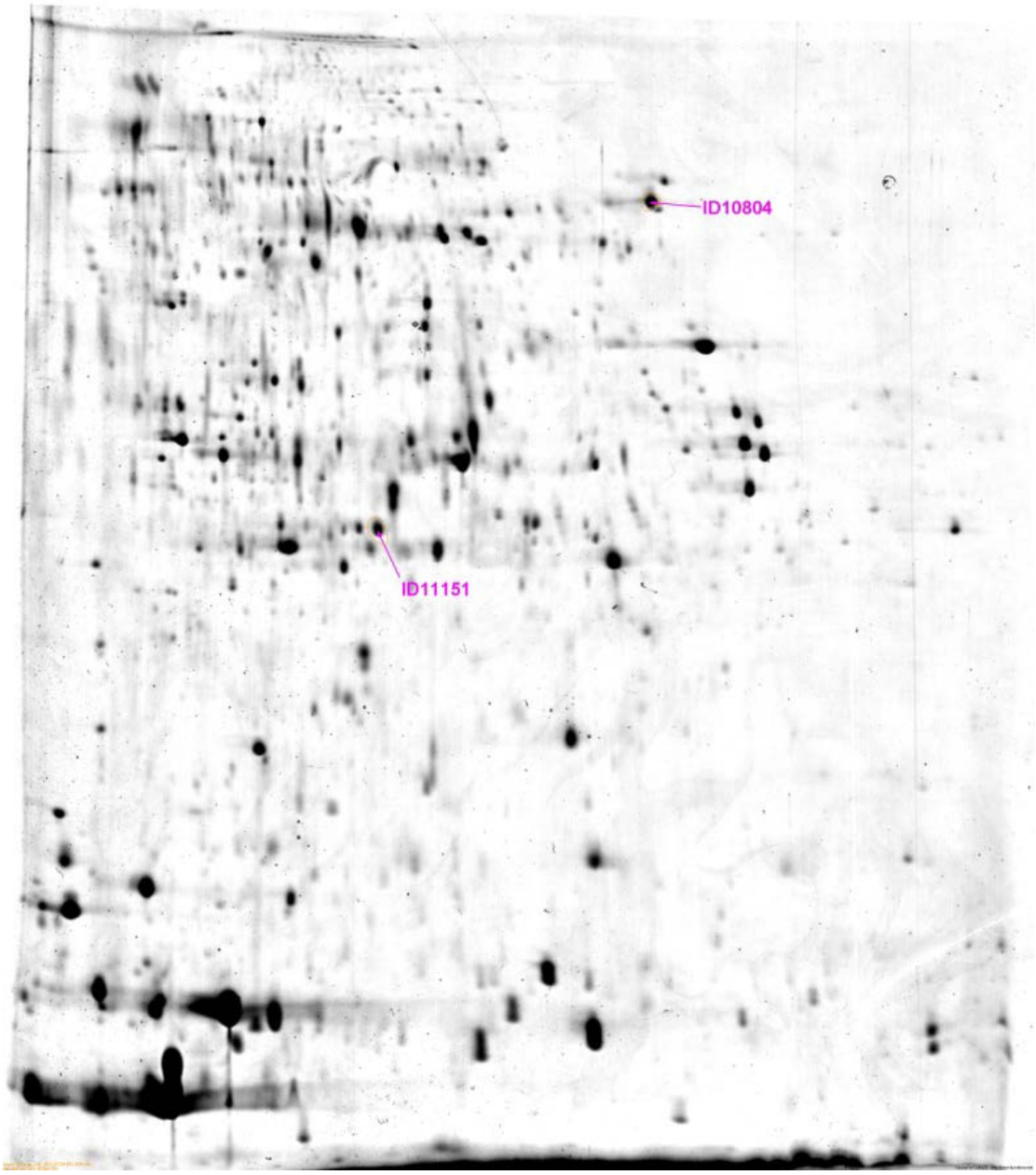
Unter den 214 untersuchten und identifizierten Proteinspots befanden sich einige Proteine (17%), die dem gleichen Gen im *Pleurotus ostreatus* Genom zuzuordnen sind. Die Proteine lagen zum Teil in bis zu acht einzelnen Spots vor (Tabelle 8).

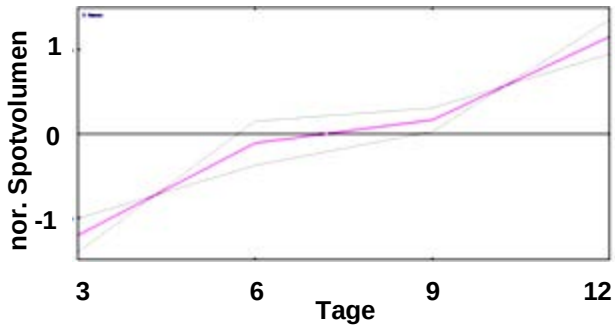
Tabelle 8: Zuordnung einzelner Proteine zu einem *Pleurotus ostreatus* Gen und deren Verteilung in den Proteinspots der zweidimensionalen Elektrophorese

Identifiziertes Protein	Genlokus	Zusammengehörige Spots
Carotinoidester Lipase Vorläufer	116339	351, 459, 514, 536-538,
hyp. Protein – Pectat Lyase	116196	389, 445, 465-466
Laccase 1	116143	396, 409, 559
hyp. Protein – GDSL ähnliche Lipase	156060	397, 420
hyp. Protein – Glycosid Hydrolase Familie 61	122311	406, 408
hyp. Protein - Rhamnogalacturonase	128966	411, 518-520
hyp. Protein – Glycosid Hydrolyse Familie 28	110973	414, 533-534
Kohlenhydrat Esterase Familie 8 Protein	116926	415, 450, 471
hyp. Protein – Pectat Lyase	67014	417, 418
Endoglucanase	64582	423, 485
hyp. Protein – Pectat Lyase	83989	425, 429, 433-434, 446, 458, 510-511
hyp. Protein	50696	427, 539-540
Peptidase 1	87575	440-441
hyp. Protein - Rhamnogalacturonase	58117	467, 512
Glycosid Hydrolase Familie 72	115581	478, 544-545
Acetyl-Xylan Esterase	117351	489, 500-502
hyp. Protein – Aldose Epimerase	113478	503, 506
Galactan 1,3-beta-Galactosidase	54867	504, 507
Phenoloxidase 2	81117	522, 524

Eine relative, bioinformatische Quantifizierung der Spots erlaubte es außerdem, für jedes Protein in der Probe eine eigene Kinetik über den Kulturverlauf zu erstellen. Um den Konzentrationsverlauf der einzelnen Proteinspots zu bestimmen, wurde für jeden der Spots eine Kinetik (Spotintensität vs. Zeit) erstellt. Da viele Spots gleiche oder ähnliche Kinetiken aufwiesen, wurden Spots mit einer ähnlich verlaufenden Kinetik über eine Clusteranalyse zusammengefasst. Durch die Analysesoftware (Delta2D, Definiens, Deutschland) wurden hierbei 7 verschiedene Cluster erstellt. Ein sehr geringer Teil der Proteine wies einen stetigen Anstieg der Spotintensität auf. Die anderen Spotintensitäten folgten einer Wellenbewegung. Die identifizierten Proteine wurden in einem weiteren Schritt den sieben verschiedenen Clustern zugeordnet (Abbildung 73).

Cluster 1

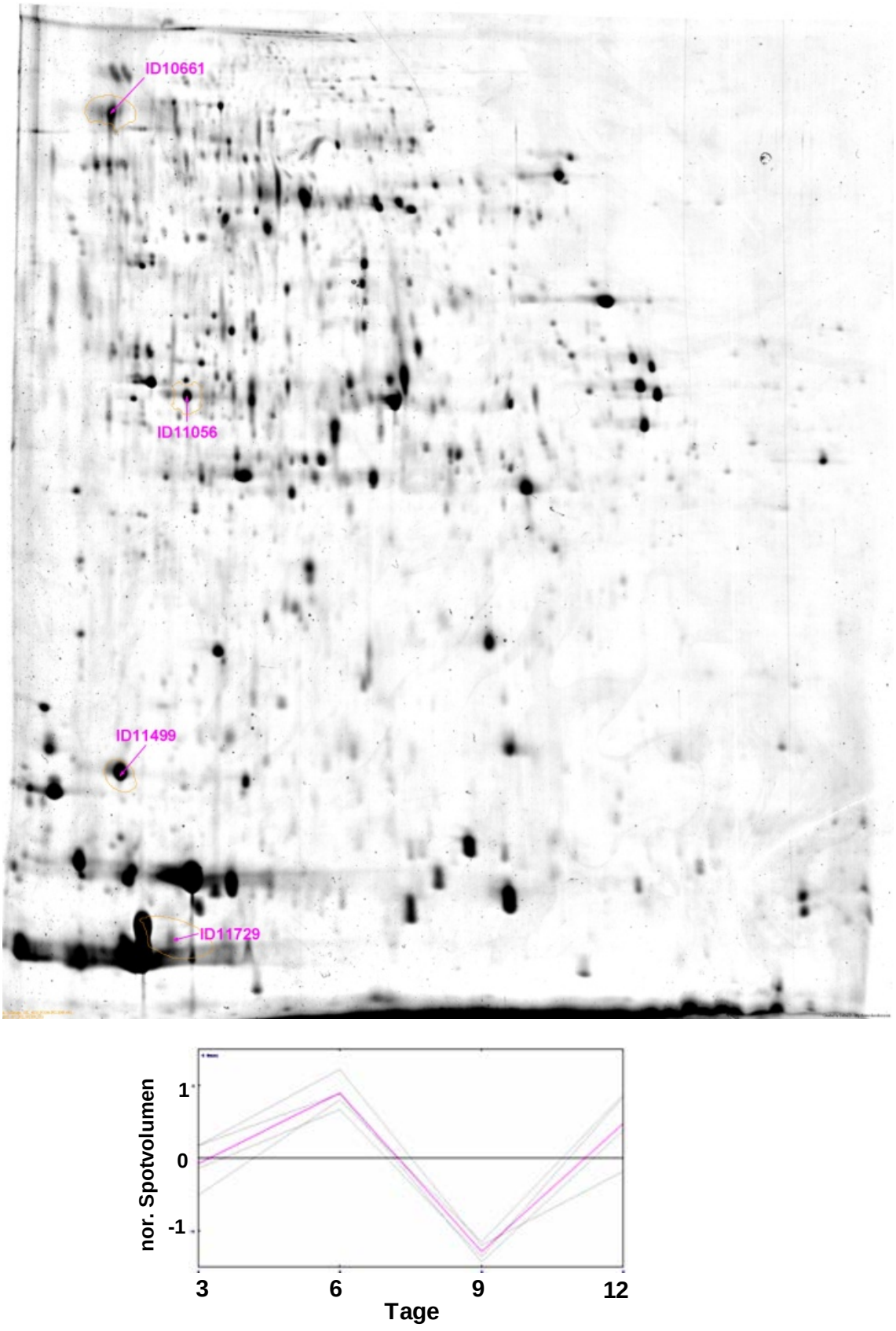




ID10804: Rhamnogalacturonase B, n-terminal (pfam09284)

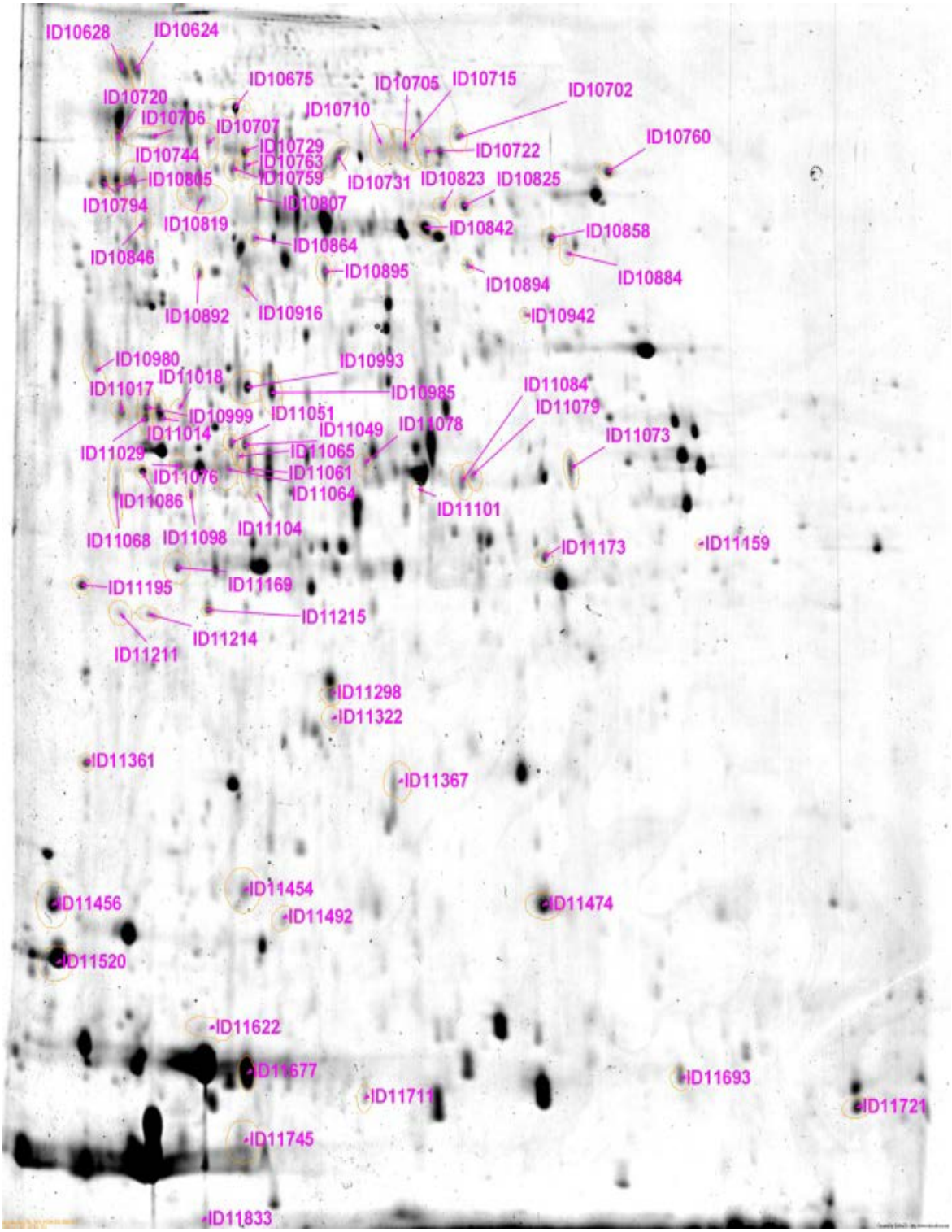
ID11781: Endocellulase [*Polyporus arcularius*]

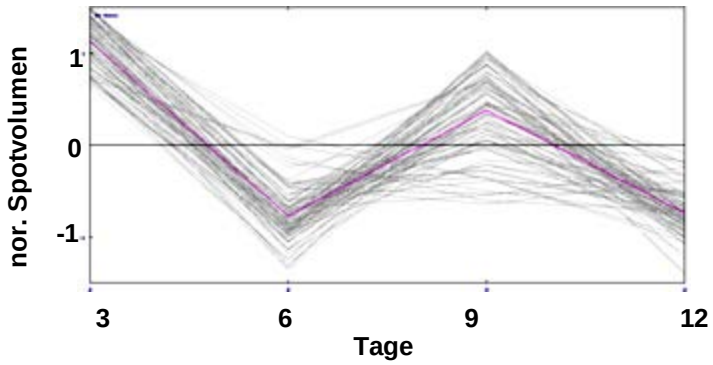
Cluster 2



ID10661: Cellulose 1,4-beta-Cellobiosidase Vorläufer [*Pleurotus sp. „Florida“*]

Cluster 3


ID10628
ID10624
ID10675
ID10705
ID10715
ID10720
ID10702
ID10710
ID10706
ID10707
ID10760
ID10729
ID10744
ID10722
ID10763
ID10805
ID10759
ID10731
ID10823
ID10825
ID10794
ID10807
ID10819
ID10842
ID10858
ID10846
ID10864
ID10895
ID10894
ID10884
ID10892
ID10916
ID10942
ID10980
ID10993
ID11018
ID11017
ID10985
ID11084
ID10999
ID11051
ID11079
ID11014
ID11049
ID11078
ID11073
ID11029
ID11065
ID11076
ID11061
ID11086
ID11064
ID11101
ID11068
ID11098
ID11104
ID11173
ID11159
ID11195
ID11169
ID11215
ID11214
ID11211
ID11298
ID11322
ID11361
ID11367
ID11454
ID11456
ID11474
ID11492
ID11520
ID11622
ID11677
ID11693
ID11711
ID11721
ID11745
ID11833



ID10675: Arylalkoholoxidase Vorläufer [*Pleurotus pulmonarius*]

ID10731 und

ID10823: Carotinoidester Lipase Vorläufer [*Pleurotus sapidus*]

ID10794 und

ID10805: Cellobiohydrolase II [*Lentinus sajor-caju*]

ID10705, ID10715, ID11014 und

ID11086: Pectat Lyase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID10760: Kupferradikal Oxidase [*Phanerochaete chrysosporium*]

ID10993: Endoglucanase [*Volvariella volvacea*]

ID10985: Extrazelluläre Esterase [*Xanthomonas campestris pv. campestris str*. B100]

ID10729: Glykosid Hydrolase Familie 15 Protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

ID11029: Glykosid Hydrolase Familie 16 Protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

ID10825: Glykosid Hydrolase Familie 5 Protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

ID10624 und

ID10628: Glykosid Hydrolase Familie 72 Protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

ID11061: Hypothetische FAD abhängige Oxidoreduktase [*Postia placenta* Mad-698-R]

ID11195: Laccase [*Pleurotus ostreatus*]

ID10706: Laccase Vorläufer [*Pleurotus sapidus]*

ID10744: Mannanase [*Armillariella tabescens*]

ID11051: Peptidase 1 [*Pleurotus ostreatus*]

ID11361: POXA3a Laccase Untereinheit [*Pleurotus ostreatus*]

ID10942 und

ID10858: Rhamnogalacturonase B

ID11068: Thaumatin ähnliches Protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

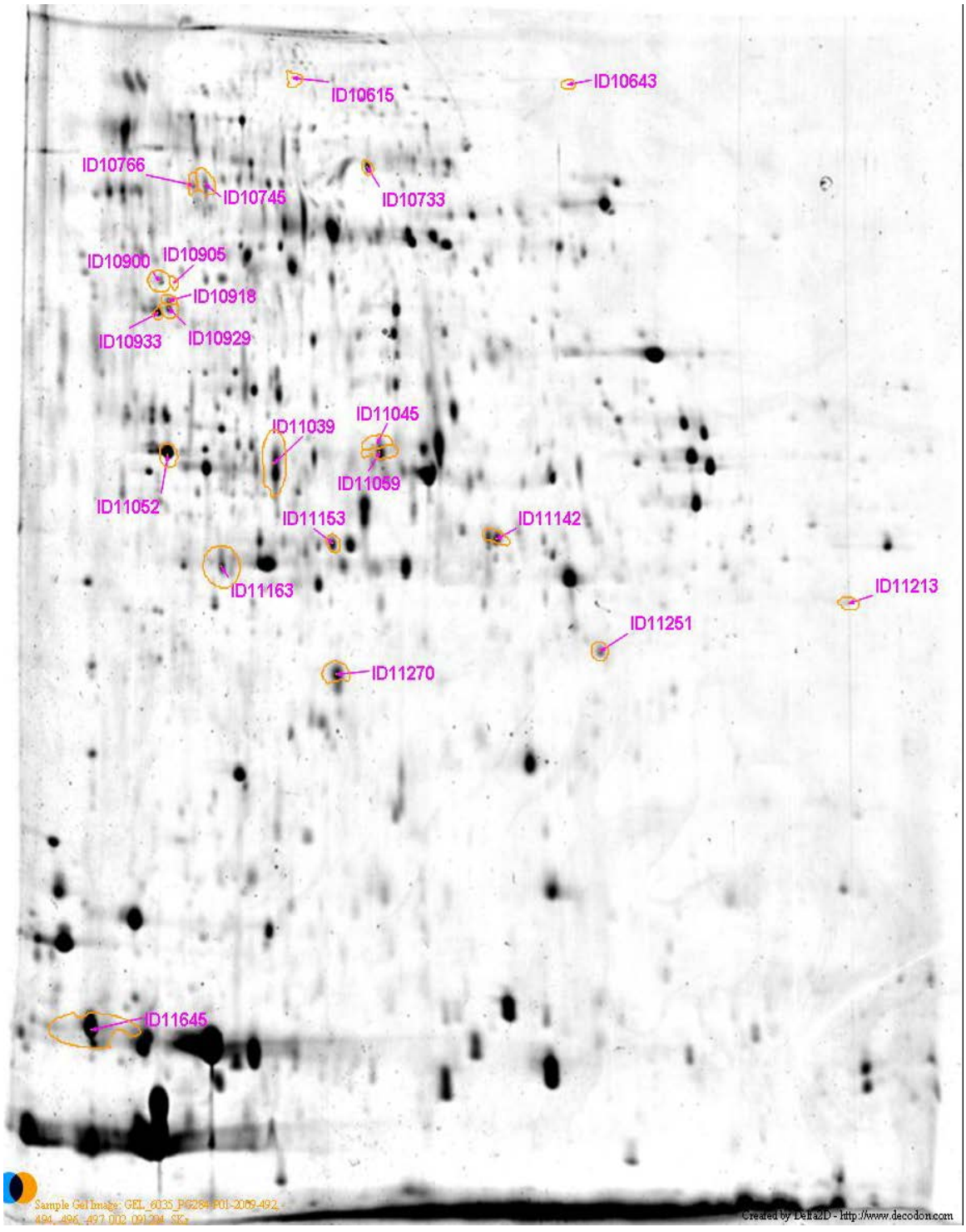
ID10894: 3-Carboxymuconat Cyclase [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

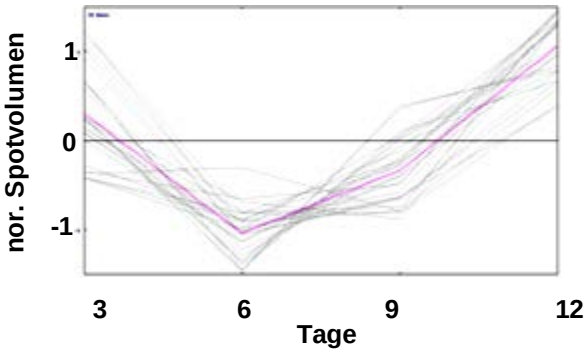
ID10763: Serin Carboxypeptidase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID10842: Aldose 1-Epimerase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID10702: Alpha-L-Arabionfuranosidase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

Cluster 4


ID10615
ID10643
ID10766
ID10745
ID10733
ID10900
ID10905
ID10918
ID10933
ID10929
ID11039
ID11045
ID11059
ID11052
ID11153
ID11142
ID11163
ID11213
ID11251
ID11270
ID11645
Created by Delta2D - http://www.decodon.com



ID11142: Arabinosidase [*Armillariella tabescens*]

ID10733: Carotinoidester Lipase Vorläufer [*Pleurotus sapidus*]

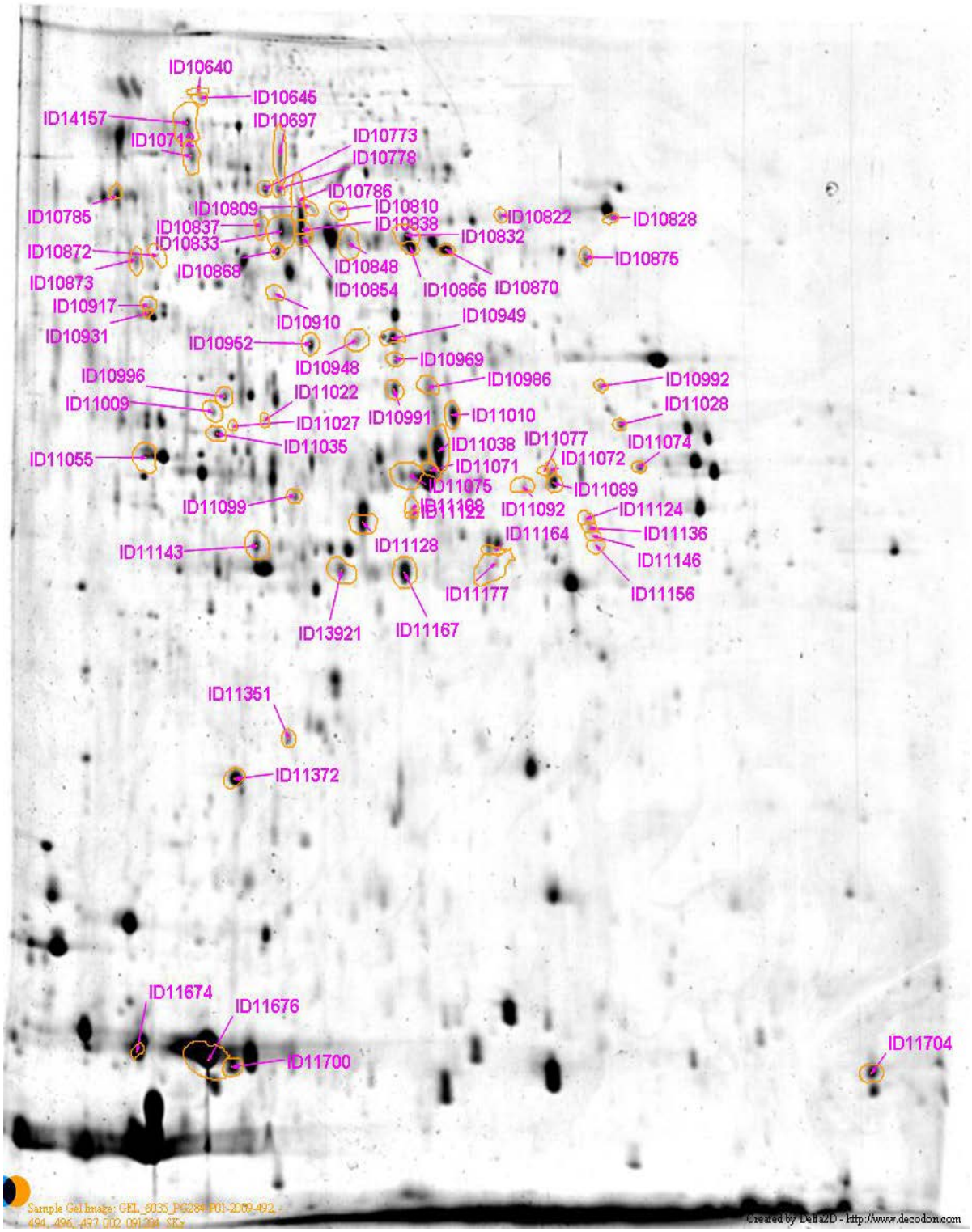
ID11059: Glykosid Hydrolase Familie 43 Protein [*Coprinopsis cinerea okayama*]

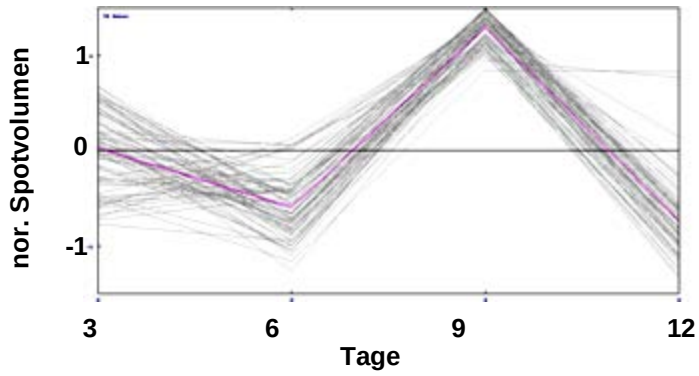
ID11052: Pectat Lyase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID10766: Serin Carboxypeptidase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID10933: Exoglucanase 3

Cluster 5


ID10640
ID10645
ID14157
ID10697
ID10712
ID10773
ID10778
ID10786
ID10785
ID10809
ID10810
ID10838
ID10822
ID10828
ID10837
ID10833
ID10832
ID10872
ID10868
ID10848
ID10875
ID10873
ID10854
ID10866
ID10870
ID10917
ID10910
ID10949
ID10931
ID10952
ID10948
ID10969
ID10996
ID10986
ID10992
ID11022
ID11009
ID11028
ID10991
ID11010
ID11027
ID11077
ID11074
ID11038
ID11035
ID11072
ID11055
ID11071
ID11075
ID11089
ID11099
ID11092
ID11124
ID11164
ID11136
ID11143
ID11128
ID11146
ID11177
ID11156
ID13921
ID11167
ID11351
ID11372
ID11674
ID11676
ID11704
ID11700
Created by Delta2D - http://www.decodon.com



ID10833 und

ID10838: Acetyl-Xylan Esterase [*Volvariella volvacea*]

ID14157: Arylalkoholoxidase Vorläufer [*Pleurotus eryngii*]

ID10785 und

ID11009: Cellobiohydrolase II [*Lentinus sajor-caju*]

ID10952: Cellobiohydrolase II-I [*Volvariella volvacea*]

ID10949 und

ID10969: Endo-1,6-alpha-Mannosidase [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

ID10996: Endoglucanase [*Volvariella volvacea*]

ID10866 und

ID10870: Galactan 1,3-beta-Galactosidase [*Phanerochaete chrysosporium*]

ID10640 und

ID10645: Glyoxal Oxidase [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

ID10868: Hypothetische FAD abhängige Oxidoreduktase [*Postia placenta* Mad-698-R]

ID10828: Rhamnogalacturonase B, N-terminal [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID10986, ID11010, ID11031, ID11071 und

ID11089: Pectat Lyase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID11035, ID11167 und

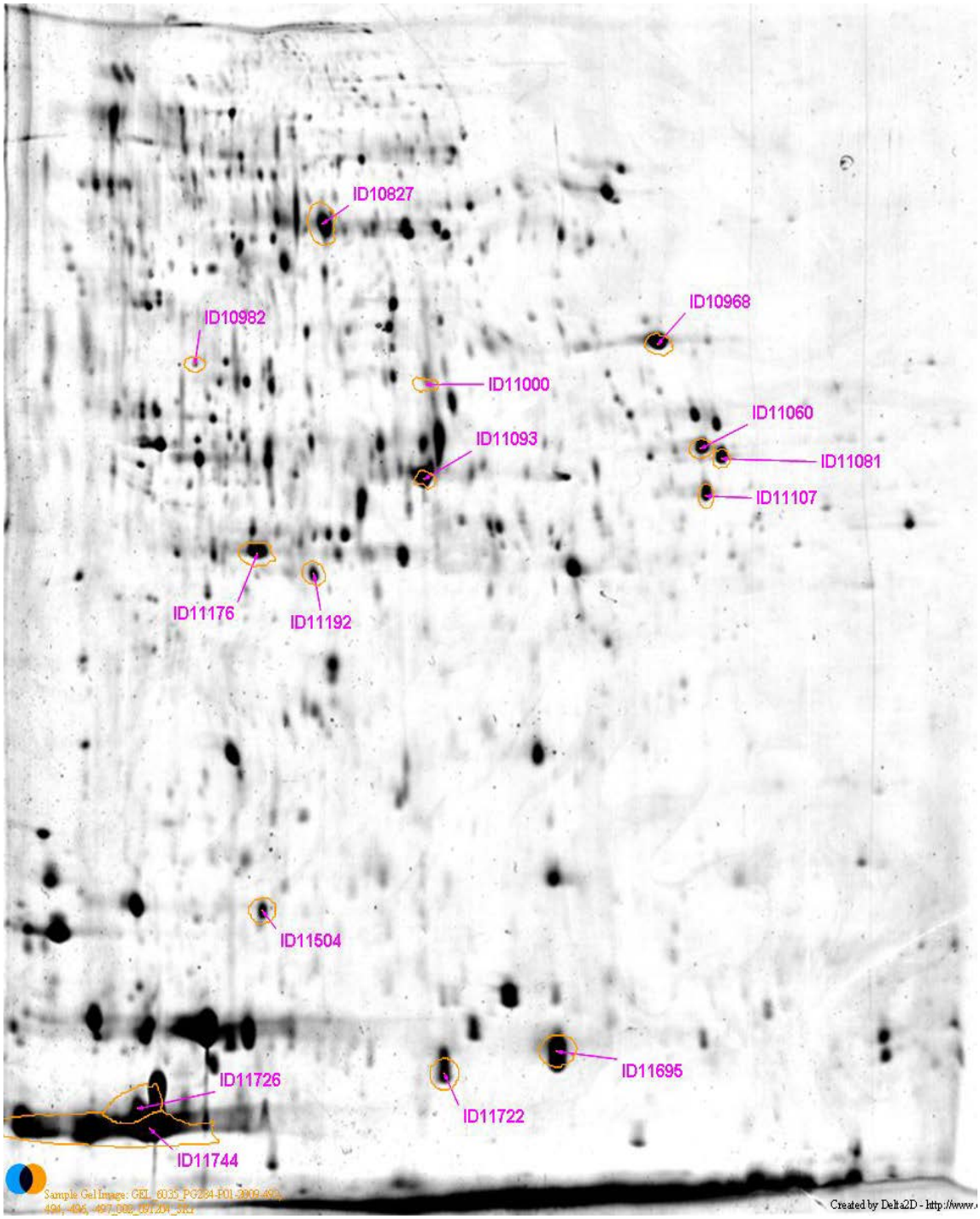
ID13921: Glykosid Hydrolase Familie 61 Protein [*Moniliophthora perniciosa* FA553]

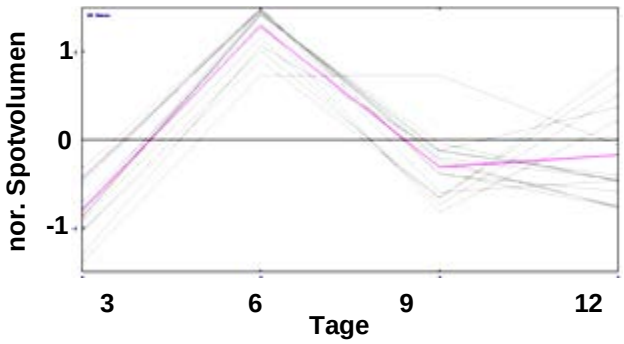
ID10823: Aldose 1-Epimerase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID10822: Peptidase M28 [*Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP]

ID10809: Polygalacturonase Vorläufer [*Pyrenophora tritici-repentis* Pt-1C-BFP]

Cluster 6


ID10827
ID10982
ID10968
ID11000
ID11060
ID11093
ID11081
ID11107
ID11176
ID11192
ID11504
ID11695
ID11726
ID11722
ID11744
Created by Delta2D - http://www.



ID10827: Acetyl-Xylan Esterase [*Volvariella volvacea*]

ID10968: Kohlenhydrat Esterase Familie 8 Protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

ID10982: Cellobiohydrolase II [*Lentinus sajor-caju*]

ID11176: Glykosid Hydrolase Familie 12 Protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

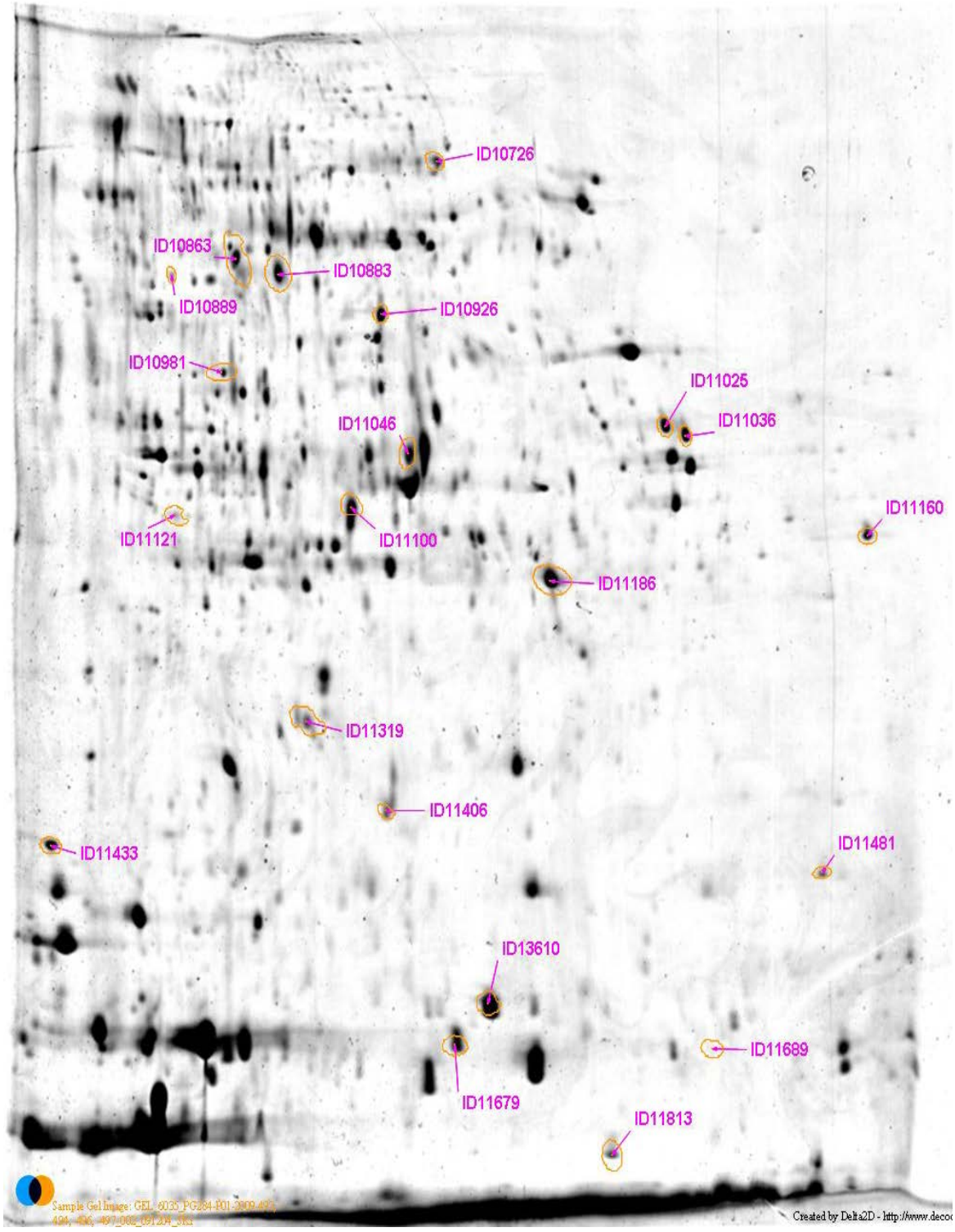
ID11060, ID11081 und

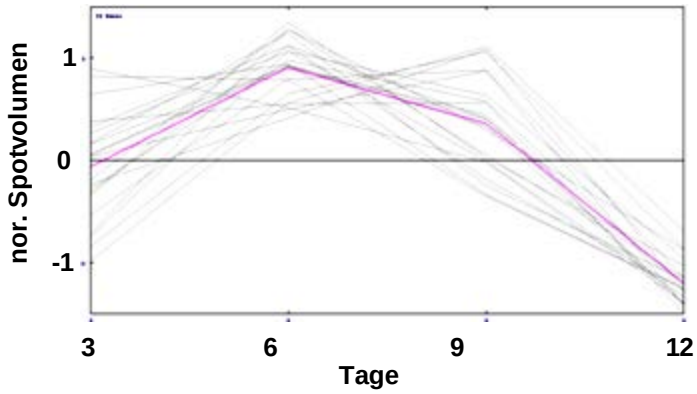
ID11093: Pectat Lyase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID11192: Glykosid Hydrolase Familie 61 Protein [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID11107: Peptidase 1 [*Pleurotus ostreatus*]

Cluster 7


ID10726
ID10863
ID10883
ID10889
ID10926
ID10981
ID11025
ID11036
ID11046
ID11160
ID11121
ID11100
ID11186
ID11319
ID11406
ID11433
ID11481
ID13610
ID11689
ID11679
ID11813
Created by Delta2D - http://www.deco



ID11160: Kohlenhydrat Esterase Familie 8 Protein [*Laccaria bicolor* S238N-H82]

ID10981: Cellobiohydrolase II [*Lentinus sajor-caju*]

ID10726: Cip2 [*Hypocrea jecorina*]

ID10889: Endoglucanase [*Phanerochaete chrysosporium*]

ID10863: Endoglucanase [*Volvariella volvacea*]

ID11025 und

ID11036: Pectat Lyase [*Coprinopsis cinerea okayama*]

ID11046: Aminopeptidase [*Moniliophthora perniciosa* FA553]

ID10926: Fungalysin Metallopeptidase (M36) [*Moniliophthora perniciosa* FA553]

ID11481: mögliches Cyclophilin [*Pleurotus sp. 'Florida*']

ID11813: Ubiquitin [*Clavispora lusitaniae* ATCC 42720]

Abbildung 73: Zusammenfassung der Lage der 2D Gelspots, Kinetik und Proteinidentifizierung der „Cluster“ 1 bis 7; in der Kinetik sind alle einzelnen Spots eines Clusters zusammengefasst und mit einer Tendenz (rosa) versehen; nicht aufgeführte Spotnummern wurden nicht identifiziert

In der Clusteranlase der Proteinspots wurden Laccasen nur in einem der Cluster nachgewiesen; dies korrelierte mit dem Verlauf der Enzymkinetik (2.2.1.5). Cellulasen wurden in allen sieben Clustern identifiziert (Abbildung 73). Peptidasen und Esterasen wurden in den Clustern drei bis sieben detektiert (Abbildung 73).

Einzelne Proteine wurden in mehreren Spots detektiert (Tabelle 8), ebenso wurden sie mehereren Spotkinetiken zugeordnet (Tabelle 9). Eine Übersicht ist beispielhaft für das Protein Pectat Lyase gezeigt (Abbildung 74).

Tabelle 9: Zusammenfassung der identifizierten Proteine und deren Vorkommen in den unterschiedlichen Clustern

Identifiziertes Protein	**Identifiziert in:**
Carotinoidester Lipase Vorläufer	Cluster 2 und 3
Pectat Lyase	Cluster 3 bis 7
Glycosid Hydrolase Familie 61	Cluster 5 und 6
Rhamnogalacturonase	Cluster 1, 3 und 5
Endoglucanase	Cluster 3, 5 und 7
Peptidase 1	Cluster 3 und 6
Cellobiohydrolase	Cluster 3, und 5 bis 7
Acetyl-Xylan Esterase	Cluster 5 und 6

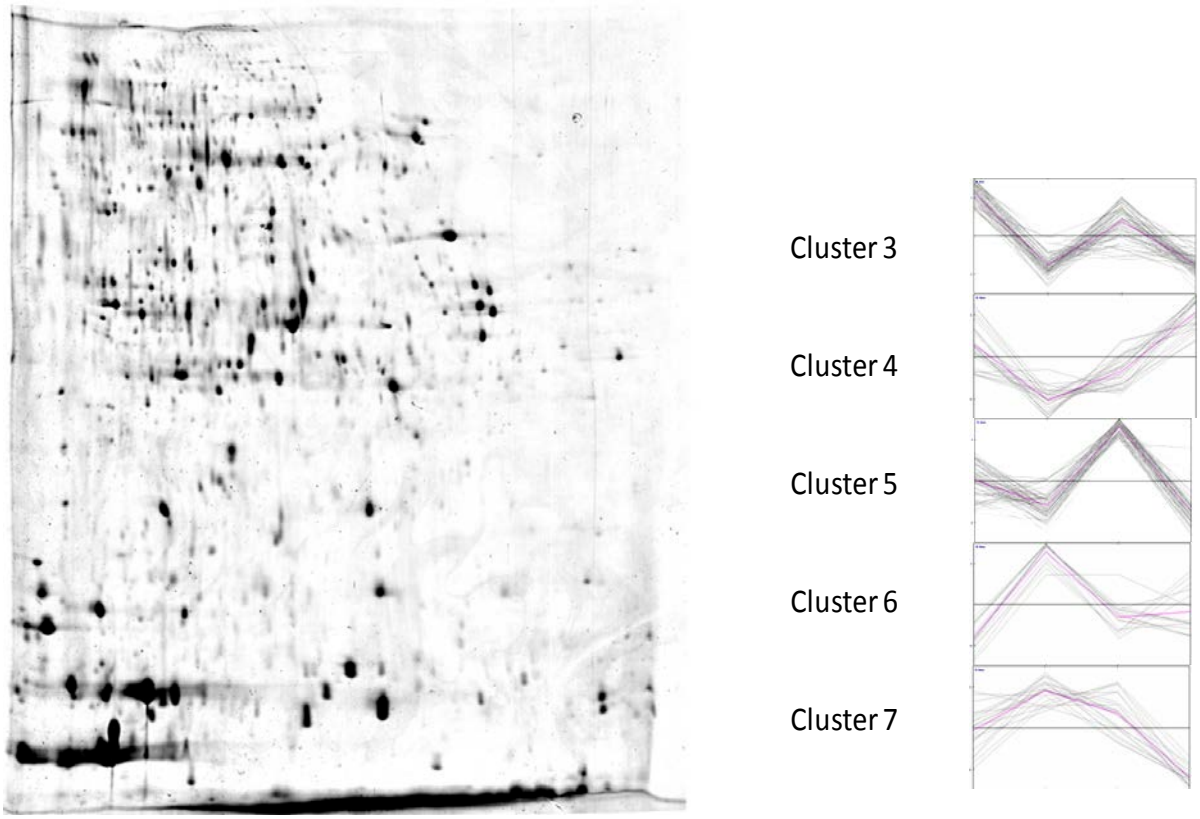


Abbildung 74: Zusammenfassung der Lage der 2D Gelspots und Kinetik der Pectat Lyase

3 Diskussion

Die Entwicklung umweltschonender Verarbeitungsmöglichkeiten des nachwachsenden Rohstoffs Lignocellulose steht derzeit im Fokus der Forschung. Lignocellulosen sind im Gegensatz zu den fossilen Rohstoffen in nahezu unerschöpflicher Menge verfügbar.

In Lignocellulosen liegen Lignin, Cellulose und Hemicellulose als komplexes, dreidimensionales Netzwerk vor. Die Jahresbiosynthese dieses komplexen Moleküls wird auf 200 Milliarden Tonnen geschätzt (Strasburger *et al*. 2002).
Ein Beispiel für weitgehend ungenutzte Lignocellulosen sind die strohähnlichen Materialien, wie trockene Stängel und Blätter von Getreide, Hülsenfrüchten und Faserpflanzen. Nach Abzug des Strohbedarfs für die energetische Nutzung entstehen hier fünf bis zehn Millionen Tonnen ungenutzter Lignocellulose pro Jahr (Abbildung 75). Bei Ölsaatenstroh, zum Beispiel Raps, stehen ca. sieben Millionen Tonnen ungenutzter Lignocellulose für eine weiterführende Bearbeitung zu Verfügung (Kaltschmitt *et al.* 2009).

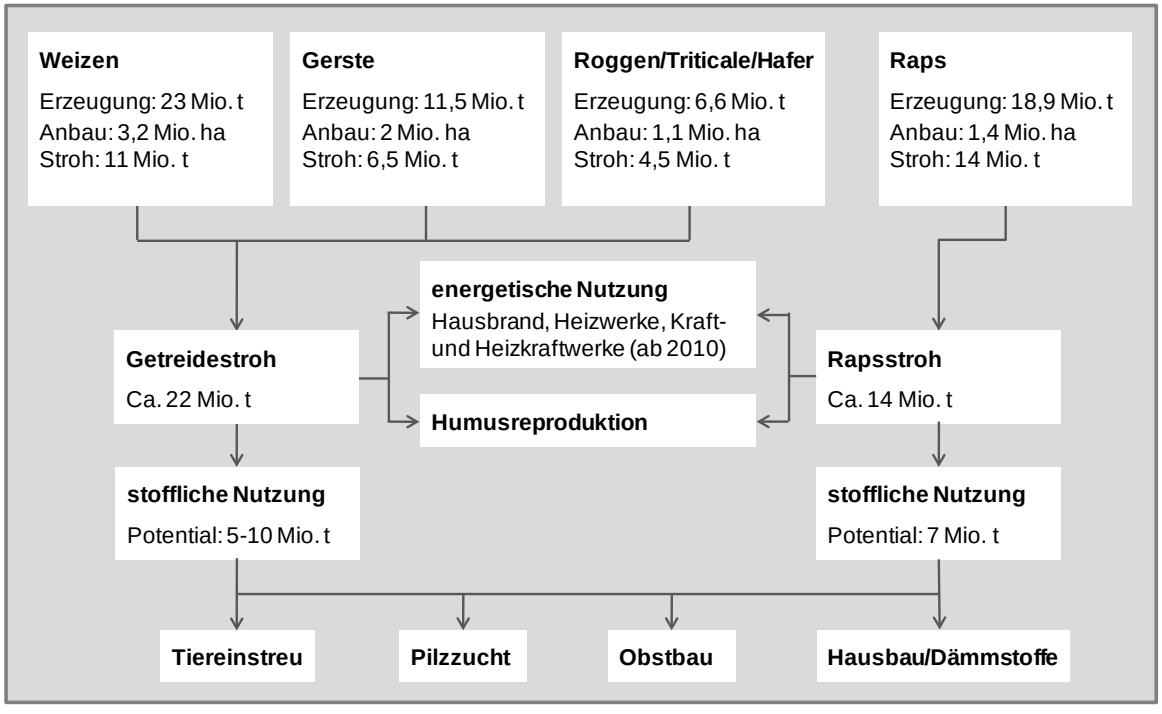


Abbildung 75: Übersicht über die Erzeugung von Getreide, Anbaufläche und potentieller Strohertrag in Deutschland modifiziert nach Kaltschmitt *et al.* 2009 und Carus *et al*. 2010

Für die stoffliche Verwendung von Lignocellulose als erneuerbarem Rohstoff sind bis jetzt neben der Verbrennung und Verkohlung nur begrenzt Alternativen nutzbar. Eine stoffliche Nutzung von Lignocellulosen erfolgt derzeit in den Bereichen Biokraftstoffproduktion, Polymerwerkstoffe, Bio-basierte Kunststoffe und Chemiefasern (Holladay *et al.* 2007).

Eine weitere und häufig genutzte alternative Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen, wie zum Beispiel Energiepflanzen und landwirtschaftlichen Abfällen, ist die Produktion von Biogas. Die derzeit betriebenen Biogasanlagen beruhen überwiegend auf dem Prinzip der Nassfermentation. Dabei ist der Einsatz von festen Substraten nur in begrenztem Umfang möglich. Bei der Trockenvergärung kann dagegen stapelbare Biomasse eingesetzt werden. Es lassen sich Biomassen mit Trockensubstanzgehalten von 20 bis 40% vergären. Zu den einsetzbaren Substraten gehören Festmist, nachwachsende Rohstoffe (wie Mais-, Getreide- und Grassilage), Ernterückstände (wie Stroh und Getreideausputz) sowie Grünschnitt und Bioabfälle (Weiland 2010). Derzeit wird eine Vielzahl von Verfahrensvarianten eingesetzt, die grundsätzlich in kontinuierliche und diskontinuierliche Systeme unterteilt werden können. Durch den Einsatz moderner Fermentationssysteme kann ein theoretischer Umsatz von ~ 60% des in Lignocellulosen enthaltenen Kohlenstoffs erreicht werden (Cherubini und Stromman 2010). Die Gärrückstände der Fermenter enthalten noch bis zu 22% Hemicellulose, 10% Cellulose und 13% Lignin (Isikhuemhen und Mikiashvilli 2009), die nicht in Biogas umgewandelt werden. Aussichtsreich ist hier eine wechselnde Inkubation von ligninabbauenden Mikroorganismen wie Basidiomyceten und Methan-produzierenden Bakterien, da Lignin in einer anaeroben Fermentation nicht in Biogas umgewandelt werden kann (Hilber 1982).

Aus diesem Grund wurde neben Rapsstroh auch der Rückstand einer Biogasanlage als Kohlenstoffquelle in den Kulturen von *Pleurotus sapidus* verwendet.

Die Biogasanlage (EnviTec Biogas, Lohne) wird mit Gülle, Maissillage, Hühnermist, Ganzpflanzensillage und Maisspindeln inklusive Körnern beschickt. Die Anlage wird einstufig im mesophilen Bereich gefahren und der Gärrest anschließend getrocknet. Die hier beschriebene Anlage ist vergleichbar mit einer

bei Sensel *et al.* 2009 untersuchten Anlage, die mit Rindergülle, Maissillage und Getreide betrieben wird. Das Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis der verwendeten Substrate liegt bei 58:1 für das Rapsstroh und 10:1 für den Rückstand einer Biogasanlage (Tabelle 10). Das Verhältnis Kohlenstoff:Stickstoff liegt im verwendeten Vollmedium (SNL-Medium, 4.6.1.1) bei 13:1 und ist somit in der gleichen Größenordnung wie der Rückstand einer Biogasanlage.

Die Sekretome beider Kulturen wurden abhängig vom Kultursystem und der Kohlenstoffquelle untersucht.

Tabelle 10: Literaturangaben des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes der verwendeten Substrate

	Rapsstroh	**Rindergülle/Maissillage/Getreide**
Kohlenstoffgehalt [% TM]	47	41
Stickstoffgehalt [% TM]	0,8	4,2
Literatur	Hartmann 2007	Sensel *et al.* 2009

Die wichtigsten Lignocellulose Destruenten finden sich in der Gruppe der Weißfäulepilze. Bisherige Untersuchungen wurden vorwiegend an der Modellspezies *Phanerodontia chrysosporium* durchgeführt (Wymelenberg *et al.* 2005, Ravalason *et al.* 2008). Das lignolytisches System der Pilze aus der Familie der *Pleurotacea*, welches sich signifikant von dem aus *Phanerodontia chrysosporium* unterscheidet (Abbas *et al.* 2005), wurde bisher wenig untersucht (Baldrian *et al.* 2005, Zorn *et al.* 2005b).

Die Familie der *Pleurotacea* ist eine der größten Gruppen der kultivierbaren Speisepilze. Die Pilze sind überwiegend in den gemäßigten Temperaturzonen zu finden. Eine evolutionäre Verbindung einzelner Familienmitglieder ist bis heute nicht ausreichend geklärt. *Pleurotus eryngii* beispielsweise weist eine erhöhte Anzahl an Polymorphismen auf und ist genetisch weiter von den anderen Familienmitgliedern entfernt (Zervakis *et al.* 1994). Auch die zellulären Vorgänge und die dafür notwendigen genetischen Vorgänge zur Bildung von Fruchtkörpern sind nicht vollständig bekannt. Einzelne Faktoren, wie der Einfluss von Licht (Lindenfelser *et al.* 1979) und Hydrophobinen (Penas *et al.* 1998) wurden für

Pleurotus ostreatus untersucht. Trotz der vielen unbekannten biologischen Vorgänge gehört die Familie der *Pleurotaceae* zu den am einfachsten zu kultivierenden Pilzen (Hilber 1982). Natürlicherweise wachsen diese Basidiomyceten auf totem Holz wie abgestorbenen Bäumen oder abgefallenen Ästen. Untersuchungen über das Wachstum von *Pleurotus sp*. belegen, dass sie ebenfalls auf Stroh (Lindenfelser *et al.* 1979, Zadrazil 1980, Streeter *et al.* 1982, Kamra und Zadrazil 1986), Stängeln der Baumwolle (Hadar *et al.* 1992) und lignocellulosehaltigen Abfallstoffen der Lebensmittelindustrie wachsen. Beispiele hierfür sind Kaffee- (Rolz *et al.* 1988) oder Erdnussschalen (Zorn *et al.* 2005b). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von *Pleurotus sp*. im Abbau von lignocellulosehaltigen Substraten ist der selektive Abbau von Lignin, während die Cellulosekomponenten für weitere Anwendungen zur Verfügung stehen. Eine Untersuchung über Co-Kultivierungen belegt, dass sich die Sekretome von *Phanerodontia chrysosporium* und *Pleurotus ostreatus* ergänzen und zu einem verbesserten Ligninabbau beitragen können (Chi *et al.* 2007).

3.1 Polyvalente Peroxidase

Die ersten Schritte im Lignocelluloseabbau sind oxidative Reaktion über Wasserstoffperoxid, welche durch Peroxidasen katalysiert werden (Kirk und Chang 1975, Gold *et al.* 1984). Vier verschiedene Peroxidaseklassen wurden in Weißfäulepilzen nachgewiesen: Ligninperoxidasen (Glumhoff *et al.* 1990, Bonnen *et al.* 1994, Arora *et al.* 2002), Manganperoxidasen (Jensen *et al.* 1996, Camarero *et al.* 1996, Ha *et al.* 2001), Dyp-Typ Peroxidasen (Sugano *et al.* 1999, Faraco *et al.* 2007) und polyvalente Peroxidasen, die bisher unter anderem in *Pleurotus* und *Bjerkandera* Spezies gefunden wurden (Heinfling *et al.* 1998, Ruiz-Duenas *et al.* 1999, Ruiz-Duenas *et al.* 2001, Moreira *et al.* 2005). Polyvalente Peroxidasen (EC 1.11.1.16) vereinen die katalytischen Eigenschaften von Ligninperoxidasen und Manganperoxidasen (Hammel und Cullen 2008). Sie oxidieren in Gegenwart von Wasserstoffperoxid Managan (II) zu Mangan (III) (Martinez *et al.* 1996), welches in einer weiteren Reaktion phenolische Substrate oxidiert. Es wurde aber ebenso eine Mangan-unabhängige Oxidation von Veratrylalkohol, Phenolen und Azo-Farbstoffen beobachtet (Camarero *et al.* 1999). Die Oxidation von Aromaten mit einem hohen Redoxpotential, auch von nichtphenolischen Ligninkomponenten, findet durch eine Elektronenverschiebung

(long range electron transfer, LRET) von der Häm-Gruppe des aktivierten Enzyms an einem außenliegenden Tryptophanrest statt (Perez-Boada *et al.* 2005, Ruiz-Duenas *et al.* 2009b, Ruiz-Duenas *et al.* 2009a).

3.1.1 Wildtypenzym aus *Pleurotus sapidus*

Die Aktivität der polyvalenten Peroxidase, bestimmt mittels β,β-Carotin-Assay (Scheibner *et al.* 2008, 4.7.1.3) betrug in der Submerskultur ~ 0,2 U mg^{-1}. Durch Zugabe verschiedener lignocellulosehaltiger Substrate wurde versucht, die Sekretion der polyvalente Peroxidase zu induzieren. Die Substrate Rapsstroh, Kakaoschale und Lignin organosolv induzierten die Sekretion der polyvalenten Peroxidase nicht. Daher wurden Submerskulturen mit dem Rückstand einer Biogasanlage verwendet (4.6.1.8), um das Enzym zu produzieren. Auf Grund der engen Verwandtschaft zwischen *Pleurotus eryngii* und *Pleurotus sapidus* wurde die Reinigungsstrategie an Langhoff (2002) angelehnt. Mit einem dreistufigen Reinigungsprozess, bestehend aus hydrophober Interaktions-, Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie, wurde das Protein aus dem Kulturüberstand gereinigt.

Nach der dritten Reinigungsstufe, der Gelfiltration, wurde ein Enzympräparat mit einer spezifischen Aktivität von 1,3 U mg^{-1}, einer Ausbeute von 12% und einem Reinigungsfaktor von 130 erhalten (Tabelle 2). Die Reinigung von polyvalenten Peroxidasen aus *Pleurotus eryngii* (Martinez *et al.* 1996 mit einer Ausbeute von 56% und einem Reinigungsfaktor von 25 und Langhoff 2002 mit einer spezifischen Aktivität von 280 mU mg^{-1}, 63% Ausbeute und einem Reinigungsfaktor von 42) wurde mit höheren Ausbeuten durchgeführt. Es wurden dabei aber geringere spezifische Aktivitäten und kleinere Reinigungsfaktoren erzielt

3.1.2 Charakterisierung der Enzympräparation

Nach einer dreistufigen Reinigung waren sowohl in der SDS-PAGE als auch in der IEF zwei Banden (Abbildung 9) erkennbar. Aus beiden Banden wurden Peptidsequenzen erhalten, die hohe Homologien zu einer von Bouws 2007 klonierten cDNA einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* aufwiesen. Weiterführende molekularbiologische Untersuchungen werden zeigen, ob es sich

hierbei um verschiedene Isoenzyme oder um unterschiedliche Modifikationen eines Proteins handelt.

In einem Vergleich der Isoelektrischen Punkte und Molekulargewichte (Tabelle 11) verschiedener polyvalenter Peroxidasen stimmen die hier detektierten Isoelektrischen Punkte überein. Das Molekulargewicht der gereinigten polyvalenten Peroxidase ist jedoch geringer. Die bereits sequenzierte mRNA (Zugriffsnummer AM039632) der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* und die daraus errechnete Primärstruktur des Enzyms und das Fehlen des Signalpeptids im reifen Protein führt zu einer berechneten Proteingröße von ~ 34,6 kDa.

Tabelle 11: Vergleich von Isoelektrischen Punkten und Molekulargewichten verschiedener polyvalenter Peroxidasen, detektiert mittels IEF und SDS-PAGE

	Organismus	**Isoelektrischer Punkt**	**Molekulargewicht [kDa]**
Moreira *et al.* 2005	*Bjerkandera spp.*	3,5	45,7
Langhoff 2002	*Pleurotus eryngii*	3,75	50
Ruiz-Duenas *et al.* 1999	*Pleurotus eryngii*	3,65 / 3,7	43
2.1.1.2 e)	*Pleurotus sapidus*	3,6 / 3,7	38

Die Differenz zwischen dem errechneten und dem mit einer SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichte ist wahrscheinlich auf eine Glykosylierung des Proteins von ca. 10% zurückzuführen. Die reife polyvalente Peroxidase enthält eine potentielle N- (NetNGly 1.0; Blom *et al.* 2004) und fünf potentielle O-Glykosylierungsstellen (NetOGly 3.1; Julenius *et al.* 2005) (Abbildung 10). In der Literatur sind Peroxidasen aus *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus* und *Bjerkandera* sp. beschrieben, die ebenfalls eine potentielle N-Glykosylierungsstelle enthalten (Camarero *et al.* 2000, Asada *et al.* 1995, Moreira *et al.* 2005). Die Peroxidase MsP1aus *Mycetinis scorodonius* dagegen enthält acht potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine potentielle O-Glykosylierungsstelle (Scheibner, 2006) während eine DyP aus *Geotrichum*

candidum drei potentielle N-Glykosylierungs- und mehrere potentielle O-Glykosylierungsstellen enthält (Sugano *et al.* 1999).

Die Kohlenhydratanteile verschiedener Peroxidasen werden mit 8 - 23% angegeben (Sugano *et al.* 1999, Langhoff 2002, Scheibner 2006) Der Glykosylierungsgrad beeinträchtigt nicht in allen Fällen die Enzymaktivität. So wurde beispielsweise für eine DyP aus *Geotrichum candidum* gezeigt, dass die Enzymaktivität unabhängig vom Glykosylierungsgrad des Proteins ist. Allerdings wurde die Thermostabilität des Enzyms davon beeinflusst (Sugano *et al.* 1999). Für Lignin- und Manganperoxidasen aus *Phanerodontia chrysosporium* beschrieben Nie *et al.* 1999 dass die Entfernung von N-Glycosidisch gebundenen Zuckern weder die Aktivität noch die Thermostabilität beeinflusst. Die O-Glycosidisch gebundenen Zucker der MnPH4, eine Manganperoxidase aus *Phanerodontia chrysosporium*, dagegen sind für thermische Stabilität nötig (Nie *et al.* 1999). Eine Glykosylierung ist charakteristisch für sekretierte Proteine (Lis und Sharon 1993). Sie dient dem Schutz vor proteolytischem Verdau und erhöht die Stabilität und Wasserlöslichkeit sekretierter Proteine (Lis und Sharon 1993, Rehm und Letzel 2010).

Zur Vorhersage des N-Terminus des reifen Proteins wurde mittels SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.* 2004) eine potentielle Schnittstelle ermittelt. Vorhergesagt wurde ein Signalpeptid mit 21 Aminosäuren. Durch einen Edmann-Abbau wurde der N-Terminus des reifen Proteins bestimmt. Es wurde eine Signalsequenz mit 30 Aminosäuren detektiert. Dieser Befund lässt vermuten, dass die polyvalente Peroxidase als ein Präproenzym synthetisiert wird. Dies wurde für Ligninperoxidasen aus *Phanerodontia chrysosporium* (Ritch *et al.* 1991) ebenfalls beschrieben.

Die Signalsequenz besteht aus einer Präsequenz mit 21 Aminosäuren mit den drei typischen Regionen N-terminal, hydrophob und C-terminal (Abbildung 76). Dies ist ein typischer Aufbau für Signalpeptide von eukaryotischen sekretierten Proteinen (von Heijne und Abrahmsén 1989). Das neun Aminosäuren umfassende Propeptid besitzt am C-terminalen Ende eine Erkennungssequenz für Peptidasen (Abbildung 76 (…XXKR), Ritch *et al.* 1991). Vernutet wird hier der Einfluss einer Endopeptidase der Subtilisin Familie (Barr 1991). Ritch *et al.* 1991 bestimmten eine Kosensussequenz für die Signalsequenz verschiedener

Peroxidasen. Die konservierten Aminosäuren (Abbildung 76) wurden ebenfalls in der Signalsequenz der polyvalenten Peroxidase gefunden.

Viele sekretierte Enzyme besitzen Propeptide. Mögliche Aufgaben der Propeptide können sein: erweiterte Erkennungssequenz für Signalpeptidasen, Beeinflussung des Proteinzielortes, Proteinfaltung und Proteininaktivierung während der Translokation (Stryer 1999).

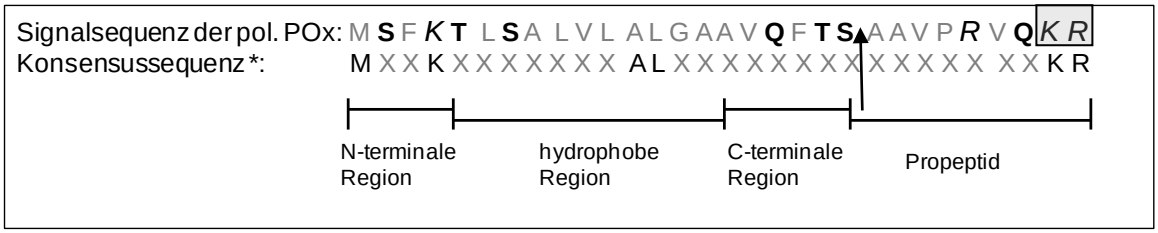


Abbildung 76: Signalsequenz der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* (nach Edmann-Abbau); hydrophobe Aminosäuren (hellgrau), hydrophile Aminosäuren (fett), basische Aminosäuren (kursiv) und der Erkennungssequenz für Peptidasen (Kästchen) verglichen mit einer Konsensussequenz verschiedener Peroxidasen aus *Phanerodontia chrysosporium* (Ritch *et al.* 1991); Pfeil: der durch SignalP vorhergesagte Start des reifen Proteins

Ein Vergleich der N-termini verschiedener Peroxidasen aus *Pleurotus* sp. (Tabelle 12) zeigt eine erweiterte Konsensussequenz gegenüber der von Ritch *et al.* 1991 aufgestellten Sequenz.

Tabelle 12: Vergleich von N-terminalen Sequenzen verschiedener Peroxidasen

	Enzym	N-Terminus	Literatur
P. sapidus	polyvalente Peroxidase	AT(C)ADGGTTA	Abbildung 10
P. eryngii	polyvalente Peroxidase	AT(C)ADGRTTA	Zorn *et al.* 2003
P. eryngii	PS1	VTCATGQTT	Camarero *et al.* 1999
	PS2	VTCADGNTV	
P. pulmonaris	Manganperoxidase	ATCADGRTTA	Camarero *et al.* 1996
P. chrysosporium	Konsensussequenz Ligninperoxidasen	XXCXXGXI	Ritch *et al.* 1991
Pleurotus sp.	Konsensussequenz	XTCAXGXT	Tabelle 12

Die optimalen Reaktionsbedingungen der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* lassen sich nur bedingt mit den Werten in Tabelle 13 vergleichen, da die pH-Optima der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* mit anderen Substraten bestimmt wurden (Ruiz-Duenas *et al*. 1999). Im Vergleich mit der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* liegt das Temperaturoptimum der Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus* geringfügig unterhalb (30 °C) und das pH-Optimum mit pH 4,5 oberhalb der Optima aus *Pleurotus eryngii* (Langhoff 2002).

Tabelle 13: Vergleich verschiedener polyvalenter Peroxidasen, * (Langhoff 2002), **(Ruiz-Duenas *et al.* 1999)

	Pleurotus eryngii*	***Pleurotus eryngii***
pH-Optimum	3,7 (Abbau β,β-Carotin)	5 (Peroxidaseaktivität) 4 (Oxidation von Phenolen) 3 (Oxidation anderer aromatischer Verbindungen)
Temperaturoptimum	34 °C	k. A.

Als Co-Substrat bei der Umsetzung der Substrate diente Wasserstoffperoxid. Die optimale Konzentration von 2 mM lag in einem recht großen Toleranzbereich von 0,5 bis 4 mM, in dem noch bis zu 75% Aktivität verblieben (Abbildung 13). Zur weiteren Steigerung der Enzymaktivität wurden Mangansulfat und Coniferylalkohol eingesetzt (Aoyama *et al.* 2002). Durch die Optimierung der Bedingungen in der Aktiviätsmessung wurde eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 2,5 erreicht.

Des Weiteren wurden die kinetischen Konstanten der Enzympräparation bezogen auf vier häufig verwendete Substrate bestimmt. Bestimmt wurden die Michaelis-Menten-Konstanten und die katalytische Wechselzahl (Michaelis und Menten 1913), sowie die katalytische Konstante der Enzympräparation. Hierzu wurde die Reaktionsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen

aufgenommen und im Lineweaver-Burk-Diagramm (Lineweaver und Burk 1934) aufgetragen. Einige der wirksamsten Enzyme sind beispielsweise Katalasen (K_m: 2,5 10^{-2} M, k_{cat}: 1 10^{7} s^{-1}, k_{cat} K_m^{-1}: 4 10^{8} M^{-1} s^{-1}) oder Acetylcholinesterasen (K_m: 9,5 10^{-5} M, k_{cat}: 1,4 10^{4} s^{-1}, k_{cat} K_m^{-1}: 1,5 10^{8} M^{-1} s^{-1}) (Nelson *et al.* 2005). Für die Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus* wurden Michaelis-Menten-Konstanten von 5 10^{-5} bis 1,8 10^{-4} M bestimmt. Die höchste Affinität der Enzympräparation bestand somit zu *β,β*-Carotin (Tabelle 4). Im Vergleich mit anderen polyvalenten oder Dyp-Typ Peroxidasen zeigte die Präparation aus *Pleurotus sapidus* eine geringere Affinität zu ABTS und eine höhere Affinität zu Veratrylalkohol. Die Affinität zu Syringol war mit anderen polyvalenten Peroxidasen vergleichbar (Tabelle 14). Ein Vergleich der konkreten Zahlen ist jedoch nur bedingt möglich, da die Reaktionsbedingungen sich zwischen den Autoren unterscheiden, und schon geringe Abweichungen von den optimalen Reaktionsbedingungen zu großen Änderungen in der Reaktionsgeschwindigkeit führen können (2.1.1.4 a)).

Tabelle 14: Übersicht über die Michaelis-Menten-Konstanten verschiedener Peroxidasen im Vergleich zur Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus*; *: Mn-PL2 aus *Pleurotus eryngii* und MnP1 aus *Bjerkandera adusta* (Heinfling *et al.* 1998); **: Polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* (Ruiz-Duenas *et al.* 2001)

	Enzym-präparation	**Mn-PL2***	**MnP1***	**Polyvalente Peroxidase****
		K_m [M]		
Syringol	1,4 10^{-4}	3 10^{-4}	1,7 10^{-4}	0,9 10^{-4} bis 3 10^{-4}
ABTS	1,8 10^{-4}	3 10^{-6}	2 10^{-6}	0,3 10^{-5} bis 1,2 10^{-5}
β,β-Carotin	5 10^{-5}	k. A.	k. A.	k. A.
Veratrylalkohol	1,7 10^{-4}	3 10^{-3}	4 10^{-3}	3 10^{-3}

Die Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus* wies zwar die höchste Affinität zu *β,β*-Carotin auf (Tabelle 14), besaß für dieses Substrat aber gleichzeitig die geringste Arbeitsgeschwindigkeit. Die höchste katalytische Wirksamkeit der

Präparation wurde bei Syringol bestimmt; bei Veratrylalkohol zeigte sich die geringste katalytische Wirksamkeit (Tabelle 14).

3.1.3 Zellfreie Umsetzungen von Substraten mit dem Wildtypenzym

Für die Umsetzungen mit der gereinigten Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus* wurden die Modellsubstrate Veratrylalkohol und Coniferylalkohol verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden den optimalen Bedingungen der Enzympräparation angepasst (2.1.1.4 a)). Die Reaktion mit Veratrylalkohol verlief innerhalb von 48 Stunden quantitativ. Dabei wurde Veratrylalkohol zu Veratrumaldehyd oxidiert. Diese Oxidation wurde sowohl für Laccasen, unter Verwendung unterschiedlicher Mediatoren (Bourbonnais und Paice 1990) und für Ligninperoxidasen beschrieben (Lee und Moon 2003).

Die Reaktion der Enzympräparation mit Coniferylalkohol verlief dagegen wesentlich schneller. Bereits nach einer Inkubationszeit von dreißig Minuten wurden erste unlösliche Produkte beobachtet. Das Edukt wurde innerhalb von neunzig Minuten fast vollständig abgebaut. Eine Identifizierung der Reaktionsprodukte soll in weiterführenden Arbeiten mittels LC-MS/MS-Analytik erfolgen. Die Polymerisation von Coniferylalkohol durch Peroxidasen ist in der Literatur bekannt (Calderon *et al.* 1992, Richardson *et al.* 1997). Durch eine Merrettichperoxidase wurde beispielsweise innerhalb von Minuten bei pH 6,0 und Raumtemperatur das Substrat Coniferylalkohol vollständig abgebaut und die Dimere detektiert (Abbildung 77). Die Menge der detektierten Dimere nahm nach dem vollständigen Abbau des Coniferylalkohols ab und Polymere entstanden (Fournand und Lapierre 2001). Fournand *et al.* 2003 beschrieben die pH-Abhängigkeit dieser Reaktion. Der Einsatz von oberflächenaktiven Zusätzen wie Cetyltrimethylammoniumsulfat führte zur Stabilisierung der Reaktionsprodukte, insbesondere der Dimere und begünstigte die Bildung löslicher Polymere (Reale *et al.* 2010).

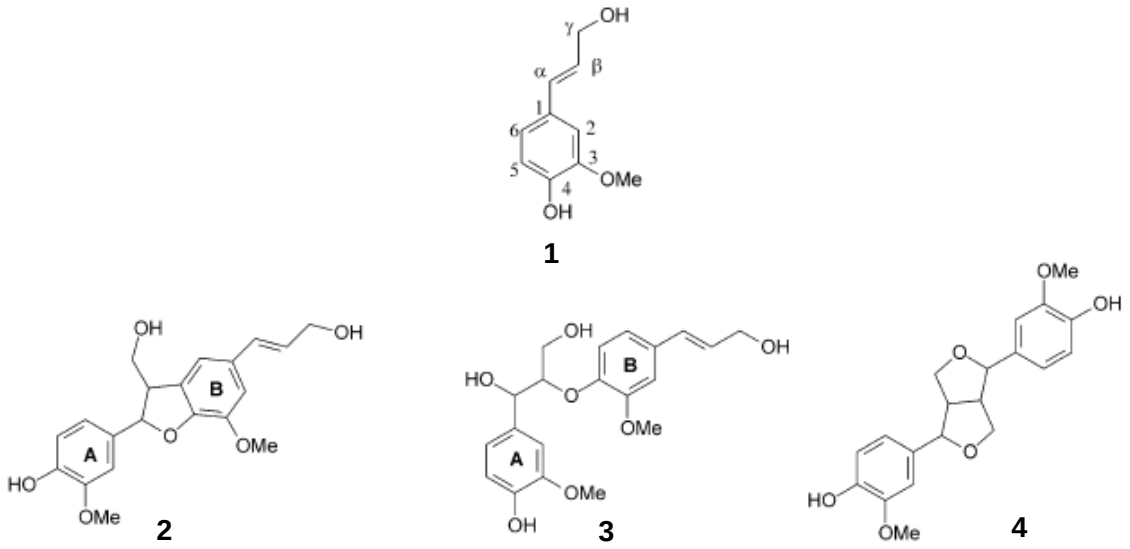


Abbildung 77: Chemische Strukturen von 1) Coniferylalkohol und den häufigsten Dimeren 2) *β*-5-Dehydrodimer, 3) *β*-O-4-Dehydrodimer und 4) *β,β´*-Dehydrodimer, modifiziert nach Fournand *et al.* 2003

In einem weiteren Versuchsansatz wurde eine Ligninpräparation (Sigma, 371017), welche in organischen Lösungsmitteln löslich ist, eingesetzt. Der Ansatz enthielt lediglich 10% (v/v) Ethanol, so dass das verwendete Lignin als Suspension vorlag. Nach Inkubation der Suspension mit aktivem und inaktivem Enzym wurde die Partikelgrößenverteilung der Ligninpartikel in der Lösung bestimmt. Im Verlauf der Reaktion entstanden, im Gegensatz zur Kontrolle, wesentlich kleinere Ligninpartikel.

Die zellfreie Umsetzung von Ligninmodellsubstraten, Lignin und Stroh wurde mit einzelnen Enzymen bereits gezeigt (Wariishi *et al.* 1991, Hofrichter *et al.* 2001a, Liers *et al.* 2010). Eingesetzt wurden dabei 5 U mL^{-1} Enzym für einen Verdau, während in dieser Arbeit lediglich 0,8 mU der gereinigten polyvalenten Peroxidase für einen Verdau eingesetzt wurden. Daher wurde im weiteren Verlauf eine heterologe Expression des Enzyms durchgeführt, um eine Steigerung der Enzymausbeute zu erreichen.

3.1.4 Heterologe polyvalente Peroxidase aus *Hansenula polymorpha*

Für die in weiteren Untersuchungen geplanten zellfreien Umsetzungen war es notwendig, über größere Mengen an schnell und einfach zu produzierendem Enzym zu verfügen. Die Expression der polyvalenten Peroxidase in *Pleurotus sapidus* erforderte insgesamt fünfzehn Tage, und die anschließende mehrstufige

Reinigung wurde in vierzehn Tagen durchgeführt. Für größere Mengen an Enzymaktivität muss daher ein Fermenter betrieben und das Enzym aus der Submerskultur isoliert werden. Bei einer theoretischen Ausbeute von 0,3 bis 0,5 U pro Liter Kultur wurden für eine zellfreie Umsetzung ca 12 L Kultur benötigt. Der benötigte Zeitaufwand betrug bis zu vier Wochen. Aus diesem Grund bot sich die rekombinante Expression des Gens der polyvalente Peroxidase an. Für die Überexpression einer Peroxidase aus *Phanerodontia chrysosporium* wurden beispielsweise bereits Bakterien (Whitwam und Tien 1996), Hefen (Gu *et al.* 2003) und filamentöse Pilze (Stewart *et al.* 1996) eingesetzt. Auf diese Weise wurde die Enzymaktivität in Hefestämmen auf bis zu 2500 U L^{-1}, beziehungsweise nach einfacher Reinigung auf 30.000 U L^{-1} (Jiang *et al.* 2008) gesteigert. Die kinetischen Eigenschaften von Wildtyp und rekombinantem Enzym waren vergleichbar (Gu *et al.* 2003).

Der *Hansenula polymorpha* Stamm RB11 wurde als Plattform für die Überexpression von Proteinen entwickelt (Ramezani-Rad *et al.* 2003). Durch die Verwendung eine Signalsequenz aus *Saccharomyces cerevisiae* (van der Heide *et al.* 2007) und Veränderung der Kulturparameter (Kottmeier *et al.* 2010) gelang es verschiedene Enzyme zu exprimieren. Diese wurden über den zellulären Sekretionsweg prozessiert und ins Medium sekretiert. Auch ein Scale-Up von 0,2 mL auf 1,4 L der Reaktion wurde bereits erfolgreich durchgeführt (Kensy *et al.* 2009).

Daher wurde die Aminosäuresequenz der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* (Anhang, Abbildung a2) auf genomischer Ebene der Codon-Usage von *Hansenula polymorpha* angepasst und in Expresssionsvektoren mit einem Hexa-His-Tag kloniert (ARTES Biotechnoloy GmbH). Durch genomische Integration der Expressionsplasmide wurden stabile Klone erhalten. Die Selektion erfolgte in Multiwellplatten (ARTES Biotechnoloy GmbH) und zwei positive Klone wurden im 200 mL Maßstab produziert (2.1.2.1). Beide Klone unterschieden sich im N-terminalen Bereich um neun Aminosäuren. Eine Sequenz wurde ohne und die zweite Sequenz mit dem Propeptid produziert.

Nur für das kürzere Protein (MFαE-VP(331)-H6) wurde eine Aktivität von 0,2 U L^{-1} detektiert. Die optimalen Reaktionstemperaturn der polyvalenten

Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* und der heterolog exprimierten Peroxidase betrugen jeweils 30 °C. Die pH-Optima und die Konzentrationen der eingesetzten Reaktionszusätze Wasserstoffperoxid und Mangansulfat unterschieden sich deutlich voneinander (Tabelle 15). Gu *et al.* 2003 beschrieben für eine Wildtyp Managanperoxidase aus *Phanaerochaete chrysospurium* und das dazugehörige heterologe Enzym ähnliche Reaktionsbedingungen. Andere Autoren wiesen dagegen nach, dass das Glykosylierungsmuster von Proteinen einen starken Einfluss auf die Stabilität und die Reaktionsbereitschaft von Enzymen unter extremen pH- und Temperaturbedingungen hat (Neustroev *et al.* 1993, Goto *et al.* 1997). Dieser Effekt muss in nachfolgenden biochemischen Arbeiten untersucht werden.

Tabelle 15: Reaktionsoptima der Wildtyp und rekombinanten polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*; *: höhere Konzentrationen konnten im verwendeten Assay nicht eingesetzt werden

	polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*	**rekombinante polyvalente Peroxidase**
Puffer und pH-Wert	50 mM Natriumacetat-puffer pH 4,5	100 mM Tris/Glycin-Puffer pH 1,2
Temperatur [°C]	30	30
Wasserstoffperoxidkonzentration [mM]	2	4*
Mangansulfatkonzentration [mM]	0,2	0,05
Aktivität bei Wildtyp Bedingungen [U L^{-1}]	1,27	0,12
Aktivität bei den Bedingungen für die rekombinante Peroxidase [U L^{-1}]	0,14	2,46

3.2 Sekretomanalyse von *Pleurotus sapidus*

Die Sekretion verschiedener Enzyme, insbesondere deren zeitliche Abfolge im Lignocelluloseabbau wurde eingehend untersucht.

3.2.1 Erfassung von Enzymaktivitäten als Summenparameter

Die biotechnologische Produktion von Basidiomycetenenzymen erfolgte in unterschiedlichen Kultursystemen. Zum einen wurden Flüssigkulturen (Submerskulturen) und zum anderen Oberflächenkulturen (Emerskulturen)

eingesetzt. Ein Vergleich von *Pleurotus ostreatus* Pilzmycel aus Sub- und Fruchtkörpern aus Emerskulturen ergab eine ähnliche Zusammensetzung bezüglich Proteingehalt, Aminosäurespektrum und Fettsäuremuster (Hadar und Cohenarazi 1986). In Flüssigkulturen mit nährstoffreichen Vollmedien (Zorn *et al.* 2005b) wachsen Basidiomyceten aus der Familie der *Pleuratacea* ebenso wie in Minimalmedien unter Zugabe von Lignocellulosehaltigen Substraten (Ghosh *et al.* 1998, Zorn *et al.* 2005b, Krügener *et al.* 2009). Die Enzymproduktion in Emerskulturen spiegelt dagegen den natürlichen Lebensraum von Basidiomyceten wider.

Die Wahl des Kultursystems, Oberflächenkultur oder Flüssigkultur, beeinflusste die Enzymproduktion ebenso (Elisashvili *et al.* 2008) wie die Wahl der Stickstoffquelle und deren Konzentration (Spadaro *et al.* 1992, Kachlishvili *et al.* 2006). Auch die Verwendung von unterschiedlichen Lignocellulosezusätzen in den Kulturen beeinflusste die Sekretion extrazellulärer Enzyme. In Kulturen von *Pleurotus ostreatus* mit Bananenschalen wurden bis zu 630 U L^{-1} Laccase detektiert, während in Kulturen mit Apfelschalen (507 U L^{-1}), Mandarinenschalen (340 U L^{-1}) und Holz (73 U L^{-1}) geringere Laccaseaktivitäten detektiert wurden (Elisashvili *et al.* 2008). Der Einfluss der einzelnen Faktoren auf die Induktion der Laccase variierte zwischen einzelnen Spezies (Highley und Micales 1990).

In dieser Arbeit wurden die Einflüsse des Kultursystems und der Kohlenstoffquelle (2.2.1) auf das lignolytische System von *Pleurotus sapidus* untersucht. Aufgenommen wurde der zeitliche Verlauf der sekretierten Enzymaktivitäten.

Die hauptsächlich am Ligninabbau beteiligten Enzyme sind Ligninperoxidasen, Manganperoxidsen, polyvalente Peroxidasen und Laccasen (Ghosh *et al.* 1998, Reddy *et al.* 2003, Yamanaka *et al.* 2008). Ebenso beteiligt sind Wasserstoffperoxid produzierende Enzyme wie zum Beispiel Arylalkoholoxidasen (Varela *et al.* 1999, Ferreira *et al.* 2009). Die Beteiligung von hydrolytischen Enzymen wie Esterasen (Zorn *et al.* 2005a, Wymelenberg *et al.* 2009), Lipasen (Hädrich-Meyer und Berger 1994), Cellulasen (Herr 1979, Elisashvili und Kachlishvili 2009) und Xylanasen (Ghosh *et al.* 1998, Elisashvili und Kachlishvili 2009) ist für den weiteren Lignocelluloseabbau ebenfalls essentiell.

In lignolytischen Systemen werden Laccasen in hohem Maße exprimiert. Laccasen (EC 1.10.3.2) sind Kupfer-abhängige Polyphenoloxidasen, die Ein-Elektronen-Reaktionen katalysieren. In *ortho*- und *para*-Diphenolen sowie in aromatischen Aminen können Laccasen alkyl-phenyl- und C_α-C_β-Spaltungen von phenolischen Dimeren katalysieren (Yokota *et al.* 1990). Ebenso wurde die Demethoxylierung von Ligninmodellsubstraten nachgewiesen (Tien und Kirk 1984, Eriksson *et al.* 1990).

Laccasen katalysieren durch Mediatoren wie 2,2´-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonat) (ABTS) Reaktionen an nichtphenolischen Bestandteilen des Lignins, die nicht zu ihrem natürlichen Substratspektrum gehören (Bourbonnais und Paice 1990). Laccasen reagieren ebenfalls direkt mit ABTS, was für deren Nachweis genutzt wird (Abbildung 78, Wolfenden und Willson 1982). Durch Zugabe des Co-Substrats Wasserstoffperoxid wurde die Aktivität von Peroxidasen mit dem gleichen Substrat nachgewiesen (Childs und Bardsley 1975). Die im ABTS-Assay nachgewiesenen Aktivitäten resultierten aus den vorhandenen Laccase- und Peroxidaseaktivitäten.

Deshalb wurde die Abhängigkeit der Laccaseaktivität von unterschiedlichen Wasserstoffperoxidkonzentrationen untersucht. Je mehr Wasserstoffperoxid in der Reaktion verwendet wurde, desto geringer war die resultierende Laccaseaktivität. Die im Peroxidaseassay eingesetzte Wasserstoff-peroxidkonzentration von 0,35 mM verursachte einen 15%igen Verlust der Laccaseaktivität (Abbildung 29).

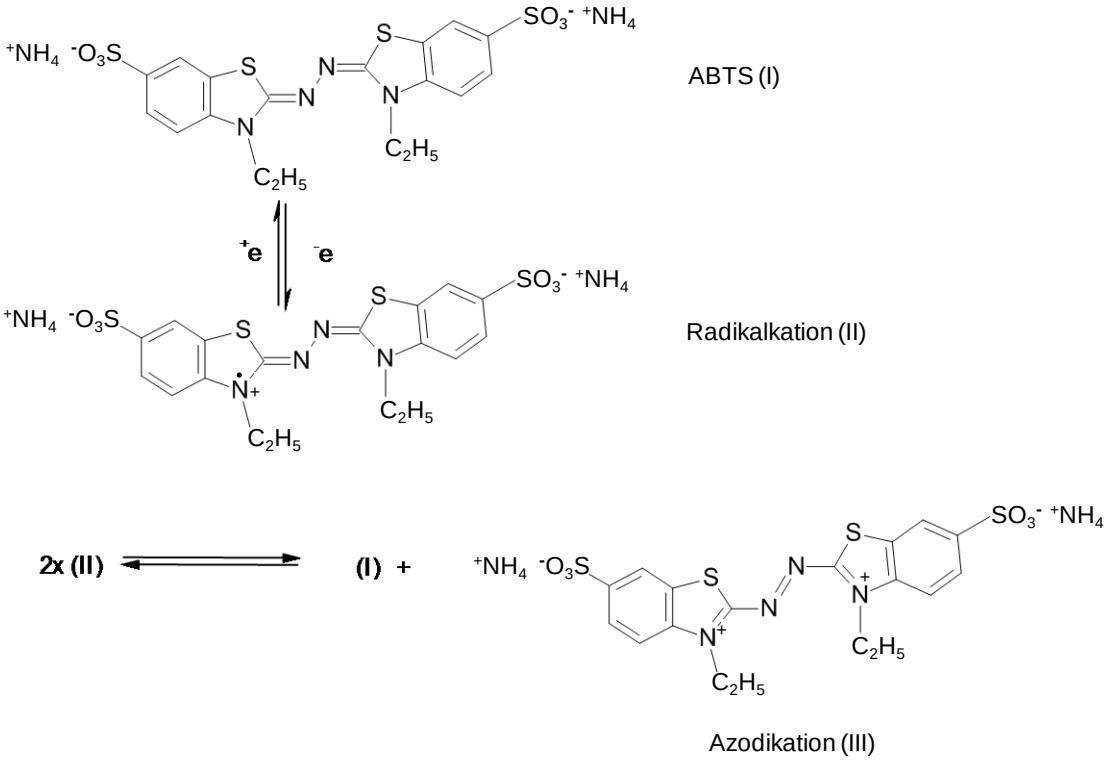


Abbildung 78: Enzymatische Umsetzung von ABTS zu $ABTS^{2+}$, photometrischer Nachweis von Laccasen und Peroxidasen, modifiziert nach (Wolfenden und Willson 1982)

Da beide Aktivitäten abhängig voneinander bestimmt wurden, wurde das in der Kultur vorhandene Wasserstoffperoxid durch Zugabe von Catalse abgebaut. Die zugesetzte Catalase führte nicht zu einer Inhibierung der Laccasen. Die zugesetzte Catalase war gleichzeitig in der Lage bis zu 1 mM Wasserstoffperoxid abzubauen (Abbildung 30). Parallel dazu wurden sowohl die Wasserstoffperoxidkonzentration, als auch der pH Wert der Reaktion optimiert (Abbildung 29 und 30). Die daraus resultierenden Reaktionsoptima und Berechnungen sind in 4.7.1.1 dargestellt.

Die Hemmung von Peroxidaseaktivität durch Wasserstoffperoxid ist in der Literatur beschrieben. Polyvalente Peroxidasen aus *P. pulmonarius* werden bereits durch Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 200 µM gehemmt, die während der Lagerung von Kulturüberständen entstehen (Bockle *et al.* 1999). Der Einsatz einer Dialyse oder von Catalase verhinderte die Peroxidaseinstabilitäten. Der Grad der Hemmung war neben der Wasserstoffperoxidkonzentration ebenfalls vom pH Wert der Umgebung

abhängig. Ein 20facher Überschuss an Wasserstoffperoxid führte bei pH 3,25 zu einer 60%igen Inhibierung, während ein 250facher Überschuss bei gleichem pH Wert zu einem 90%igen Aktivitätsverlust führte (Bockle *et al.* 1999).

Peroxidasen (EC 1.11.1) gehören der Gruppe der Oxidoreduktasen an und sind ubiquitär vorhanden. Sie oxidieren verschiedene Elektronendonatoren mit Hilfe von Wasserstoffperoxid.

Für viele Pilze werden Manganperoxidasen als die Enzyme gewertet, die den initialen Abbau des Lignins katalysieren. In Laufe des katalytischen Zyklus entsteht aus Mn^{2+} Mn^{3+} (Wariishi *et al.* 1992), ein unselektives, aber starkes Oxidans (Kamitsuji *et al.* 2004). Oxalate und Malonate, zwei in pilzlichen Kulturen vorhandene organische Säuren, stabilisieren Mn^{3+}, so dass eine Reaktion am unlöslichen Substrat stattfinden kann (Wariishi *et al.* 1992, Gutierrez *et al.* 1994). Im normalen katalytischen Zyklus von Manganperoxidasen werden ausschließlich phenolische Ligninstrukturen oxidiert sowie ungesättigte Fettsäuren peroxidiert. Die Peroxidierung von Lipiden spielt ebenfalls eine große Rolle im Ligninabbau (Jensen *et al.* 1996, Gutierrez *et al.* 2002). Zur Aktivitätsbestimmung von Manganperoxidasen wurden Syringol und Wasserstoffperoxid eingesetzt (Abbildung 79). Es wurden zwei Messungen durchgeführt (Wariishi *et al.* 1992), ohne Zusatz von Mangan, um die Peroxidase- und Laccaseaktivität bestimmen zu können, und mit Zusatz von Mangan zu Bestimmung von Laccase-, Peroxidase- und Manganperoxidaseaktivität.

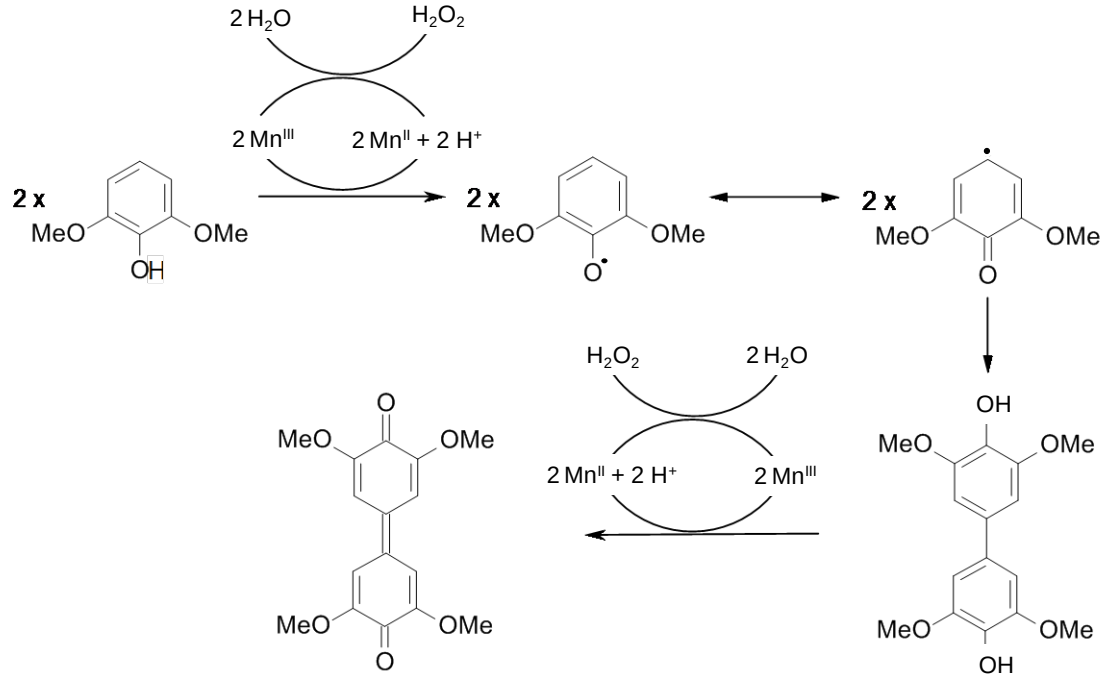


Abbildung 79: Enzymatische Umsetzung von Syringol zur photometrisch detektierbaren Substanz, modifiziert nach (Wariishi *et al.* 1992)

Eine weitere höchst interessante Gruppe von Peroxidasen sind die polyvalenten Peroxidasen. Sie weisen zweierlei katalytische Aktivitäten auf. Zum einen oxidieren sie nichtphenolische, aromatische Substanzen durch Radikalbildung, zum anderen oxidieren sie Mn^{2+} zu Mn^{3+} (Martinez *et al.* 1996, Zorn *et al.* 2003). Zur Aktivitätsbestimmung wurde die oxidative Spaltung von β,β-Carotin photometrisch verfolgt (Zorn *et al.* 2003). Eine weitere Gruppe von Peroxidasen wird den Klasse II Peroxidasen zugeordnet. Die biochemischen Charakteristika unterscheiden sich von anderen bekannten Peroxidasen (Kim und Shoda 1999, Sugano *et al.* 1999). Dyp-Typ Peroxidasen weisen keine Sequenzhomologien zu Mangan- oder Ligninperoxidasen auf (Sugano *et al.* 1999). In der Familie der *Pleurotaceae* wurden diese Peroxidasen bereits im *Pleurotus eryngii* (Heinfling *et al.* 1998) und im *Pleurotus ostreatus* (Shin *et al.* 1997, Faraco *et al.* 2007) gefunden. Das Molekulargewicht der Enzyme schwankt zwischen 73 kDa in *Pleurotus ostreatus* (Shin *et al.* 1997) und 120 beziehungsweise 150 kDa für die dimeren Enzyme in *Mycetinis scorodonius* (Scheibner *et al.* 2008). Der Isoelektrische Punkt der Dyp Typ Peroxidasen liegt bei 3,5 bis 3,8. Das pH Optimum von katalytischen Reaktionen mit Azofarbstoffen liegt ebenfalls im sauren Bereich (Kim und Shoda 1999).

Hydrolytische Enzyme spielen ebenfalls eine große Rolle beim Abbau von Lignocellulosen. Die Gruppe der Cellulasen beinhaltet unter anderem Endocellulasen (Endo-1,4-β-glucanase, EC 3.2.1.4), Exocellulasen (Cellobio-hydrolasen, EC 3.2.1.91), β-Glukosidasen (EC 3.2.1.21) und weitere Glycosidasen (Endo-1,4-β-xylanase, EC 3.2.1.8). Endocellulasen wurden aus zahlreichen Weißfäulepilzen isoliert (Pettersson und Porath 1963, Henriksson *et al.* 1999). Sie hydrolysieren die β-1,4-Glycosidische Bindungen in Glucanen. Typischerweise sind diese Enzyme glykosyliert und besitzen einen Zuckeranteil von ein bis zwölf Prozent (Eriksson und Pettersson 1975, Henriksson *et al.* 1999). Exocellulasen wurden ebenfalls aus einigen Weißfäulepilzen isoliert (Uzcategui *et al.* 1991, Willick und Seligy 1985). Sie hydrolysieren die 1,4-ß-D-glukosidischen Bindungen der Cellulose ausgehend vom nicht reduzierenden Ende der Cellulosekette. Ebenso wie die Endocellulasen sind sie in geringem Maße glykosyliert (Eriksson und Pettersson 1975) und besitzen einen Isoelektrischen Punkt zwischen 2,6 und 4,9. β-Glycosidasen hydrolysieren die 1,4-ß-D-glukosidischen Bindungen in Polysacchariden und sind strukturell höchst variabel. Mehrere extrazelluläre Enzyme dieser Familie wurden für *Pleurotus ostreatus* beschrieben. Sie besitzten Molekulargewichte von 35 bis 66 kDa und K_M-Werte für Cellobiose von 2,3 bis 2,43 mM (Morais *et al.* 2002). Eine für *Phanerodontia chrysosporium* beschriebene β-Glycosidase besitzt ein Molekulargewicht von 41 kDa und einen K_M-Wert von 110 µM (Smith und Gold 1979).

Hemicellulose abbauende Enzyme, hauptsächlich Endo-1,4-β-Xylanasen (EC 3.2.1.8) und β-D-Xylosidasen (EC 3.2.1.37) wurden für Weißfäulepilze und auch für die Familie der *Pleurotacae* beschrieben (Ghosh *et al.* 1998, Baldrian *et al.* 2005). Sie hydrolysieren die 1,4-ß-D-Glycosidischen Bindungen in Xylanen. Der Nachweis dieser Enzymaktivitäten erfolgte über den photometrischen Nachweis von reduzierenden Zuckern, die aus Xylan freigesetzt werden. Die reduzierenden Zucker werden durch eine Reaktion mit Dinitrosalycylsäure nachgewiesen (Bailey 1988, Bailey *et al.* 1991). Zur Quantifizierung wurden Kalibrierungen mit Glucose (Hexose) und Xylose (Pentose) verwendet.

Als Hemicellulase-Hilfsenzyme werden die Enzyme bezeichnet, die zusammen mit Xylanasen und Pektinasen den Abbau der pflanzlichen Zellwand katalysieren. Dies umfasst unter anderem Acetyl-Xylan Esterasen (EC 3.1.1.6) und Feruloyl-Esterasen (EC 3.1.1.73). Feruloyl-Esterasen wurden in holzzersetzenden Pilzen gefunden (Tenkanen 1998, Caufrier *et al.* 2003) und katalysieren die Hydrolyse von Esterbindungen zwischen den Hemicellulosen und den aromatischen Säurederivaten der Monolignole. Sie sind an der Hydrolyse von Esterbindungen (Diferulat-Brücken) zwischen Arabinoxylanen und Lignin beteiligt (Iiyama *et al.* 1994, Rumbold *et al.* 2003). Die Esteraseaktivität wurde mittels *p*-Nitrophenolacetat (modifiziert nach Purdy und Kolattukudy 1973) bestimmt (4.7.1.4).

Eine weitere Gruppe von Hydrolasen besitzt proteolytische Aktivität. Eine Einteilung der Peptidasen erfolgt nach ihrem katalytischen Mechanismus in folgende Gruppen: Aspartyl-, Cysteinyl-, Threonyl-, und Serinpeptidasen, Metallopeptidasen und solche, mit unbekanntem Mechanismus. Peptidasen wurden im Sekretom verschiedener holzabbauender Pilze gefunden (Zorn *et al.* 2005b, Lilly *et al.* 2008). Zur Bestimmung der Peptidaseaktivität wurde ein mit einem Azofarbstoff gekoppeltes Casein eingesetzt (Kilcawley *et al.* 2002). Der durch Hydrolyse freigesetzte Farbstoff ist säurelöslich und wurde photometrisch detektiert.

Die Bestimmung der Peptidaseaktivität (4.7.1.5) über den Verlauf einer Submerskultur ergab Aktivitäten von bis zu 1700 U pro mg Protein (Abbildung 62). Die Überstände mit der höchsten Aktivität wurden für Inhibierungsversuche mit verschiedenen Peptidaseinhibitoren verwendet. Durch Zugabe eines Peptidaseinhibitormixes (4.6.1.5, Mix 1) wurde die Aktivität vollständig unterbunden (Abbildung 63). Bei einer Reduzierung der Inhibitorkonzentration wurde keine vollständige Inhibierung erreicht. Durch den Einsatz verschiedener Einzelkomponenten wie 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF), *Trans*-Epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butan (E64), Pepstatin, 1,10-Phenanthrolin und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurde eine Verminderung der Aktivität erreicht. Eine Kombination dieser aktiven Einzelkomponenten ergab einen vollständig funktionsfähigen

Peptidaseinhibitormix. Er enthielt AEBSF, einen stabilen Serinpeptidaseinhibitor (Lawson *et al.* 1982), der einen ähnlichen Wirkmechanismus wie PMSF aufweist. Ein weiterer Bestandteil war E64, ein irreversibler und hochwirksamer Cysteinpeptidaseinhibitor (Katunuma und Kominami 1995). 1,10-Phenanthrolin, der dritter Bestandteil des Inhibitorcocktails, ist ein Komplexbildner. Dieser inhibiert selektiv Metallopeptidasen (Sigman *et al.* 1991). Der so zusammengestellte Peptidaseinhibitormix gegen Cystein-, Serin- und Metallopeptidasen wurde in den 2-D-elektrophoretischen Untersuchungen eingesetzt. Die Enzymaktivitäten wurden dagegen direkt nach Probennahme untersucht und daher wurde auf die Zugabe von Inhibitoren verzichtet.

Die Kultivierungsbedingungen, wie zum Beispiel der Stickstoffgehalt des Mediums, der Sauerstoffeintrag oder die Kulturführungen beeinflussen die Produktion von lignolytischen Enzymaktivitäten ebenso wie das gewählte Substrat (Kachlishvili *et al.* 2006, Songulashvili *et al.* 2007, Elisashvili *et al.* 2008). Aus diesem Grund wurde der zeitliche Verlauf der Sekretion verschiedener lignolytischer Enzyme des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* auf zwei unterschiedlichen Substraten und in je zwei verschiedenen Kultursystemen untersucht.

Bei der Kultivierung von Basidiomyceten wird der pH-Wert durch freigesetzte organische Säuren abgesenkt (Wariishi *et al.* 1992), bevor der pH-Wert auf Grund der Autolyse leicht ansteigt (Peters 2003). Der pH-Wert des Mediums stieg jedoch im Laufe der Kultivierung an (Abbildung 46 und 51). Beschrieben wurde eine Alkalisierung des Mediums durch die Freisetzung von Ammonium (Jennings 1989). Die Ammoniumproduktion resultierte dabei aus der Proteaseaktivität und anschließender Desaminierung der Aminosäuren (Jennings 1989). Bei Veränderung des pH-Wertes in Kulturmedien sind in der Literatur erhöhte Enzymproduktionen beschrieben worden. Die Alkalisierung von Flüssigmedien bedingte beispielsweise eine erhöhte Peptidaseproduktion in *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus fumigatus* und *Neurospora crassa* (St Leger *et al.* 1999). In der Literatur wurde ebenfalls die pH abhängige Expression von Xylanasen in *Aspergillus* sp. und *Alternaria alternata* beschrieben (MacCabe *et al.* 1998, Eshel *et al.* 2002). Für den Ascomyceten *Glomerella cingulata* wurde

nachgewiesen, dass die Alkalisierung des Mediums durch Ammonium abhängig vom Start-pH-Wert, der Pufferkapazität der Umgebung, sowie von der Art und Menge der Stickstoffquelle ist (Drori *et al.* 2003). Gleichzeitig ist beispielsweise die Expression von Pectat Lyasen ab einem pH-Wert > 6,0 nicht mehr von der Stickstoffquelle abhängig.

Neben dem pH-Wert kann der Wasserstoffperoxidgehalt die Enzymaktivitäten beeinflussen. Ein Überschuss an Wasserstoffperoxid kann eine Inhibierung von Peroxidasen verursachen (Bockle et al. 1999). Direkt nach Ernte der Kulturen wurde der Gehalt an Wasserstoffperoxid bestimmt (4.7.1.10). In den Emerskulturen wurden zwischen 23 und 78 µg (Tabelle 16 oben) und in den Submerskulturen zwischen 20 und 290 µg Wasserstoffperoxid pro Gramm Substrat (Tabelle 16 unten) nachgewiesen. Bereits 1987 zeigte Highley, dass die Wasserstoffperoxidproduktion in Braun- und Weißfäulepilzen von den verwendeten Kohlenstoff- und Stickstoffquellen abhängig sein kann. Auch Wasserstoffperoxid produzierende Enzyme können durch Kulturbedingungen, insbesondere durch die Substratzusammensetzung, beeinflusst werden (Zhao und Janse 1996).

Bei einer Untersuchung von verschiedenen *Pleurotus* Stämmen in Emerskultur auf den Substraten Weizenstroh und Kaffeeschalen wurden Wasserstoffperoxid-konzentrationen von 13 bis 51 µg pro Gramm Substrat detektiert (Savoie *et al.* 2007). Dies korreliert gut mit den in dieser Arbeit bestimmten Konzentrationen (Tabelle 16 oben). Auch bei Savoie *et al.* (2007) wurden Unterschiede zwischen den verwendeten Substraten detektiert. Eine direkte Korrelation zwischen Wasserstoffperoxidkonzentration und Oxidaseaktivität wurde dagegen nicht gefunden. In einem weiteren Screening mit Stickstofflimitiertem Kirk-Medium (Kirk und Nakatsubo 1983) wurden 50 Basidiomyceten in Submerskultur untersucht (Eichlerova *et al.* 2006). Bei den drei verwendeten *Pleurotus* Stämmen wurden Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 0,8 bis 2,9 µg $g^{-1}_{Substrat}$ detektiert. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit eine andere Medienzusammensetzung verwendet, was die deutlich höheren Wasserstoff-peroxidkonzentrationen (Tabelle 16 unten) und höheren Enzymaktivitäten erklären könnte (Tabelle 17).

Tabelle 16: Wasserstoffperoxidgehalte in Extrakten beziehungsweise Überständen von Emers- und Submerskulturen des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* auf zwei verschiedenen Substraten

In Extrakten von Emerskulturen [µg $g^{-1}_{Substrat}$]		
Kulturtag	**Rapsstroh**	**Rückstand Biogasanlage**
28	60	38
42	30	68
56	38	30
84	23	30
112	0	0
In Überständen von Submerskulturen [µg $g^{-1}_{Substrat}$]		
2	59	90
4	110	80
6	70	41
8	70	60
10	80	120
12	290	20
14	100	80
16	90	70
18	110	70

Tabelle 17: Vergleich der maximalen Laccase- und Manganperoxidaseaktivitäten verschiedener *Pleurotus* Stämme in Abhängigkeit der verwendeten Medien;
*: Kirk und Nakatsubo 1983; **: Eichlerova *et al.* 2006; Tag der maximalen Aktivität wurde nicht angegeben, ***: eigene Daten (2.2.1.4 und 2.2.1.5)

Medium	**Stamm**	**Laccaseaktivität [U L^{-1}]**	**Manganperoxidase-aktivität [U L^{-1}]**
Kirk-Medium*	*P. citrinopileatus***	5,5	0,7
Kirk-Medium*	*P. eryngii***	108,6	1
Kirk-Medium*	*P. ostreatus***	73	0,7
Medium mit Rapsstroh (4.6.1.2)	*P. sapidus*	950 (Tag 2)	3,6 (Tag 2)
Medium mit Rückstand Biogasanlage (4.6.1.2)	*P. sapidus*	1880 (Tag 8)	160 (Tag 2)

In beiden Kultursystemen wurden die lignolytischen Enzyme in einer definierten, zeitlichen Reihenfolge exprimiert. Unterschiede zwischen den Kultursystemen und den verwendeten Substraten wurden bei einem Vergleich der maximalen Enzymaktivitäten deutlich (Tabelle 18).

In Emerskulturen mit Rapsstroh als Substrat wurden im Vergleich zum Rückstand einer Biogasanlage geringere Enzymaktivitäten detektiert. Eine Außnahme bildeten Esterasen, die mit nahezu doppelter Aktivität sekretiert wurden (Tabelle 18). Aktivtäten von Cellulasen und Xylanasen wurden während der gesamten Kultivierung detektiert (Abbildung 45). Während der Kultivierung wurden zuerst Maxima von oxidativen Enzymen wie Laccasen und Peroxidasen (4.7.1.1 und 4.7.1.3) detektiert. Im späteren Kulturverlauf folgten hydrolytische Aktivitäten und am Kulturende wurde nochmals Aktivität von polyvalenten Peroxidasen detektiert (Tabelle 18).

Wurde der Rückstand einer Biogasanlage in den Emerskulturen als Substrat genutzt, wurden bereits nach 28 Kulturtagen maximale Aktivitäten von Laccasen und Peroxidasen (4.7.1.1, 4.7.1.2 und 4.7.1.3) detektiert. Lipaseaktivität wurde ebenfalls bereits zu Beginn der Kultur gefunden. Im weiteren Kulturverlauf wurden die Aktivitäten von Cellulasen und Xylanasen detektiert. Nach 84 Kulturtagen wurde die höchste Esteraseaktivität detektiert (Tabelle 18).

In Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* verhielten sich die Enzymaktivitäten bei unterschiedlichen Kohlenstoffquellen nahezu identisch. Beim Substrat Rapsstroh wurden zunächst maximale Aktivitäten von Manganperoxidasen detektiert, gefolgt von Xylanasen und Esterasen. Im weiteren Kulturverlauf wurden die maximalen Aktivitäten von Laccasen, Cellulasen und anschließend Lipasen gefunden (Tabelle 18). Beim Rückstand einer Biogasanlage als Substrat wurden zunächst maximale Aktivitäten von Manganperoxidasen gefunden. Anschließend wurden die Maxima von Laccasen, polyvalente Peroxidasen und Esterasen detektiert. Die weiteren maximalen Aktivitäten von Cellulasen, Xylanasen und Lipasen wurden im weiteren Kulturverlauf gefunden (Tabelle 18).

Die höchsten Enzymaktivitäten im Rahmen dieser Arbeit wurden in Submerskulturen detektiert. Eine Ausnahme bildet die Manganperoxidase; hier

wurde die höchste Aktivität in der Emerskultur mit dem Rückstand einer Biogasanlage als Kohlenstoffquelle gefunden. Elisashvili *et al.* 2008 beschrieben ebenfalls für den nahen Verwandeten *Pleurotus ostreatus* die erhöhte Aktivität der Manganperoxidase in Emerskulturen im Vergleich zu Submerskulturen. Die hier detektierten Manganperoxidaseaktivitäten lagen in Submerskulturen im Spurenbereich und in Emerskulturen bei 200 U L^{-1}. In den untersuchten Kulturen von *Pleurotus sapidus* betrug die maximale Manganperoxidaseaktivität je nach eingesetztem Substrat 3 - 160 U L^{-1} in Submerskultur und 9 - 350 U L^{-1} in Emerskultur. Die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Kulturform wurde für verschiedene Pilze untersucht. Ziegenhagen und Hofrichter (2000) detektierten in Schüttelkulturen von *Clitocybula dusenii*, immobilisierten auf Cellulose und Poylpropylen, höhere Manganperoxidaseaktivitäten als in Oberflächenkulturen. Der Zuchtchampignon *Agaricus bisporus* dagegen wies in Oberflächenkulturen eine wesentlich höhere Laccaseproduktion (Kaluskar *et al.* 1999) als in Flüssigkulturen auf. Für den nahen Verwandten *Pleurotus ostreatus* konnte gezeigt werden, dass Schüttelkulturen gegenüber Oberflächenkulturen eine höhere lignolytische Aktivität aufwiesen (Ha *et al.* 2001). Dies trifft auch auf den hier untersuchten *Pleurotus sapidus* zu (Tabelle 18), wobei durch den Zusatz von Rückständen aus einer Biogasanlage insbesondere Laccase- und Peroxidaseaktivitäten induziert werden.

Tabelle 18: Maximale Enzymaktivitäten des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* in Emers- und Submerskulturen bei zwei verschiedenen Substraten; angegeben sind die Aktivitäten in Units pro Liter und in Klammern der jeweilige Kulturtag

Kultur	**Emers**		**Submers**	
Substrat	**Rapsstroh**	**Rückstand Biogasanlage**	**Rapsstroh**	**Rückstand Biogasanlage**
Laccase [U L^{-1}]	23 (28)	135 (28)	950 (2)	1880 (8)
Peroxidase [U L^{-1}]	1,3 (42)	6,3 (28)	76 (2)	980 (18)
Polyvalente Peroxidase [U L^{-1}]	0,7 (112)	0,85 (28)	8 (8)	22 (8)
Manganperoxidase [U L^{-1}]	8,9 (56)	350 (28)	3 (2)	160 (2)
Esterase [U L^{-1}]	20 (56)	12 (84)	156 (6)	100 (8)
Lipase [U L^{-1}]	2,2 (56)	5 (28)	93 (14)	195 (14)
Cellulase [U L^{-1}]	26 (56)	44 (42)	142 (8)	170 (10)
Xylanase [U L^{-1}]	111 (84).	138 (42)	1030 (6)	660 (10)

Isikhuemhen und Mikiashvilli (2009) untersuchten in einer Studie die lignolytischen Aktivitäten von *Pleurotus ostreatus* auf Weizenstroh mit dem Zusatz von Biogasanlagenrückständen. Die Aktivitäten von Laccasen, Cellulasen und Xylanasen waren direkt mit den in dieser Arbeit bestimmten Aktivitäten vergleichbar. Zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität wurde bei Isikhuemhen und Mikiashvilli (2009) ein anderes Substrat verwendet. *Pleurotus sapidus* wies in den untersuchten Kulturen geringere Laccase- und Peroxidaseaktivitäten auf als sein naher Verwandter *Pleurotus ostreatus* (Tabelle 19). Manganperoxidasen wiesen in den *Pleurotus sapidus* Kulturen höhere Aktivitäten auf. Die absoluten Aktivitäten ließen sich auf Grund der unterschiedlichen Subtrate nur bedingt vergleichen. Die Xylanase- und Cellulaseaktivitäten in den Kulturen von *Pleurotus sapidus* wurden mit höheren Aktivitäten detektiert als in *Pleurotus ostreatus*.

Tabelle 19: Enzymaktivitäten der Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus ostreatus* in Emerskulturen mit zwei verschiedenen Substraten, angegeben in Units pro Liter mit den jeweiligen Kulturtagen in Klammern; *: Isikhuemhen und Mikiashvilli (2009), Kulturtage 28-33, extrahiert wurde mit 6 mL $g^{-1}_{Substrat}$; **: in diesen enzymatischen Assays wurden unterschiedliche Substrate eingesetzt

	Pleurotus sapidus		***Pleurotus ostreatus****	
	Rapsstroh	**Rückstand Biogasanlage**	**Weizenstroh**	**Rückstand Biogasanlage**
Laccase [U L^{-1}]	23 (28)	133 (28)	100	143
Peroxidase [U L^{-1}]**	1,3 (42)	6,3 (28)	3	40
Manganperoxidase [U L^{-1}]**	8,9 (56)	370 (28)	5	30
Xylanase [U L^{-1}]	111 (84)	138 (42)	1,9	1,1
Cellulase [U L^{-1}]	26 (56)	44 (42)	1,1	0,3

3.2.1 Zellfreie Umsetzungen von Substraten

Durch den Abbau des Lignocelluloseverbundes werden im Laufe der Reaktion auch Zucker in Form von Glucose freigesetzt. Dieser Umstand wurde zur analytischen Auswertung des zellfreien Verdaus von Rapsstroh eingesetzt. Bei einer statischen Inkubation wurde das Enzymgemisch mit dem Rapsstroh zusammen über vier Tage inkubiert. Dies erbrachte geringere Glucosekonzentrationen als die dynamische Inkubation, bei der das Puffer/Enzymgemisch alle 24 Stunden vollständig ausgetauscht wurde. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Produktinhibierung einzelner Enzyme sein. Cellulasen werden beispielsweise durch das Produkt Glucose in ihrer Aktivität gehemmt (Kumar *et al.* 2008, Jing *et al.* 2009). Auch für Arylalkoholoxidasen sind eine Reihe von phenolischen Inhibitoren bekannt, die während des Lignocelluloseabbaus enstehen könnten (Ferreira *et al.* 2005). Ein zweiter Aspekt könnte die Temperaturstabilität der eingesetzten Enzyme sein. Snajdr und Baldrian (2008) wiesen bei einer Inkubation über 24 Stunden bei 30 bis 40 °C

einen 50%igen Aktivitätsverlust von Laccasen und Manganperoxidasen aus *Pleurotus ostreatus* nach.

Bei der Verwendung eines dynamischen Inkubationsansatzes wurden die Überstände alle 24 Stunden ausgetauscht. Hier boten sich vielfältige Kombinationsmöglichkeiten. Die Strategie von *Pleurotus sapidus* zur Spaltung von Lignocellulose zeichnete sich durch wechselnde oxidative und hydrolytische Enzymaktiviäten aus (2.2.1). Dies wurde in den zellfreien Verdauansätzen nachvollzogen. Eine Kombination aus wechselnder Laccase/Peroxidase- und Esteraseaktivität erwies sich als effektiv.

3.2.2 Zweidimensionale elektrophoretische Analyse des Sekretoms

Die Emerskulturen wurden, wie unter 4.6.1.12 beschrieben, extrahiert. Für die anschließende zweidimensionale elektrophoretische Trennung wurden die Überstände mittels Ultrafiltration konzentriert. Die Ausschlussgröße betrug 10 kDa; auf die Aufarbeitung kleinerer Proteine wurde verzichtet, da lignolytische Enzyme in der Regel größere Molekulargewichte aufweisen (Palmieri *et al.* 1993, Iimura *et al.* 2002). Die Konzentrate waren intensiv braun gefärbt, wobei die Färbung auch nach mehrmaligem Waschen nicht zu entfernen war. Zur Vermeidung von Störsubstanzen wurden die Proteine gefällt. Die Elektropherogramme, die nach einer Trichloressigsäurefällung erhalten wurden, wiesen eine Schlierenbildung im sauren Bereich auf (Abbildung 64). Außerdem waren die gefällten Proteine nicht mehr vollständig in Lösung zu bringen. Ähnliche Phänomene wurden bereits bei der Analyse von Pflanzenproteinen beobachtet. Interagierende Pigmente und phenolische Komponenten aus dem Abbau der Lignocellulose verursachen Ladungsunterschiede an den Proteinen und Schlierenbildung in der zweidimensionalen Elektrophorese (Hari 1981). Phenole verbleiben auf Grund ihrer besseren Löslichkeit vermutlich in der wässrigen Phase, so dass eine Methanol/Chloroform-Fällung (Wessel und Flügge 1984) eine Verbesserung der Proteinreinigung darstellte. Die so gefällten Proteinproben zeigten in der zweidimensionalen Elektrophorese eine deutlich geringere Schlierenbildung (Abbildung 65 und 71), waren jedoch ähnlich braun gefärbte wie nach der TCA-Fällung. Abhilfe bei noch vorhandenen niedermolekularen Störsubstanzen schaffte das Vorschalten eines 350 V

Schrittes im Elektrophoreseprogramm (4.7.5.4). Neben der Probenvorbereitung war die Sensitivität, Linearität und Homogenität der Färbemethode von großer Bedeutung für ein reproduzierbares Ergebnis. Zugleich durften keine Interferenzen mit nachfolgenden analytischen Methoden auftreten. Die zwei am häufigsten verwandten Färbemethoden sind die Silberfärbung und die Coomassiefärbung. Die Silberfärbung ist eine semi-quantitative Methode, da verschiedene Proteine unterschiedlich sensitiv gefärbt werden (Poehling und Neuhoff 1981), die mit MALDI-TOF- oder MS/MS-Analytik starke Interferenzen hervorruft (Gevaert und Vandekerckhove 2000). Die Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau ist eine sensitive, quantitative Methode (Neuhoff *et al.* 1988, Neuhoff *et al.* 1990), die keine Interferenzen mit nachfolgenden analytischen Methoden verursacht. Allerdings ist die Sensitivität mit ~ 100 ng pro Bande / Proteinspot um den Faktor zehn geringer als bei einer Silberfärbung (Rabilloud und Charmont 2000).

Für die kinetische Analyse der Proteinexpression ist eine hohe Reproduzierbarkeit der zweidimensionalen Elektropherogramme besonders wichtig. Dies wurde durch konstante Bedingungen bei der Kultivierung, der Ernte, der Aufarbeitung der Proben und Durchführung der Elektrophorese gewährleistet (Klose 1999, Fragner *et al.* 2009). Für die Analyse der Emerskulturen waren die Punkte Ernte und Aufarbeitung der Proben als besonders kritisch anzusehen, da eine gleichbleibende Menge Protein, sowie eine gleichbleibende Probenqualität pro Ernte erzielt werden sollte.

In Abbildung 66 sind die Elektropherogramme verschiedener Emerskulturen dargestellt. Die Spotanzahl zwischen einzelnen Kulturzeitpunkten schwankte, und auch die Schlierenbildung im sauren pH-Bereich zu späteren Kulturzeitpunkten war deutlich (Abbildung 66). Die Spots wurden in einem pI-Bereich von drei bis sechs detektiert und wiesen Molukulargewichte von 30 bis 120 kDa auf. Ein Vergleich der Elektropherogramme einer Submerskultur (Tag 9) und einer Emerskultur (Tag 14) (2.2.2.2) ergab eine höhere Spotanzahl für die Submerskultur. In den Messungen zur Enzymaktivität wurden in Submerskulturen ebenfalls höhere Aktivitäten detektiert. Gleichzeitig wurde eine wesentlich höhere

Proteinmenge erzielt, was die Aufarbeitung vereinfachte. Daher wurden die kinetischen Analysen auf die Submerskulturen von *Pleurotus sapidus* fokussiert.

3.2.3 Kinetische Analyse von Submerskulturen mit Rapsstroh

In der Vergangenheit sind einige Basidiomycetenenzyme identifiziert worden, die am Ligninabbau beteiligt sind. In *Schizophyllum commune* wurden aus Datenbankvergleichen 166 Gene mit signifikanten Ähnlichkeiten zu bereits sequenzierten Genen aus unterschiedlichen Basidiomyceten gefunden (Guettler *et al.* 2003). In *Pleurotus sapidus* wurden verschiedene Enzyme des lignolytischen Systems, wie zum Beispiel Hydrolasen, Peptidasen und eine polyvalente Peroxidase identifiziert (Zorn *et al.* 2005a). Die Gesamtheit der sekretierten Enzyme wurde jedoch nur wenig untersucht, zudem sind keine zeitabhängigen Analysen bekannt (Wymelenberg *et al.* 2005, Zorn *et al.* 2005b, Martinez *et al.* 2009). Zur Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Proteinsekretion von *Pleurotus sapidus* wurden Submerskulturen auf Rapsstroh nach drei, sechs, neun und zwölf Tagen aufgearbeitet. Die extrazellulären Enzyme wurden zweidimensional aufgetrennt, mittels MALDI-MS/MS *de novo* sequenziert, anschließend per Datenbankvergleich identifiziert und die Kinetik einzelner Spots analysiert. Bezogen wurden die Bestimmungen auf eine Mischprobe bestehend aus allen Einzelproben (Abbildung 71). Von den untersuchten 214 Proteinspots wurden mittels Datenbankrecherchen für 10% der Spots keine passenden Proteine gefunden. Für den hier verwendeten Organismus *Pleurotus sapidus* lagen nur vereinzelte Protein- und DNA-Sequenzen vor. Von dem nahen Verwandten *Pleurotus ostreatus* lagen nicht annotierte genomische Daten vor. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich 80% Glycosidasen, unter anderem Mitglieder von 10 verschiedenen Glycosid Hydrolase Familien (Anhang,Tabelle t4). Ebenso wurden Esterasen, Peptidasen, Lipasen und Oxidoreduktasen identifiziert. Im Sekretom ebenfalls nachgewiesen wurden Ubiquitin, ein zelluläres Enzym, Cyclophilin und ein Thaumatin-ähnliches Protein. Die intrazellulären Proteine Ubiquitin und Cyclophilin wurden vermutlich durch Zelllyse (= Autolyse) in das Medium abgegeben und so im Sekretom nachgewiesen. Autolyse wurde als physiologischer Prozess am Ende der stationären Wachstumsphase von filamentösen Pilzen beobachtet (McNeil *et al.* 1998, Harvey *et al.* 1998) und

findet ebenso in Pilzpelletts statt (Paul und Thomas 1998). Als messbare Auswirkungen der Autolyse wurden Rückgang der Biomasse, Freisetzen von Ammonium und Hyphenuntergang beschrieben (McNeil *et al.* 1998, Harvey *et al.* 1998). Cyclophilin und Ubiquitin wurden in der RNA von Pilzen, zum Beispiel des Basidiomyceten Trametes versicolor, nachgewiesen (Eyre *et al.* 2010). In früheren Untersuchungen mit sechzehn unterschiedlichen Pilzen wurde neben der Rolle des Cyclophilins während der Proteinfaltung auch ein Einfluss auf das prä-mRNA Splicing, zelluläre Signalwege, Transkription und Zellzyklusregulation beschrieben (Pemberton 2006). Ubiquitin spielt eine wichtige Rolle in proteolytischen Prozessen. Staszczak 2008 wies nach, das das Ubiquitin-Proteasom System eine wichtige Rolle in der Reaktion des Basidiomyceten Trametes versicolor auf eine Stickstofflimitierung einnimmt.

Die große Vielfalt an extrazellulären Glycosidhydrolasen wurde bereits im Sekretom von *Phanerodontia chrysosporium* beschrieben (Wymelenberg *et al.* 2005, *Ravalason et al. 2008*). Ebenso wie in *Phanaerochaete chrysosporium* wurden die extrazellulären Enzyme, wie Peptidasen, Esterasen und Lipasen auch in *Postia placenta* und in *Pleurotus sapidus* auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen nachgewiesen (Zorn *et al.* 2005b, Martinez *et al.* 2009). Im Gegensatz zu den erwähnten Sekretomstudien wurden in der massenspektrometrischen Analyse von *Pleurotus sapidus* keine Peroxidasen nachgewiesen. In den Submerskulturen wurden jedoch die Enzymaktivitäten von sowohl Manganperoxidasen als auch polyvalente Peroxidasen nachgewiesen (Abbildung 56). In der Übersichtsanalyse der Mischprobe (Abbildung 71) wurden einerseits Spots mit nicht zu identifizierenden Proteinen detektiert. Die erhaltenen Peptiddaten wurden keinen Proteinen mit bekannter Funktion zugeordnet. Andererseits wiesen die nicht analysierten Spots eine zu geringe Intensität beziehungsweise Proteinkonzentration für die massenspektrometrische Analyse auf. Weitere Proteine mit einer hohen Aktivität, aber geringeren Proteinkonzentrationen könnten unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Färbung von ~ 100 ng liegen (Rabilloud und Charmont 2000).

Zur Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Sekretion wurde für jeden Proteinspot eine Kinetik (Spotintensität gegen Zeit) erstellt. Auf Grund gleicher

oder ähnlicher Kinetiken wurden diese in einer Clusteranalyse zusammengefasst. Dabei wurden sieben verschiedene Cluster gefunden, die unterschiedliche Kinetiken repräsentieren. Einige der identifizierten Proteine ließen sich auf das gleiche *Pleurotus ostreatus* Protein beziehungsweise Gen zurückführen. Eine vollständige Auflistung der gefundenen Proteine und der dazugehörigen Gene befindet sich im Anhang (Tabelle t4). Bei einem Vergleich zwischen den Spotkinetiken und den Proteinidentifizierungen fiel auf, dass verschiedene Spots zwar dem gleichen Gen, aber unterschiedlichen Kinetiken zugeordnet wurden. Als Beispiel ist hier das Protein Pectat Lyase dargestellt (Abbildung 80). Zwölf unterschiedliche Proteinspots wurden diesem Protein zugeordnet, sie wiesen aber fünf unterschiedliche Kinetiken auf.

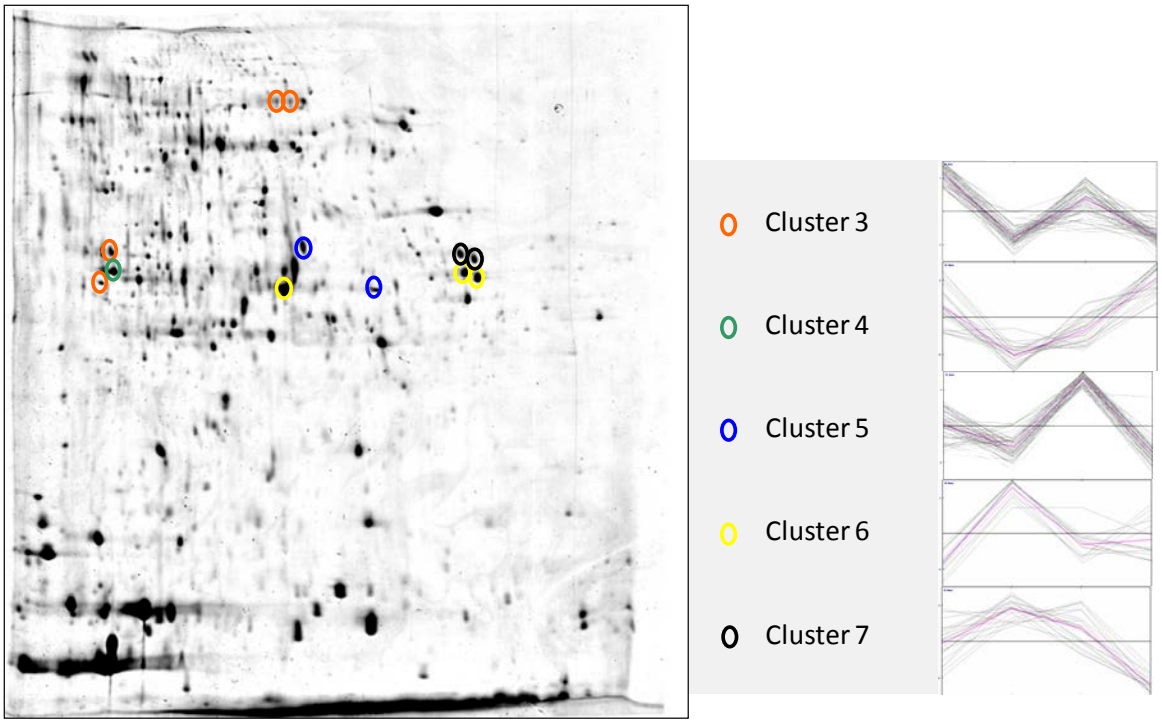


Abbildung 80: Darstellung des Proteins Pectat Lyase in allen gefundenen Spots mit dazugehöriger Kinetik

Die Ursache hierfür sind nicht nur mögliche Isoformen des Enzyms, sondern auch gleichzeitig stattfindende, unabhängige Prozessierungsschritte. Beobachtete Ketten von Proteinspots rühren in der Regel von einem einzelnen Prekursor her (Gooley und Packer 1997), die zum Beispiel unterschiedliche Glykosylierungsgrade aufweisen können. Eine weitere natürliche Ursache ist die peptidolytische Aktivität verschiedener Enzyme, die während der Kultur sekretiert

werden. Zur Verminderung dieses Effekts wurde bei der Probenvorbereitung ein Proteaseinhibitorcocktail eingesetzt (4.7.5.2). Auch chemische Veränderungen der Proteine während der zweidimensionalen Elektrophorese wie Deamidierung, Reduktion oder Alkylierung sind Ursachen für Spotketten (Abbildung 66, Tag 28). Bei der Deamidierung handelt es sich um die Umwandlung von Asparagin- und Glutaminresten in Aspartat beziehungsweise Glutamat (Sarioglu *et al.* 2000). Häufig findet auch eine Alkylierung der Proteine durch freie Monomere in den SDS-Gelen statt (Bordini *et al.* 1999, Bordini *et al.* 2000, Galvani *et al.* 2000). In den Standardprotokollen für die zweidimensionale Elektrophorese findet zwischen erster und zweiter Dimension eine Reduktion und Alkylierung statt. Herbert *et al.* (2001) wiesen nach, dass ohne geeignete Reduktion und Alkylierung der Disulfidbrücken anstelle von zwei Spots mehr als vierzig auf einem zweidimensionalen Elektropherogramm nachweisbar waren. Eine Erhöhung der Iodacetamidmenge und eine Verlängerung der Inkubationszeit hemmte die Kettenbildung (Yan *et al.* 1999). Allerdings wurde auch gezeigt, dass mit Iodacetamid innerhalb von zwei Minuten ein Alkylierungsgrad von 70% zu erreichen ist, eine vollständige Alkylierung allerdings bis zu sechs Stunden in Anspruch nimmt (Galvani *et al.* 2001).

Ein Vergleich der detektierten Enzymaktivitäten als Summenparameter mit den massenspektrometrisch identifizierten Enzymen wurde ebenfalls durchgeführt. In Tabelle 20 wurde eine Zusammenfassung der Enzymkinetik erstellt. Verglichen mit der Übersichtsanalyse (Tabelle 7) wurden Laccasen identifizert, die in den Spotintensitäten den gemessenen Enzymaktivitäten entsprechen. Es wurden sechs weitere Laccasen gefunden, die nicht dem Enzymexperessionsmuster aus Tabelle 6 entsprachen. In der kinetischen Analyse des Sekretoms (2.2.2.4) wurde dem Verlauf der Enzymexpression des Summenparameters Laccase der Cluster 3 (Abbildung 73) zugeordnet. Nur in diesem Cluster wurden Laccasen aus *Pleurotus sapidus* identifiziert. Weitere Enzymexpressionen wurden verschiedenen Clustern zugeordnet. Cellulasen, Xylansen und Peptidasen wurden dem Cluster 7 und Esterasen und Lipasen wurden dem Cluster 5 zugeordnet. In allen Clustern wurden entsprechende Hydrolasen identifiziert, so dass keine eindeutige Zuordnung getroffen wurde. Neben den bereits erwähnten möglichen Ursachen, wie zum Beispiel mögliche Isoformen der Enzyme,

unabhängige Prozessierungsschritte oder Proteaseaktivität könnten ebenso unterschiedliche Substratspezifitäten einzelner Enzyme hierfür verantwortlich sein.

Tabelle 20: Kinetik der Enzymexpression von *Pleurotus sapidus* mit Rapsstroh als Kohlenstoffquelle; ↑: die Aktivität steigt an; ↓: die Aktivität sinkt ab; -: gleichbleibende Aktivität

Aktivität	**Tag 3 nach Tag 6**	**Tag 6 nach Tag 9**	**Tag 9 nach Tag 12**
Laccase	↓	↑	-
Peroxidase	↓	↑	↓
Manganperoxidase	↑	↓	↑
Polyvalente Peroxidase	↑	↑	↓
Cellulase	↑	↓	↓
Xylanase	↑	↓	↓
Peptidase	↑	↓	↓
Esterase	↑	↑	↓
Lipase	-	↑	↓

3.3 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die polyvalente Peroxidase wurde rekombinant in *Hansenula polymorpha* exprimiert und ebenfalls biochemisch charakterisiert. In nachfolgenden Arbeiten soll die Expression der rekombinanten polyvalenten Peroxidase optimiert werden. Des Weiteren soll die dreidimensionale Struktur von Wildtyp und rekombinantem Enzym sowie die Glykosylierungsmuster verglichen und deren Auswirkungen auf Stabilität und Enzymkinetik untersucht werden.

Die extrazellulären Enzymaktivitäten wurden über den Kulturverlauf von *Pleurotus sapidus* hinweg untersucht. Verwendet wurden zwei Kultursysteme (Submers- und Emerskulturen) sowie zwei unterschiedliche Substrate. Interessante Ansätze für weitergehende Untersuchungen in diesem Arbeitsblock sind zum einen die weitere Untersuchung der Oberflächenkulturen mit enzymhistochemischen Methoden. Eine Untersuchung der intrazellulären Enzymaktivitäten könnte weitergehenden Aufschluss über die stoffliche Verwertung der Lignocellulosebruchstücke geben. Mit der Kenntnis der genomischen Daten von *Pleurotus ostreatus* könnten auch für die Analytik des *Pleurotus sapidus* verschiedene RT-PCR Techniken angewandt werden. Diese könnten Aufschluss über die Regulationsmechanismen während des Lignocelluloseabbaus geben. Einen wirtschaftlich interessanteren Ansatz bietet eine Inkubation der Rückstände einer Biogasanlage mit Enzymgemischen aus *Pleurotus sapidus*, mit anschließender anaerober Fermentation zur möglichen Steigerung der Ausbeute von Biogasanlagen.

Das Sekretom von *Pleurotus sapidus* in Submerskultur wurde massenspektrometrisch untersucht. Ein Ansatzpunkt für weitergehende Forschungen ist die Identifizierung aller gefundenen Proteine, sowie der Vergleich mit den sekretierten Enzymen in Oberflächenkulturen. Es werden aus bestehenden cDNA-Banken weitere, für den Lignocelluloseabbau notwendige, Enzyme identifiziert, kloniert und überexprimiert werden. In einer weiteren Arbeit wird bereits eine Arylalkoholoxidase und eine Lipase aus *Pleurotus sapidus* kloniert und näher charakterisiert (Christiane Lauber, laufende Arbeit).

In zellfreien Umsetzungen wurde für die gereinigte Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus* gezeigt, dass Umsetzungen von Ligninmodellsubstraten, Lignin organosolv (Sigma, 371017) und Rapsstroh möglich waren. Mit Überständen aus *Pleurotus sapidus* Submerskulturen waren Umsetzungen von Rapsstroh möglich. In weiteren Arbeiten soll die Fähigkeit einzelner Enzyme und von Enzymkombinationen gezeigt werden, aus Rapsstroh lösliche Ligninfraktionen zu gewinnen. Ziel ist eine quantitative Umsetzung von Rapsstroh und weiteren Lignocellulosen. Gleichzeitig soll die Zusammensetzung dieser Fraktionen mittels LC-MS/MS und GC-MS/MS untersucht werden. Ebenso sollen Anwendungsmöglichkeiten für Ligninfraktionen untersucht werden.

4 Experimenteller Teil

4.1 Verwendete Mikroorganismen

In dieser Arbeit wurde der Basidiomycet *Pleurotus sapidus* (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Stammnummer: 8266) verwendet. *Hansenula polymorpha* RB11-Stämme (Genotyp *ura*3) wurden von der Firma ARTES Biotechnology GmbH gentechnisch verändert und zur Verfügung gestellt.

4.2 Verwendete Geräte

Geräte, die hier nicht aufgeführt wurden, werden in den nachfolgenden Abschnitten spezifiziert.

Tabelle 21: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	LABOKLAV 25 Basic	SHP-Steriltechnik, Magdeburg
Autoklav	LABOKLAV 160 MSL	SHP-Steriltechnik
Brutschrank	INE 500	Memmert, Schwabach
Eismaschine	AF 80 Scotsman	Frimont, Mailand (I)
Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Twin S und M	Peqlab, Erlangen
Inkubationsschrank	Infors HAT	Infors HAT, Einsbach
Kühlblock Thermostat	TK13 und TK 23	HLC Biotech, Bovenden
Laborbrenner	Fuego SCS basic	WLD-TEC, Arenshausen
Mühle	Polymix PX-MFC90D	Kinematica AG, Luzern (CH)
pH-Meter	SevenEasy S20	Mettler Toledo, Gießen
Photometer	SPECORD® 50	Analytik Jena, Jena
Plattenreader	Synergy 2	BioTek, Winooski (USA)
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-210	Büchi, Essen
Sterile Werkbank	HERAsafe	Heraeus, Osterode
Tank-Elektroblotter	PerfectBlue Web S	Peqlab

Ultraschallbad	Transsonic T 710 DH	ELMA, Singen
Ultra-Turrax	T25 Digital	IKA, Staufen
Umwälzkühler	Minichiller	Huber, Offenburg
Vortexer	Reagenzglasschüttler	VWR, Darmstadt
Waage	ATL6202i	Sartorius, Göttingen
Waage	BD211D	Sartorius
Wasserbad	Aqualine AL 18 Liter	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Allegra X-15R	Beckmann-Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Allegra SX4750A	Beckmann-Coulter

4.3 Verwendete Chemikalien

Tabelle 22: Verwendete Chemikalien, Auflistung mit Reinheit, Firma und Bestellnummer

Chemikalie	Reinheit	Firma	Bestellnummer
2,2´-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS)		Sigma (Taufkirchen)	11557
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF)	Biochemica	Sigma	A8456
Aceton	p.a.	Roth (Karlsruhe)	5025.6
Acetonitril	HPLC	Roth	7330.2
Adlerol		Wako (Neuss)	044-30473
Agar Agar Kobe I	reinst	Roth	5210.3
Agarose LE		Biozym (Hess. Oldendorf)	840004
Albumin Fraktion V	98%	Roth	T844.1
Aluminiumsulfat Monohydrat		Roth	3731.1
Ammoniumnitrat	zur Analyse	Applichem (Darmstadt)	A1031,1000
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	p.a.	Applichem	A2941,0100
Ammoniumsulfat	min99,5%	Roth	3746.3
Anodenpuffer		Serva (Heidelberg)	42539
L-Asparagin Monohydrat	reinst	Applichem	A3669,1000
Azocasein		Sigma	A2765
β,β-Carotin		Sigma	22040
Bromphenolblau		Roth	A512
Catalase		Serva	26905.01
3-[(3-Chloramidopropyl)dimethyl-amino]-1-propansulfonat (CHAPS)	>98%	Roth	1479.1
Chloroform	p.a.	Roth	3313.1

Citronensäure		Roth	6490.1
Coniferylalkohol	98%	Sigma	223735
Coomassie Brilliant Blau G250	reinst	Applichem	A3480,0025
Dichlormethan	reinst	Roth	CP45
Diethylether	p.a.	Roth	3942.4
Dithiothreitol (DTT)		Applichem	A2948,0005
3,4-Dimethoxybenzylalkohol (Veratrylalkohol)		Sigma	D133000
2,6-Dimethoxyphenol (Syringol)		Sigma	D135550
Dinitrosalicylsäure		Sigma	42260
trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)butan (E64)	research	Applichem	A2157,0005
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	> 99%	Roth	X986
Eisen(III)chlorid Hexahydrat	>99,5%	Applichem	A3514,0250
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	>99,5%	Roth	3722.1
Essigsäure 100% (Eisessig)	p.a.	Roth	3738.1
Ethanol	99,5% reinst	Roth	5054.2
Folin-Ciocalteau Phenolreagenz		Merck (Darmstadt)	1.09001.0100
Formaldehyd 37%		Roth	4979.1
Gallussäure	99%	Alfa Aesar (Karlsruhe)	B24887,0250
D-(+)-Glucose Monohydrat		Roth	6887.1
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase		Fluka (Neu-Ulm)	49275
Gummi arabicum		Sigma	G9752
Glutardialdehyd	~50%	Roth	4995.1
Glycerol	98%	Roth	7530.1
Glycin	>99% p.a.	Roth	3908.2
Harnstoff	>99,5%	Roth	2317.3
Hefeextrakt		Fisher Scientific	BP1422-2
Hexokinase		Sigma	H4502
Hydroxyethylcellulose		Sigma	434965
Isopropanol	p.a.	Roth	6752.4
Iodacetamid	BioChemica	Applichem	A1666,0025
Kaliumchlorid	p.a.	Roth	6781.3
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	Roth	3904.1
Kaliumhydogenphosphat wasserfrei	p.a.	Applichem	A3620,1000
Kaliumhydroxid	>85%	Roth	6751.1
Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat (Rochelle Salz)	p.a.	Roth	8087.2
Kathodenpuffer		Serva	42539
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	zur Analyse	Applichem	A1034,0500
Lignin organosolv		Sigma	371017
Magnesiumsulfat getrocknet	zur Analyse	Applichem	A1879,1000
Malonsäure	99%	Sigma	M1296
Mangan(II)sulfat Hydrat	zur Analyse	Applichem	A1038,0250
Methanol		Roth	4627.2
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Dinatriumsalz (NADP)	Biochemica	Roth	AE13.3
Natriumacetat Tetrahydrat	p.a.	Applichem	A1522,1000
Natriumchlorid	99,5% p.a.	Roth	3957.1
Natriumcitrat	>99% p.a.	Roth	3580.1

Natriumdesoxycholat	>98%	Roth	3484.1
Natriumdodecylsulfat		Merck	8.170.341.000
Natriumhydrogencarbonat	p.a.	Roth	6885.1
Natriumhydroxid	99%	Roth	6771.1
Natriumnitrat	99%	Alfa Aesar	14493,0100
Natriumtartrat Dihydrat	zur Analyse	Applichem	A2662,0500
Natriumthiosulfat Pentahydrat	p.a.	Roth	P034.1
Natronlauge 1N	Maßlösung	Roth	K021.1
p-Nitrophenylpalmitat		Sigma	N2752
p-Nitrophenylacetat		Sigma	N8130
n-Pentan	>99% p.a.	Roth	4978.2
Pepstatin A		Applichem	A2205,0025
Phenanthrolin-1,10 Monohydrat		Applichem	A3826,0010
o-Phosphorsäure	>85% p.a.	Roth	6366.1
Roti-Quant		Roth	K880.1
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)		Roth	T802.1
Salzsäure	37% reinst	Roth	9277.1
Schwefelsäure	96%, p.a.	Roth	4623.5
Silbernitrat	99,90%	Roth	7908.1
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	p.a.	Applichem	A1148,0100
Titan(IV)oxidsulfat-Lösung		Sigma	89532
Trichloressigsäure-Lösung	10%	Roth	9383.2
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (TRIS)		Roth	9090.3
TritonX100	reinst	Roth	3051.3
Tween 80	p.a.	Roth	9139.2
Wasserstoffperoxid	30% p.a.	Roth	8070.2
L-Weinsäure	99,80%	Roth	K302.1
Xylan aus Birkenholz		Sigma	95588
Xylose	99%	Roth	5537.1
Yeast Nitrogen Base Medium (YNB)		BD (Heidelberg)	233520
Zinksulfat Heptahydrat	p.a.	Applichem	A1050,0500

Für die Methoden wurde, wenn nicht anders angegeben vollentsalztes Wasser (spezifischer Widerstand $\rho > 18{,}2\ M\Omega \times cm$) eingesetzt (im Folgenden mit „Reinstwasser“ bezeichnet).

4.4 Verwendete Ultrafiltrationseinheiten

- Millipore, Schwalbach; Membran: regenerierte Cellulose
  - Amicon Ultra® Volumen: 15 mL
- Pall Life Science, Dreieich; Membran: Polyethersulfon
  - Nanosep® Volumen: 500 µL
  - Macrosep® Volumen: 15 mL
  - Jumbosep® Volumen: 50 mL

4.5 Verwendete Gase für die Gaschromatographie

Tabelle 23: Verwendete Gase

Gas	Qualität	Lieferant	Verwendung
Helium	5.0	Air Liquid, Siegen	Trägergas GC-MS
Stickstoff	5.0	Air Liquid, Siegen	Schutzgas, Detektorgas
Wasserstoff	5.0	Air Liquid, Siegen	Trägergas, Detektorgas

4.6 Mikrobiologie

Die Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Hansenula polymorpha* sowie die Probennahmen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

4.6.1 Kultivierung von Basidiomyceten

4.6.1.1 Standardnährlösung-(SNL)-Medium (Sprecher 1959)

D-(+)-Glucose Monohydrat	30,0 g L^{-1}
L-Asparagin Monohydrat	4,5 g L^{-1}
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L^{-1}
Magnesiumsulfat	0,5 g L^{-1}
Hefeextrakt	3,0 g L^{-1}
Spurenelementlösung	1 mL L^{-1}

Das Medium wurde mit 1 M Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt und autoklaviert (121 °C, 20 min).

Zur Herstellung von Stammhaltungsplatten wurde dem Medium 15 g L^{-1} Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugefügt.

4.6.1.2 Hauptkulturmedium

Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L^{-1}
Magnesiumsulfat	0,5 g L^{-1}
Hefeextrakt	2,0 g L^{-1}
Spurenelementlösung	1 mL L^{-1}
Rapsstroh bzw. Rückstand Biogasanlage	20 g L^{-1}

Das Medium wurde mit 1 M Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt und autoklaviert (121 °C, 20 min).

4.6.1.3 Spurenelementlösung

Eisen(III)chlorid Hexahydrat	0,08 g L^{-1}
Zinksulfat Heptahydrat	0,09 g L^{-1}
Mangansulfat Hydrat	0,03 g L^{-1}
Kupfersulfat Pentahydrat	0,005 g L^{-1}
EDTA	0,4 g L^{-1}

Die Lösung wurde vor Gebrauch sterilfiltriert.

4.6.1.4 Extraktionspuffer (Pant und Adholeya 2007)

TRIS	50 mM

Die Lösung wurde mit 50 mM Malonsäure auf pH 6,0 eingestellt.

4.6.1.5 Peptidaseinhibitor

	Mix 1	Mix 2
AEBSF	100 µM	25 µM
E64	1 µM	0,25 µM
1,10-Phenanthrolin	1 mM	250 µM
Pepstatin	1 µM	

Die Substanzen wurden in Ethanol (>99,5%, reinst) gelöst.

4.6.1.6 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Pleurotus sapidus* (DSMZ 8266) erfolgte auf (SNL)-Agarplatten, welche zuvor mit einem etwa 1 cm^2-großen bewachsenen Agarstück angeimpft wurden, im Brutschrank bei 24 °C. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

4.6.1.7 Vorkultur

Für die Vorkultur wurden mit 100 mL SNL-Medium (4.6.1.1) befüllte 250 mL Erlenmeyerkolben mit Fertigstopfen aus Zellwatte verwendet. Ein ca. 1 cm² großes, mit Pilzmycel bewachsenes, Agarstück wurde steril aus einer Agar-Stammkultur geschnitten und in SNL-Medium überführt. Anschließend wurde das Agarstück mittels Ultraturraxstab homogenisiert (15 s). Die Kolben wurden für 7 Tage bei 24 °C und 150 rpm im Schüttelschrank unter Lichtausschluss inkubiert.

4.6.1.8 Submerskultur (Hauptkultur)

Für die Hauptkulturen wurden mit 200 mL Hauptkulturmedium (4.6.1.2) befüllte 500 mL Erlenmeyerkolben mit Fertigstopfen aus Zellwatte verwendet. Die Vorkultur wurde mittels Ultraturraxstab homogenisiert (15 s). Das Hauptkulturmedium wurde inokuliert (1 mL Vorkultur pro 10 mL Hauptkulturmedium) und die Kolben bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

4.6.1.9 Submerskultur (Volumenvergrößerung)

Für die Hauptkulturen wurden mit 400 mL Hauptkulturmedium (4.6.1.2) befüllte 1000 mL Erlenmeyerkolben mit Fertigstopfen aus Zellwatte verwendet. Die Vorkultur wurde mittels Ultraturraxstab homogenisiert (15 s). Das Hauptkulturmedium wurde inokuliert (1 mL Vorkultur pro 10 mL Hauptkulturmedium) und die Kolben bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

4.6.1.10 Ernte der Submerskulturen

Zur Abtrennung des Mycels vom Kulturüberstand wurden die Kulturen über einen Büchnertrichter filtriert. Der Kulturüberstand wurde in einer Saugflasche aufgefangen und direkt auf 4 °C gekühlt. Die Kultur wurde geteilt, und die Hälfte davon mit einem Peptidaseinhibitor (4.6.1.5) versetzt. Die Kulturen wurden bei -20 °C gelagert.

4.6.1.11 Emerskultur (Hauptkultur)

Für die Emerskulturen wurde die Vorkultur zunächst 1:1 mit Hauptkulturmedium (4.6.1.2) verdünnt, und mittels Ultraturrax homogenisiert (15 s). Pro 10 g Feststoff

wurden 15 mL Hauptkulturmedium zugegeben und mit 10 mL verdünnter Vorkultur inokuliert. Die Kulturen wurden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Alle zwei Wochen wurde den Kulturen 15 mL Reinstwasser zugeführt.

4.6.1.12 Ernte der Emerskulturen

Pro 10 g Feststoff wurden 50 mL Extraktionspuffer (4.6.1.4) eingesetzt. Die Kulturen wurden für eine Stunde bei 24 °C und 150 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend für 10 min im Ultraschallbad extrahiert und über einen Büchnertrichter abfiltriert. Der Extrakt wurde in einer Saugflasche aufgefangen und direkt auf 4 °C gekühlt. Der Extrakt wurde geteilt und die Hälfte davon mit einem Peptidaseinhibitor (4.6.1.5) versetzt. Die Kulturen wurden bei -20 °C gelagert.

4.6.2 Kultivierung von *Hansenula polymorpha*

4.6.2.1 Wachstumsmedium (YNB-Medium)

YNB	1,7 g L^{-1}
Ammoniumsulfat	5 g L^{-1}
Glucose	20 g L^{-1}

Das Medium wurde mit 1 M Natronlauge auf pH 6,0 eingestellt und autoklaviert (121 °C, 20 min).

Zur Herstellung von Stammhaltungsplatten wurde dem Medium 15 g L^{-1} Agar-Agar vor dem Autoklavieren zugefügt.

4.6.2.2 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Hansenula polymorpha* erfolgte auf (YNB)-Agarplatten im Brutschrank bei 37 °C für 12-16 Stunden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

4.6.2.3 Vorkultur

Für die Übernachtkultur wurden Klone in 5 mL YNB-Medium (4.6.2.1) überführt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Vorkultur wurde 1:10 aus der Übernachtkultur angeimpft und wiederum über Nacht inkubiert (Repressionsphase).

4.6.2.4 Hauptkultur

Für die Hauptkulturen wurden mit 250 mL Kulturmedium (4.6.2.1) plus 2% (v/v) Glycerol befüllte 500 mL Erlenmeyerkolben mit Fertigstopfen aus Zellwatte verwendet. Die Hauptkultur wurde eins zu fünfzehn aus der Vorkultur angeimpft und die Kolben bei 37 °C und 250 rpm für 40 Stunden inkubiert (Derepressionsphase). Nach 40 Stunden wurde der Kultur 1% (v/v) Methanol zugefügt und die Kulturen für weitere 24 Stunden inkubiert (Expressionphase).

4.6.2.5 Ernte der Submerskulturen

Zur Ernte wurden die Kulturen 15 min bei 3.500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Ultrafiltration (Macrosep®, cut-off: 10 kDa, Pall) konzentriert. Das Konzentrat wurde zweimal mit Reinstwasser gewaschen und direkt auf 4 °C gekühlt.

4.7 Proteinanalytik

4.7.1 Enzymaktivitäten

Die Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, wie folgt durchgeführt: die Reaktionen erfolgten in Mikrotiterplatten, in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5 bei 30 °C. Der Lichtweg in einer 96er Platte betrug bei 250 µL Gesamtvolumen 0,8 cm. Die Versuchsansätze wurden im Plattenreader mit folgendem Messzyklus analysiert:

Preheat	abhängig von der zu messenden Aktivität
Shake plate	*fast,* 3 Sekunden
Kinetic	5 - 15 Minuten, abhängig von der zu messenden Aktivität
Read	Wavelength: abhängig, minimum Interval

4.7.1.1 ABTS-Assay – Bestimmung von Laccase- und Peroxidaseaktivität

Zur Bestimmung der Laccaseaktivität wurde ABTS verwendet. Der Assay (modifiziert Wolfenden und Willson 1982) wurde wie folgt durchgeführt:

50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	50 µL
Catalase 6 U μL^{-1} in	
50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	50 µL
1,25 mM ABTS	100 µL
Kulturüberstand	50 µL

Der Versuchsansatz wurde bei 30 °C inkubiert, und die Extinktionszunahme wurde über 5 min bei λ = 420 nm aufgezeichnet.

Als Blindwert wurde die Extinktionänderung ohne Zugabe der Probe gemessen.

Zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität wurde der Assay nach Childs und Bardsley 1975 modifiziert und wie folgt durchgeführt:

1,75 mM Wasserstoffperoxid in	
50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	50 µL
50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	50 µL
1,25 mM ABTS	100 µL
Kulturüberstand	50 µL

Der Versuchsansatz wurde bei 30 °C inkubiert, und die Enzymkinetik (Extinktionszunahme) wurde über 5 min bei λ = 420 nm aufgezeichnet. Die Extinktionsdifferenz $\Delta E_{420\,nm}$ sollte Extinktionseinheiten zwischen 0,10 und 0,25 min^{-1} aufweisen, andernfalls war der Kulturüberstand mit Puffer zu verdünnen.

Berechnung:

1 U entspricht der Enzymenge, die 1 µmol ABTS pro Minute oxidiert.

$$U\,L^{-1} = \frac{\Delta E_{420\,nm} \cdot V_{gesamt} \cdot F}{V_{Kulturüberstand} \cdot \varepsilon_{ABTS,\,420\,nm} \cdot d}$$

mit:

$\Delta E_{420\,nm/Laccase}$ = Steigung pro Minute

$\Delta E_{420\,nm/Peroxidase}$ = $\Delta E_{420\,nm/Peroxidase,\,Laccase} - \Delta E_{420\,nm/Laccase}$

V_{gesamt} = 0,25 mL

$V_{Kulturüberstand}$ = 0,05 mL

d = 0,8 cm

$\varepsilon_{ABTS\ (420\ nm)}$ = 0,0432 L µmol^{-1} cm^{-1}

F = Verdünnungsfaktor

4.7.1.2 Manganperoxidase-Aktivität

Im Testsystem diente Syringol (2,6-Dimethoxyphenol) als Substrat (Wariishi *et al.* 1992). Syringol ist ebenfalls ein Substrat für Lacasen und andere Peroxidasen. Daher wurden zwei verschiedene Messwerte (mit und ohne Zusatz von Mangansulfat) ermittelt.

Versuchsansatz ohne Mangansulfatzusatz:

50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	50 µL
1,75 mM Wasserstoffperoxid in	
50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	50 µL
0,5 mM Syringol	50 µL
Kulturüberstand	100 µL

Versuchsansatz mit Mangansulfatzusatz:

1 mM Mangansulfat	50 µL
1,75 mM Wasserstoffperoxid in	
50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	50 µL
0,5 mM Syringol	50 µL
Kulturüberstand	100 µL

Beide Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert und die Messung der Extinktionsänderung erfolgte bei λ = 469 nm. Die Extinktionsdifferenz $\Delta E_{469\ nm}$ sollte Extinktionseinheiten zwischen 0,15 und 0,40 min^{-1} aufweisen, andernfalls war der Kulturüberstand mit Puffer zu verdünnen. Bei der Berechnung der Manganperoxidase Aktivität (Ansatz mit Mangansulfatzusatz) wurde der Messwert der Peroxidase/Laccase- Aktivität (Ansatz ohne Mangansulfatzusatz) hiervon abgezogen.

Berechnung:

1 U entspricht der Enzymmenge, die 1 µmol Syringol pro Minute oxidiert.

$$UL^{-1} = \frac{\Delta E_{469\,nm} \cdot V_{gesamt} \cdot F}{V_{Kulturüberstand} \cdot \varepsilon_{Syringaldehyd,\,469\,nm} \cdot d}$$

mit:

$\Delta E_{469\ nm}$ = $\Delta E_{469\ nm/mit\ Mangansulfatzusatz}$ - $\Delta E_{469\ nm/ohne\ Mangansulfatzusatz}$

V_{gesamt} = 0,25 mL

$V_{Kulturüberstand}$ = 0,1 mL

d = 0,8 cm

$\varepsilon_{469\ nm}$ = 0,0275 L µmol^{-1} cm^{-1} (Saparrat *et al.* 2002)

F = Verdünnungsfaktor

4.7.1.3 *β,β*-Carotin-Assay

Herstellung des Substrats: Zur Herstellung der *β,β*-Carotin-Lösung wurden 500 mg Tween 80 und 5 mg *β,β*-Carotin in 15 mL Dichlormethan gelöst und 4 min bei 800 mbar, 40 °C und 150 rpm einrotiert. Anschließend wurden 20 mL Reinstwasser zugefügt; das restliche Dichlormethan wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C, 150 rpm in folgenden 4-Minuten-Schritten entfernt: 800, 600, 400 und 200 mbar. Die Lösung wurde unter einem Stickstoffstrom filtriert, mit Reinstwasser auf 50 mL aufgefüllt und aliquotiert. Die Lösung war bei 4 °C eine Woche haltbar.

Für den modifizierten Enzymassay (Hülsdau 2007) wurde der Ansatz

β,β-Carotin-Lösung 1:4 verdünnt in	
50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	100 µL
1,75 mM Wasserstoffperoxid in	
50 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5	50 µL
Kulturüberstand	100 µL

bei 30 °C inkubiert. Die Aufnahme der Extinktionsänderung erfolgte bei λ = 450 nm über 10 Minuten. Die Startextinktion sollte bei 1,5 liegen, andernfalls ist die *β,β*-Carotin-Lösung weiter zu verdünnen. Die Extinktionsdifferenz (Abnahme) $\Delta E_{450\ nm}$ sollte Extinktionseinheiten zwischen 0,005 und 0,020 min^{-1} aufweisen, andernfalls war der Kulturüberstand mit Puffer zu verdünnen.

Berechnung:

1 U entspricht der Enzymmenge, die 1 µmol *β,β*-Carotin pro Minute oxidiert.

$$UL^{-1} = \frac{\Delta E_{450\,nm} \cdot V_{gesamt} \cdot F}{V_{Kulturüberstand} \cdot \varepsilon_{\beta,\beta\text{-Carotin, }450\,nm} \cdot d}$$

mit:

V_{gesamt} = 0,25 mL

$V_{Kulturüberstand}$ = 0,1 mL

d = 0,8 cm

$\varepsilon_{\beta,\beta\text{ –Carotin 450 nm}}$ = 0,095 L µmol^{-1} cm^{-1} (Langhoff 2002)

F = Verdünnungsfaktor

4.7.1.4 Esterase-Aktivität

Die Esteraseaktivität wurde mit Hilfe des Essigsäureesters *p*-Nitrophenylacetat bestimmt (Purdy und Kolattukudy 1973).

35 mM *p*-Nitrophenylacetat in Ethanol	5 µL
80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0	145 µL
Kulturüberstand	100 µL

Der Versuchsansatz wurde bei 37 °C inkubiert und die Aufnahme der Extinktionsänderung erfolgte bei λ = 405 nm. Die Extinktionsdifferenz $\Delta E_{405\,nm}$ sollte Extinktionseinheiten zwischen 0,15 und 0,4 min^{-1} aufweisen, andernfalls war der Kulturüberstand mit Puffer zu verdünnen Als Blindwert wurde die Extinktionsänderung ohne Zugabe der Probe gemessen.

Berechnung:

1 U entspricht der Enzymmenge, die 1 µmol *p*-Nitrophenylacetat pro Minute bei pH 8,0 und 37 °C hydrolysiert. Die Substratstabilität im Puffer betrug 30 Minuten.

$$UL^{-1} = \frac{\Delta E_{405\,nm} \cdot V_{gesamt} \cdot F}{V_{Kulturüberstand} \cdot \varepsilon_{p\text{–Nitrophenol,}405\,nm} \cdot d}$$

V_{gesamt} = 0,25 mL

$V_{Kulturüberstand}$ = 0,1 mL

d = 0,8 cm

$\varepsilon_{p\text{-Nitrophenol } 405\text{ nm}}$ = 0,0183 L µmol^{-1} cm^{-1}

F = Verdünnungsfaktor

4.7.1.5 Peptidase-Aktivität

Im Testsystem diente Azocasein (Casein mit Azofarbstoff Sulfanilsäure) als Substrat. Der TCA-löslichen, markierten Aminosäuren wurden im Photometer bei λ = 366 nm vermessen (Kilcawley *et al.* 2002). Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und ein Blindwert ermittelt. Für den Blindwert wurde der Kulturüberstand bei 95 °C für 15 Minuten im Wasserbad erhitzt. Der Ansatz

0,1 M Tris/HCl Puffer pH 6,0	240 µL
0,5%ige Azocaseinlösung in Wasser	80 µL

wurde 5 Minuten bei 40 °C vorgewärmt, und

Kulturüberstand	80 µL

zugefügt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 40 °C wurden jeweils 600 µL 3%ige Trichloressigsäure zugesetzt. Die Proben wurden für 10 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für 10 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei λ = 366 nm gegen Wasser.

Berechnung:

1 U entspricht der Enzymmenge, die in 1 Stunde eine Extinktionsdifferenz von 0,01 hervorruft.

$$U\,mL^{-1} = \frac{\Delta E_{366\text{ nm}} \cdot 60\,min}{V_{Kulturüberstand} \cdot 15\,min \cdot 0{,}01} = \Delta E \cdot \frac{60\,min}{0{,}08\,mL \cdot 15\,min \cdot 0{,}01} = \Delta E \cdot 5.000$$

$\Delta E_{366\text{ nm}} = \Delta E_{Blind} - \Delta E_{Probe}$

$V_{Kulturüberstand}$ = 0,08 mL

4.7.1.6 Cellulase-Aktivität (Endoglucanase nach Bailey 1988)

Substratherstellung: Zur Herstellung des Substrats wurden 1,0% Hydroxyethylcellulose in 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 4,8 gelöst, 1 Stunde gerührt und anschließend 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

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 µmol 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 hinzugefügen. 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 Substrat für 5 Minuten auf 50 °C vorgewärmt, und 40 µL Kulturüberstand zugefügt. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei 50 °C inkubiert und nach Ablauf der Zeit (exaktes Arbeiten) wurden 600 µL DNS-Lösung zugegeben, gemischt und 5 Minuten gekocht. Nach exakt 5-minütiger Abkühlung auf Eis wurde die Extinktion spektrophotometrisch bei λ = 540 nm bestimmt.

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

4.7.1.7 Xylanase-Aktivität (Endoxylanase Bailey *et al.* 1991)

Substratherstellung: Zur Herstellung des Substrats wurden 1,0% Xylan in 0,05 M Natriumcitratpuffer pH 4,8 bei 60 °C gelöst und anschließend bis zu Siedepunkt erhitzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung der Xylose-Kalibrierreihe wurden 0,15 g Xylose in 100 mL 0,01 M Natriumcitratpuffer pH 4,8 gelöst und Verdünnungen im Bereich von 1 bis 4 µmol mL^{-1} angesetzt.

Die Durchführung erfolgte wie unter 4.7.1.6 beschrieben.

4.7.1.8 Lipase-Aktivität (Winkler und Stuckmann 1979)

Zur Herstellung der Substratlösung wurden 30 mg *p*-Nitrophenylpalmitat (pNPP) in 10 mL Isopropanol im Ultraschallbad gelöst. 90 mL 50 mM Sörensenphosphatpuffer pH 8,0, 207 mg Natriumdesoxycholat und 100 mg Gummi arabicum wurden zugefügt. Die Suspension wurde für 10 Minuten im Ultraschallbad behandelt.

Versuchsansatz:

Substratlösung	200 µL
Kulturüberstand	50 µL.

Der Versuchsansatz wurde bei 37 °C inkubiert und die Messung der Extinktionsänderung erfolgte bei λ = 405 nm. Die Extinktionsdifferenz $\Delta E_{405\,nm}$ sollte Extinktionseinheiten zwischen 0,15 und 0,4 min^{-1} aufweisen, andernfalls war der Kulturüberstand mit Puffer zu verdünnen. Als Blindwert wurde die Extinktionsänderung ohne Zugabe der Probe gemessen.

Berechnung:

1 U enstpricht der Enzymmenge, die 1 µmol *p*-Nitrophenylpalmitat pro Minute bei pH 8,0 und 37 °C hydrolysiert.

$$UL^{-1} = \frac{\Delta E_{405\,nm} \cdot V_{gesamt} \cdot F}{V_{Kulturüberstand} \cdot \varepsilon_{p-Nitrophenol,405\,nm} \cdot d}$$

V_{gesamt} = 0,25 mL

$V_{Kulturüberstand}$ = 0,1 mL

d = 0,8 cm

$\varepsilon_{p\text{-Nitrophenol }405\text{ nm}}$ = 0,0183 L μmol^{-1} cm^{-1}

F = Verdünnungsfaktor

4.7.1.9 Phenolgehalt (Gutfinger 1981)

Die Quantifizierung der Phenolgehalte erfolgte mittels Folin-Ciocalteau Reagenz und einer Natriumcarbonatlösung. Phenole wurden so zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Der Ansatz

80 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5	50 µL
Folin-Ciocalteau 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 λ = 725 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Kalibriergerade. Es wurde Gallussäure im Konzentrationsbereich von 1 bis 50 µg mL^{-1} verwendet.

4.7.1.10 Wasserstoffperoxidgehalt

Die Quantifizierung der Wasserstoffperoxidgehalte erfolgte mittels saurer Titan(IV)oxid-Lösung. Dabei wurde Wasserstoffperoxid zu gelb gefärbten Peroxotitansäuren umgesetzt. Bei gefärbten Proben wurde ein Blindwert erfasst, der anstatt Titan(IV)oxid-Lösung 25%ige Schwefelsäure enthielt.

Versuchsansatz:

Titan(IV)oxidsulfat-Lösung (Sigma, 89532) bzw. 25%ige Schwefelsäure	50 µL
Reinstwasser	800 µL
Kulturüberstand	200 µL

Der Ansatz wurde für maximal 1 Stunde inkubiert und die Extinktion bei λ = 420 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Kalibriergerade. Es wurde Wasserstoffperoxid im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 80 mg L^{-1} verwendet.

4.7.1.11 Proteingehalt

Die Proteinbestimmung nach der Bradford (1976) wurde unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Farbstofflösung (*Roti®-Quant*, Roth) und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der Assay beruhte auf der Adsorption von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue, wobei in saurer Lösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm auftrat.

Versuchsansatz:

Roti ®-Quant Arbeitslösung	200 µL
Kulturüberstand	50 µL.

Nach 10 min Reaktionszeit wurde die Extinktion bei 450 nm und 595 nm spektrophotometrisch gegen einen Reagenzienblindwert gemessen. Die Kalibriergerade von 10 bis 100 µg mL^{-1} Protein wurde mit Rinder-Serumalbumin (BSA) als Standard erstellt.

4.7.1.12 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 konzentriet):

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 λ = 340 nm bestimmt und

Enzymlösung	50 µL

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

Berechnung:

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

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

c	= [g L^{-1}]
V_{gesamt}	= 1,0 mL
$V_{Kulturüberstand}$	= variabel, maximal 900 µL
d	= 1,0 cm
$\varepsilon_{NADPH,\,340\,nm}$	= 0,0063 L µmol^{-1} cm^{-1}
F	= Verdünnungsfaktor
MW	= Molekulargewicht von Glucose 180,16 g mol^{-1}

4.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelktrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelktrophorese nach (Laemmli 1970) durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurde die „Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet.

Trenngelpuffer:	Endkonzentration	Menge
TRIS	1,5 M	181,5 g
Reinstwasser		900 mL

Mit 37%iger HCl wurde der pH-Wert auf 8,8 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1.000 mL aufgefüllt.

Sammelgelpuffer:	Endkonzentration	Menge
TRIS	0,5 M	60,5 g
Reinstwasser		900 mL

Mit 37%iger HCl wurde der pH-Wert auf 6,8 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1.000 mL aufgefüllt.

SDS-Stammlösung:	Endkonzentration	Menge
SDS	20% (w/v)	10 g
Reinstwasser		ad 50 mL

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

APS-Stammlösung:	Endkonzentration	Menge
Ammoniumperoxodisulfat	40% (w/v)	4 g
Reinstwasser		ad 10 mL

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Nach einmaligem Auftauen wurde die restliche Lösung nicht weiter verwendet.

Acrylamid-Stammlösung: *Rotiphorese*® Gel 40, Roth	Endkonzentration
Acrylamid	1,04% (v/v)
Bisacrylamid	38,96% (v/v)

Probenauftragspuffer (5fach konzentriert):

	Endkonzentration	Menge
TRIS/HCl Puffer pH 6,8; 0,5 M	0,25 M	5 mL
SDS-Stammlösung	5% (v/v)	2,5 mL
Glycerol	20% (v/v)	2 mL
Bromphenolblau	0,5% (w/v)	50 mg

Die Lösung wurde in 950 µL Aliquots eingefroren; vor Gebrauch wurden zu jedem Aliquot 50 µL einer 2 M Dithiothreitol-Lösung zugefügt. Der Probenpuffer wurde bei -20 °C gelagert.

SDS-Elektrophoresepuffer:	Endkonzentration	Menge
TRIS	250 mM	30,2 g
Glycin	1,92 M	144,2 g
SDS	1% (w/v)	10 g
Reinstwasser		ad 1.000 mL

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zum Gebrauch wurden 100 mL der Lösung mit Reinstwasser auf 1.000 mL aufgefüllt.

Pipettierschema für ein diskontinuierliches Gel:

Trenngel:	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Trenngelpuffer	1,5 M	0,375 M
Acrylamid-Stammlösung (*Rotiphorese*® Gel 40)	40% (w/v)	anpassen
SDS-Stocklösung	20% (w/v)	0,2% (v/v)
Reinstwasser		anpassen
APS	40% (w/v)	0,1% (v/v)
TEMED		0,125% (v/v)

Die Konzentration der Acrylamid-Stammlösung wurde dem erwarteten Molekulargewichtsbereich der Proteine angepasst.

Sammelgel:	Konzentration der Stocklösung	Endkonzentration
Sammelgelpuffer	0,5 M	0,125 M
Acrylamid-Stammlösung (*Rotiphorese*® Gel 40)	40% (w/v)	6% (v/v)
SDS-Stocklösung	20% (w/v)	0,2% (v/v)
Reinstwasser		anpassen
APS	40% (w/v)	0,2% (v/v)
TEMED		0,2% (v/v)

Die Probe wurde mit einer entsprechenden Menge des 5fach Probenpuffers versetzt, 15 Minuten gekocht und auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden aufgetragen und die Elektrophorese gestartet. Für die 10 x 10 cm Gele wurde während des Sammelgels eine Stromstärke von 10 mA eingestellt und im

Trenngel auf 20 mA pro Gel erhöht. Die Fokussierung bei den 20 x 20 cm Gelen wurde bei 25 mA und die Trennung bei 35 mA pro Gel durchgeführt.

4.7.3 Western Blot

Nach der SDS-PAGE (4.7.2) wurden Proteine aus einem Polyacrylamidgel mittels Tank-Elektroblotter auf eine PVDF-Membran geblottet.

10x Übertragungspuffer:	Endkonzentration	Menge
TRIS	250 mM	30,2 g
Glycin	1,92 M	144,2 g
Reinstwasser		ad 1.000 mL

1x Übertragungspuffer:	Endkonzentration	Menge
10x Übertragungspuffer		100 mL
Methanol	5%	50 mL
Reinstwasser		ad 1.000 mL

Eine PVDF-Membran und Blottingpapier (Whatman, Dassel) wurden auf eine Größe von 10 mal 10 cm zugeschnitten. Die Aktivierung der Membran erfolgte für 5 Minuten in Methanol. Anschließend wurden Membran und Blottingpapier im Übertragungspuffer (1x) äquilibriert. Die Übertragung der Proteine erfolgte für 1 Stunde bei einer Spannung von 100 V. Die Membran wurde anschließend mittels Coomassie Brilliant Blau gefärbt (4.7.6.1).

4.7.4 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die IEF wurden „Servalyt Precotes®“-Gele (300 µm, 125 x 125 mm, Serva), Fertiggele mit einem immobilisierten pH Gradienten verwendet. Die Vorbereitung der Gele wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Proteinstandard wurde der IEF-Marker pI 3-10 Liquid Mix von Serva verwendet. Abhängig von der Proteinkonzentration wurden bis zu 10 µL Probe aufgetragen. Das IEF Gel wurde auf 4 °C gekühlt. Die Fokussierung wurde in zwei Phasen durchgeführt: In der ersten Phase wurden für 10 Minuten 350 V, 6 mA, 12 W angelegt. Die zweite Phase lief über 3,5 kVh bei 1800 V, 6 mA und 12 W.

4.7.5 Zweidimensionale Elektrophorese

4.7.5.1 Fällung mit Trichloressigsäure (modifiziert nach Polachek und Cabib 1981)

Die Proteinextrakte wurde mit dem gleichen Volumen 20% (w/v) Trichloressigsäure versetzt, vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (15 min, 13.000 g, 4 °C) entfernt und das Pellet sofort mit eiskaltem Aceton (-20 °C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Waschschritt wiederholt und das Pellet anschließend bei 4 °C getrocknet.

4.7.5.2 Probenaufarbeitung für die zweidimensionale Elektrophorese

Die Proben wurden nach ihrer Ernte (4.6.1.10 und 4.6.1.12) in Zentrifugenröhrchen überführt, 10 min bei 3.800 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Dem Überstand wurde ein Peptidaseinhibitor (4.6.1.5) zugefügt und die Probe entweder bei -20 °C gelagert oder direkt gefällt.

Ultrafiltrationseinheiten (10 kDa Ausschluss, Macrosep® von Pall) wurden durch zweimaliges Waschen mit Reinstwasser vorbereitet. Das Probevolumen wurde durch Ultrafiltration auf 1 mL reduziert. Zur Entfernung von Salzen und anderen Störsubstanzen wurde die Probe dreimal mit Reinstwasser auf 15 mL aufgefüllt und wiederum auf 1 mL reduziert. Die Probe wurde in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt, 0,5 mL Reinstwasser zugefügt und 50 µL Probe zur Proteinbestimmung entnommen. Die Probe wurde mit dem vierfachen Volumen (6 mL) Methanol versetzt und geschüttelt. Anschließend wurde ein Volumen Chloroform (1,5 mL) zugegeben, vermischt, anschließend das dreifache Volumen Reinstwasser (4,5 mL) zugefügt und vermischt. Die Probe wurde 5 min bei 4 °C inkubiert und anschließend 20 min bei 3.800 g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde verworfen. Die Proteine befanden sich in der Interphase. Nach Zufügen des dreifachen Volumens an Methanol (4,5 mL) und 5-minütiger Inkubation bei 4 °C wurde die Probe erneut mindestens 20 min bei 3.800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet getrocknet und bei -20 °C gelagert.

4.7.5.3 verwendete Stammlösungen

Lyse-Puffer:	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	8 M	19,2 g
CHAPS	4% (w/v)	1,6 g
TRIS	40 mM	0,194 g
Reinstwasser		ad 40 mL

Die Lösung wurde in 1 mL Aliquots bei –20 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 5 mg mL^{-1} Dithiothreitol zugegeben.

Rehydrierungs-Puffer:	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	8 M	12 g
CHAPS	2% (w/v)	0,5 g
Bromphenolblau		Spuren
Reinstwasser		ad 25 mL

Die Lösung wurde in 2 mL Aliquots bei –20 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 2,8 mg mL^{-1} Dithiothreitol und 10 µL mL^{-1} Bio-Lyte Ampholytlösung pH 3-10 (Bio-Rad) zugegeben.

SDS-Equilibrierungspuffer:	Endkonzentration	Menge
TRIS-HCl Puffer 1,5 M pH 8,8	50 mM	6,7 mL
Harnstoff	6 M	72,07 g
Glycerol	30% (v/v)	60 mL
SDS	2% (w/v)	4,0 g
Bromphenolblau		Spuren
Reinstwasser		ad 200 mL

Die Lösung wurde in 10 mL Aliquots bei –20 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 10 mg mL^{-1} Dithiothreitol für den ersten Equilibrierungsschritt beziehungsweise 25 mg mL^{-1} Iodacetamid für den zweiten Equilibrierungsschritt zugegeben. 5 mL Equilibrierungspuffer waren ausreichend für einen 11 cm langen Gelstreifen.

Trenngelpuffer (4fach):	Endkonzentration	Menge
TRIS	1,5 M	181,5 g
Reinstwasser		750 mL

Mit 37%iger HCl wurde der pH-Wert auf 8,8 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend mit Reinstwasser auf 1.000 mL aufgefüllt.

SDS-Stammlösung:	Endkonzentration	Menge
SDS	20% (w/v)	10 g
Reinstwasser		ad 50 mL

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

APS-Stammlösung:	Endkonzentration	Menge
Ammoniumperoxodisulfat	40% (w/v)	4 g
Reinstwasser		ad 10 mL

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Nach einmaligem Auftauen wurde die restliche Lösung nicht weiter verwendet.

SDS-Elektrophoresepuffer (10fach):	Endkonzentration	Menge
TRIS	250 mM	30,2 g
Glycin	1,92 M	144,2 g
SDS	1% (w/v)	10 g
Reinstwasser		ad 1.000 mL

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zum Gebrauch wurden 100 mL der Lösung mit Reinstwasser auf 1.000 mL aufgefüllt.

Agarose-Fixierlösung:	Endkonzentration	Menge
SDS-Elektrophoresepuffer		10 mL
Agarose	0,5% (w/v)	0,5 g
Bromphenolblau		Spuren
Reinstwasser		ad 100 mL

Die Lösung wurde bis zum vollständigen Lösen der Agarose in der Mikrowelle erhitzt und bei Raumtemperatur gelagert.

4.7.5.4 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden 11 cm *ReadyStrip*®IPG-Streifen pI 3-10 der Firma Bio-Rad verwendet. Zunächst wurde die benötigte, gefällte Proteinmenge in Lyse-Puffer (25 µg μL^{-1} Gesamtprotein) aufgenommen und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach wurde zur Pelletierung der unlöslichen Bestandteile 20 Minuten bei 4 °C und 15.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde so mit Rehydrierungs-Puffer verdünnt, dass ein Gesamtvolumen von 250 µL mit einem Proteingehalt von ~ 500 µg entstand. Anschließend wurde die so verdünnte Probe in eine Vertiefung des Kunststoffeinsatzes der Rehydrierungskammer pipettiert und der IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten hineingelegt. Um den IPG-Streifen vor Austrocknung zu schützen, wurden abschließend weitere Kammern mit Wasser gefüllt. Die Rehydrierung erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Das *Multiphor II*® *IEF* System (GE Healthcare) wurde nach Anweisung des Herstellers zusammengebaut und Glycerol als Kälteüberträger eingesetzt. Die Kühlung wurde auf 15 °C eingestellt. Die IPG Streifen wurden mit der Gelseite oben eingelegt. Der saure pI-Bereich des Streifens wurde zur Anode ausgerichtet. Die Elektrodenpads wurden mit H_2O_{bidest} angefeuchtet (~500 µL pro Pad) und aufgelegt. Die IPG Streifen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Glycerol überschichtet. Die Gesamtfokussierungsdauer für die verwendeten IPG-Streifen betrug 25 kVh (Tabelle 24). Die Fokussierung war in Schritt 7 nach Erreichen der Gesamtfokussierungsdauer beendet, Schritt 8 diente nur zur Vermeidung von Diffusionseffekten.

Tabelle 24: Das Spannungsprofil der isoelektrischen Fokussierung (ersten Dimension)

Schritt	Spannung	Stromstärke	Leistung	Zeit
1	250 V	2 mA	5 W	1 Vh
2	250 V	2 mA	5 W	250 Vh
3		Elektrodenpads erneuern !		
4	500 V	2 mA	5 W	1 Vh
5	500 V	2 mA	5 W	1,5 kVh
6	3.500 V	2 mA	5 W	3 kVh
7	3.500 V	2 mA	5 W	22 kVh
8	500 V	2 mA	5 W	500 kVh

Nach Abschluss der Fokussierung wurden die IPG-Streifen entweder sofort für die zweite Dimension verwendet oder in Zetrifugenröhrchen bei -20 °C gelagert.

4.7.5.5 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese

Das SDS-Gel für die zweite Dimension wurde ohne Sammelgel hergestellt.

Versuchsansatz (ausreichend für zwei Gele):

Acrylamid-Stammlösung (*Rotiphorese*® Gel 40)	25 mL
Trenngelpuffer vierfach konzentriert	20,25 mL
SDS Stammlösung	0,405 mL
Reinstwasser	35,5 mL
TEMED	50 µL
APS	125 µL

Ein präparativer Kamm wurde verwendet. Die Gele wurden mindestens über Nacht bei 4 °C polymerisiert. Die Gele wurden bis zu zwei Wochen bei 4 °C gelagert.

Der IPG-Streifen wurde vor der zweiten Dimension equilibriert. Die Inkubation erfolgte zweimal für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur in SDS-Equilibrierungspuffer (4.7.5.3). Die Lösung des ersten Equilibrierschrittes enthielt

Dithiothreitol, die des zweiten Iodacetamid. Beide Reagenzien wurden erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Anschließend wurde der equilibrierte IPG-Streifen kurz in SDS-Elektrophoresepuffer abgespült und luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt. Der IPG-Streifen wurde mit warmer Agarose-Fixierlösung in seiner Position gehalten. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Elektrophorese gestartet. Die Trennung wurde bei einer maximalen Stromstärke von 35 mA pro Gel durchgeführt.

4.7.6 Färbungen für elektrophoretische Methoden

4.7.6.1 Färbung mit colloidalem Coomassie Brilliant Blau (CBB)

Es wurde eine modifizierte Variante der kolloidalen Coomassie-Färbung nach (Candiano *et al.* 2004) angewandt.

Färbelösung:	Endkonzentration	Menge
Aluminiumsulfat Hydrat	5% (w/v)	25 g
Reinstwasser		440 mL
Ethanol (96%)	10% (v/v)	50 mL
o-Phosphorsäure (100%)	2% (v/v)	10 mL
CBB - G 250	0,02% (w/v)	0,1 g

Entfärberlösung:	Endkonzentration	Menge
Ethanol (96%)	10% (v/v)	50 mL
o-Phosphorsäure (100%)	2% (v/v)	10 mL
Reinstwasser		440 mL

Die Gele wurden zur Entfernung von störendem SDS zweimal für 10 Minuten in Reinstwasser geschüttelt. Die Färbung erfolgte für mindestens 3 Stunden. Anschließend wurden die Gele mehrmals in Reinstwasser gewaschen und in Entfärberlösung entfärbt.

4.7.6.2 Silberfärbung

Zur Silberfärbung wurde eine modifizierte Methode nach Heukeshoven und Dernick (1989) angewandt.

Fixierlösung:	Endkonzentration	Menge
Methanol	50% (v/v)	250 mL
Eisessig	10% (v/v)	50 mL
Reinstwasser		ad 500 mL

Inkubationslösung:	Endkonzentration	Menge
Ethanol (>99,5% reinst)	30% (v/v)	75 mL
Natriumthiosulfat Heptahydrat	0,3% (w/v)	0,75 g
Natriumacetat Tetrahydrat	0,8 M	27,22 g
Glutardialdehyd (50%)	0,5% (v/v)	2,5 mL
Reinstwasser		ad 250 mL

Silbernitratlösung:	Endkonzentration	Menge
Silbernitrat	0,1% (w/v)	0,25 g
Formaldehyd (37%)	0,02% (v/v)	50 µL
Reinstwasser		ad 250 mL

Entwicklungslösung:	Endkonzentration	Menge
Natriumhydrogencarbonat	2,5% (w/v)	6,25 g
Formaldehyd (37%)	0,01% (v/v)	25 µL
Reinstwasser		ad 250 mL

Stopplösung:	Endkonzentration	Menge
EDTA	0,05 M	9,4 g
Reinstwasser		ad 500 mL

Die Inkubationslösung, die Silbernitratlösung und die Entwicklungslösung wurden immer kurz vor Gebrauch angesetzt. Die Gele wurden zunächst mindestens 2 Stunden bis zu 20 Stunden in Fixierlösung inkubiert, danach weitere 2 Stunden in der Inkubationslösung. Anschließend wurde das Gel dreimal 20 min in

Reinstwasser gewaschen. Die Inkubation in der Silbernitratlösung erfolgte für 30 min. Überschüssiges Silbernitrat wurde durch kurzes Waschen der Gele (ca. 60 s) in Reinstwasser entfernt. Die Inkubation in der Entwicklungslösung erfolgte so lange, bis sich ein deutliches Proteinmuster gebildet hatte. Die Entwicklung wurde durch einmaliges Waschen mit Reinstwasser und Überführen in die Stopplösung beendet.
Die Silbernitratlösung und die erste Waschlösung wurden im schwermetallhaltigen Flüssigabfall gesammelt und gesondert entsorgt.

4.7.7 Biochemische Charakterisierung der gereinigten/ heterolog exprimierten polyvalenten Peroxidase

4.7.7.1 Bestimmung des Molekulargewichts

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE wurde die Laufstrecke des Molekulargewichtsmarkers bestimmt. Die Logarithmen der Molekulargewichte wurden gegen die Laufstrecke aufgetragen und das Molekulargewicht der Zielproteine mit Hilfe der Regressionsgeraden abgeschätzt.

4.7.7.2 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Zur Bestimmung der optimalen Rekationsbedingungen wurde der β,β-Carotin Assay (4.7.1.3) verwendet. Eingesetzt wurde für jede Bestimmung eine Enzymkonzentration von 0,1 nM mit einer Gesamtenzymaktivität von 0,1 mU. Zur Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur wurde der Versuchsansatz ohne Wasserstoffperoxid 5 Minuten bei gewünschter Messtemperatur vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Wasserstoffperoxid gestartet. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurden die Überstände mit dem entsprechenden Puffer verdünnt und die Extinktionsabnahme verfolgt. Die Reaktionszusätze wie Mangansulfat und Coniferylalkohol wurden entsprechend den Angaben (2.1.1.3) eingesetzt und die Aktivität bestimmt.

4.7.7.3 Bestimmung der kinetischen Konstanten K_m und k_{cat}

Die Enzympräparation wurde mit 50 mM Natriumacetatpuffer pH 4,5 soweit verdünnt, dass die Extinktionsänderung über 5 Minuten im linearen Bereich lag. Die Proteinkonzentrationen der Verdünnungen wurden mittels Bradfordassay

(4.7.1.11) bestimmt. Für das Substrat Syringol wurden 0,01 nM Enzym und für die restlichen Substrate wurden 0,025 nM Enzym für jede Messung verwendet. Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden unterschiedliche Substratkonzentrationen verwendet (3.1.2), und die Kinetik in Abhängigkeit von der Konzentration bestimmt (Durchführung der Messungen s. 4.7.1). Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in Abhängigkeit von der Substratkonzentration doppelt reziprok in einem Lineweaver-Burk-Diagramm aufgetragen und die kinetischen Parameter daraus bestimmt.

4.8 Chromatographie

4.8.1 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

Verwendet wurde eine Biologic-Duo-Flow (BioRad, München) mit einem Fraktionssammler Modell 2128 (Bio-Rad). Die Detektion der Proteine erfolgte über eine Extinktionsmessung bei 280 nm. Die Datenaufnahme wurde durch die Biologic Duo Flow Workstation durchgeführt.

4.8.1.1 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Als Trennsäule diente eine HiPrep Phenyl FF (high sub) 16/10-Säule (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany) mit einem Säulenvolumen von 20 mL. Das Säulenmaterial bestand aus substituierter Agarose (6% Phenylgruppen). Verwendet wurde eine 2 mL Probenschleife. Die Flussrate betrug 3 mL min^{-1}. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 4 mL, gesammelt wurde von Schritt 4 bis Schritt 7.

Startpuffer (HIC-P1): 7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogen-phosphatpuffer, pH 3,5 + 1 M Natriumchlorid (Pumpe A)

Elutionspuffer (HIC-P2): 7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogen-phosphatpuffer, pH 3,5 (Pumpe B, Port 1)

Probe: konzentrierter Kulturüberstand von *Pleurotus sapidus*, umgepuffert in HIC-P1

Methode:

1) UV-Lampe an
2) Autozero
3) HIC-P1, 30 mL
4) Injektion der Probe; Spülen der Probenschleife mit 10 mL HIC-P1
5) HIC-P1, 80 mL
6) Gradient in 12 mL auf 100% HIC-P2
7) HIC-P2, 120 mL
8) Reinstwasser, 100 mL
9) HIC-P1, 50 mL

In den gesammelten Fraktionen erfolgte der Nachweis des Zielproteins mittels β,β-Carotin-Aktivitätsassay (4.7.1.3). Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt, mittels Ultrafiltration konzentriert und auf den DEAE-Startpuffer (4.8.1.2) umgepuffert.

4.8.1.2 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Als Trennsäule wurde eine HiPrep DEAE FF 16/10-Säule (GE Healthcare Europe GmbH) mit einem Säulenvolumen von 20 mL verwendet. Das Säulenmaterial war eine DEAE Sepharose Fast Flow (schwacher Anionentauscher). Verwendet wurde eine 2 mL Probenschleife. Die Flussrate betrug 3 mL min^{-1}. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 4 mL, gesammelt wurde von Schritt 4 bis Schritt 7.

Startpuffer (DEAE-P1): 7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogen-phosphatpuffer, pH 4,5 (Pumpe A)

Elutionspuffer (DEAE-P2): 7 mM Citronensäure, 6 mM Dinatriumhydrogen-phosphatpuffer, pH 3,0 (Pumpe B, Port 2)

Probe: konzentrierter Kulturüberstand von *Pleurotus sapidus,* gepuffert in DEAE-P1

Methode:

1) UV-Lampe an
2) Autozero
3) DEAE-P1, 15 mL

4) Injektion der Probe; Spülen der Probenschleife mit 10 mL DEAE-P1
5) DEAE-P1, 80 mL
6) Gradient in 12 mL auf 100% DEAE-P2
7) DEAE-P2, 180 mL
8) Reinstwasser, 100 mL
9) DEAE-P1, 60 mL

In den gesammelten Fraktionen erfolgte der Nachweis des Zielproteins mittels β-Carotin-Aktivitätsassay (4.7.1.3). Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt, mittels Ultrafiltration konzentriert und umgepuffert auf den Gelfiltrationspuffer (4.8.1.3).

4.8.1.3 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Als Trennsäule wurde eine Superdex 200 10/300 GL-Säule (GE Healthcare Europe GmbH) mit einem Säulenvolumen von 20 mL verwendet. Das Säulenmaterial war eine mit Dextranen gekoppelte, hochvernetzte Agarose. Verwendet wurde eine 1 mL Probenschleife bei einer Flussrate von 0,5 mL min^{-1}. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 0,5 mL; gesammelt wurde von Schritt 4 bis Schritt 5.

Elutionspuffer (GFC-P1): 35 mM Citronensäure, 30 mM Dinatriumhydrogenphosphatpuffer, pH 3,5 + je 0,3 µmol L^{-1}: Eisen(II)sulfat Heptahydrat, Zinksulfat Heptahydrat, Mangan(II)sulfat und Kupfer(II)sulfat (Pumpe A)

Methode:

1) UV-Lampe an
2) Autozero
3) GFC-P1, 10 mL
4) Injektion der Probe; Spülen der Probenschleife mit 5 mL GFC-P1
5) GFC-P1, 50 mL

In den gesammelten Fraktionen erfolgte der Nachweis des Zielproteins mittels β,β-Carotin-Aktivitätsassay (4.7.1.3). Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt, und mittels Ultrafiltration konzentriert.

4.8.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

4.8.2.1 HPLC Analytik mit einer Umkehrphasen-Säule

Es wurde eine CC125/3 Nucleosil 100-5 RP Säule von Macherey-Nagel verwendet. Die Produktentstehung wurde bei 230, 270 und 350 nm verfolgt.

Injektionsvolumen: 10 µL

Flussrate: 1 mL min^{-1}

Fließmittel: A: Acetonitril; B: Reinstwasser

Gradient: 0-5 min 5% A
5-10 min linearer Gradient von 5% A auf 30% A
10-40 min linearer Gradient von 30% A auf 95% A
40-45 min 95% A
45-50 min linearer Gradient von 95% A auf 5% A

4.8.2.2 HPLC Analytik zur Molekulargewichtsverteilung mit einer linearen Säule (HPSEC) (Hofrichter und Fritsche 1997 , Hofrichter *et al.* 2001a)

Die Molekulargewichtsverteilung wässriger Holzextrakte wurde mittels einer linearen HEMA-Bio-Säule (Polymer Standard Service, Mainz, Deutschland) untersucht. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL. Der Messbereich des DAD wurde auf 200 bis 500 nm eingestellt. Die mobile Phase (Laufmittel) bestand aus 20% Acetonitril und 80% eines ionischen wässrigen Puffers (0,34% $NaNO_3$, 0,2% K_2HPO_4, pH 10), der die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen minimieren sollte; die Flussrate betrug 0,75 mL min^{-1}. Die Säule wurde mit verschiedenen Natriumpolystyrolsulfonaten als Molekulargewichtsstandards (*sodium polystyrene sulphonates*, 0,8-150 kDa, Polymer Standard Service (Mainz), Abbildung 60) kalibriert.

4.8.3 Gaschromatographie (GC)

4.8.3.1 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)

Es wurde ein Gaschromatograph von Agilent (7890A, Agilent) mit einem cold-on-column Injektor verwendet. Ein Injektionsvolumen von 1 µL wurde auf eine Trennsäule (Agilent Technologies J&W Scientific HPInnoWAX, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke) aufgegeben. Die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor (FID, 250 °C). Als Detektorgase wurden verwendet:

Wasserstoff 40 mL min^{-1}, Luft 400 mL min^{-1} und Stickstoff 25 mL min^{-1}, als Trägergas diente Wasserstoff mit einem Vordruck von 44,5 kPa und einem Fluss von 3 mL min^{-1}.
Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 40 °C für 3 min, mit 5 °C pro Minute auf 240 °C, 240 °C für 7 min.

4.8.3.2 Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor (GC-MS)

Es wurde ein Gaschromatograph von Agilent (5975C MS, Agilent) mit einem cold-on-column Injektor verwendet; Injektionsvolumen: 1 µL; Trennsäule: HPInnoWAX, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (Agilent Technologies J&W Scientific); Detektor: MS 5975 C VL MSD Triple-Axis Detector. Es wurde eine Elektronenstoßionisation bei 70 eV durchgeführt, der Massenbereich betrug m/z 33-300. Die Temperaturen betrugen für die Ionenquelle 220 °C, das Interface 250 °C und das Quadrupol 150 °C. Als Trägergas diente Helium mit einem Fluss von 1,2 mL min^{-1}. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet: 40 °C für 3 min, mit 5 °C pro Minute auf 240 °C, 240 °C für 7 min. Die Identifizierung erfolgte über einen Datenbankvergleich mit NIST (National Institute of Standards and Technology).

4.9 Zellfreie (*in-vitro*) Umsetzungen

4.9.1 *In-vitro* Umsetzungen mit der gereinigten Enzympräparation aus *Pleurotus sapidus*

4.9.1.1 Modellsubstrate

Als Modellsubstrate in den zellfreien Umsetzungen wurden Veratryl- und Coniferylalkohol eingesetzt. Jeder Ansatz des „*in vitro*“-Assays enthielt 0,1 mg mL^{-1} der Modellsubstanz, 0,8 mU der gereinigten Enzympräparation, 2 mM Wasserstoffperoxid in 50 mM Natrium-Acetatpuffer pH 4,5. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 500 rpm im Inkubationsschüttler. In regelmäßigen Abständen wurden Proben mittels HPLC (4.8.2.1) untersucht.

4.9.1.2 Lignin organosolv

Jeder Ansatz des „*in vitro*“-Assays enthielt 500 mg Lignin organosolv (371017, Sigma), 10% Ethanol, 6 mU der gereinigten Enzympräparation, 2 mM

Wasserstoffperoxid in 50 mM Natrium-Acetatpuffer pH 4,5. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 500 rpm im Inkubationsschüttler. In regelmäßigen Abständen wurden Proben abgenommen und die Größe und Verteilung der Partikel durch einen MasterSizer (Malvern Instruments Ltd., Herrenberg; AG Czermak, Technische Hochschule Mittelhessen) bestimmt. Die Ligninpartikel wurden anschließend in 20% Acetonitril und 80% eines ionischen wässrigen Puffers (0,34% $NaNO_3$, 0,2% K_2HPO_4, pH 10) resuspendiert und mittels HPLC (4.8.2.1) und HPSEC (4.8.2.2) analysiert.

4.9.2 *In-vitro* Umsetzungen mit Überständen von *Pleurotus sapidus* Submerskulturen

Zur Vorbereitung der Kulturüberstände wurden diese mittels Filtration von Feststoffen befreit, und das Volumen der Überstände durch eine Ultrafiltration (10 kDa Ausschluss, Macrosep®) um den Faktor 5 reduziert und der Peptidaseinhibitor (4.6.1.5) zugefügt.

4.9.2.1 Stroh

Jeder Ansatz des „*in vitro*“-Assays enthielt 100 mg mL^{-1} feingemahlenes Rapsstroh (d: 3 mm), Ethanol beziehungsweise Aceton in einer Endkonzentration von 30%, ein Fünftel des Ansatzvolumens an konzentrierten Überständen, 2 mM Wasserstoffperoxid in 50 mM Natrium-Acetatpuffer pH 3,5. Die Inkubation erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen und 500 rpm im Inkubationsschüttler. In regelmäßigen zeitlichen Abständen wurden Proben mittels HPLC-DAD (4.8.2.1) und HPSEC (4.8.2.2) untersucht. Parallel dazu wurde der Glucosegehalt der Überstände bestimmt (4.7.1.12). Bei den statischen Inkubationen wurde alle 24 Stunden erneut Kulturüberstand zugegeben. Bei den dynamischen Inkubationen wurden die Ansätze alle 24 Stunden abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit Reinstwasser gewaschen und erneut Kulturüberstand, Puffer, Lösungsmittel und Wasserstoffperoxid zugefügt.

4.9.3 Probenvorbereitung für die HPLC

Die Proben der zellfreien Ansätze wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 15.000 g von Feststoffen befreit. In einer anschließenden Ultrafiltration (10 kDa Ausschluss, Nanosep®) wurden die Proteine entfernt. Die Proben wurden in der HPLC-Analytik (4.8.2.1) eingesetzt.

4.9.4 Probenvorbereitung für die HPSEC

Die Überstände wurde wie unter 4.9.3 beschrieben, vorbereitet und analysiert. Rapsstroh wurde mit 15 µL 0,1 M Natronlauge pro mg Feststoff versetzt, und für 20 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die Lösung wurde über einen 0,22 µm Spritzenvorsatzfilter zur Abtrennung von Feststoffpartikeln filtriert und in der HPSEC (4.8.2.2) eingesetzt.

4.9.5 Probenvorbereitung für die GC-FID / GC-MS

Die Proben der zellfreien Ansätze wurden in ein Glasröhrchen überführt und mit dem dreifachen Volumen an Pentan/Diethylether versetzt. Die Extraktion erfolgte durch mehrmaliges Vortexen der Probe und Inkubation für 20 Minuten bei 24 °C und 250 rpm. Durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 4.000 g wurden die Phasen getrennt, und die organische Phase wurde für die GC-Analytik (4.8.3.1 und 4.8.3.2) verwendet.

5 Literaturverzeichnis

Abbas, A.; Koc, H.; Liu, F.; Tien, M. (2005) Fungal Degradation of Wood: Initial Proteomic Analysis of Extracellular Proteins of *Phanerochaete chrysosporium* Grown on Oak Substrate, *Curr Genet* **47**, 49–56.

Adler, E. (1977) Lignin Chemistry - Past, Present and Future, *Wood Sci Tech* **11**, 169–218.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs., *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.

Aoyama, W.; Sasaki, S.; Matsumura, S.; Mitsunaga, T.; Hirai, H.; Tsutsumi, Y.; Nishida, T. (2002) Sinapyl Alcohol-Specific Peroxidase Isoenzyme Catalyzes the Formation of the Dehydrogenative Polymer from Sinapyl Alcohol, *J Wood Sci* **48**, 497–504.

Arora, D. S.; Chander, M.; Gill, P. K. (2002) Involvement of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase and Laccase in Degradation and Selective Ligninolysis of Wheat Straw, *Int Biodeter Biodegr* **50**, 115–120.

Asada, Y.; Watanabe, A.; Irie, T.; Nakayama, T.; Kuwahara, M. (1995) Structures of Genomic and Complementary DNAs Coding for *Pleurotus ostreatus* Manganese(II) Peroxidase, *Biochim Biophys Acta* **1251**, 205–209.

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.

Bailey, M. J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1991) Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity, *J Biotechnol*, 257–270.

Baldrian, P.; Valaskova, V.; Merhautova, V.; Gabriel, J. (2005) Degradation of Lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the Presence of Copper, Manganese, Lead and Zinc, *Res Microbiol* **156**, 670–676.

Bandow, J. E.; Baker, J. D.; Berth, M.; Painter, C.; Sepulveda, O. J.; Clark, K. A.; Kilty, I.; VanBogelen, R. A. (2008) Improved Image Analysis Workflow for 2-D Gels Enables Large-Scale 2-D Gel-Based Proteomics Studies - COPD Biomarker Discovery Study, *Proteomics* **8**, 3030–3041.

Barr, P. J. (1991) Mammalian Subtilisins - The Long-Sought Dibasic Processing Endoproteases, *Cell* **66**, 1–3.

Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunnak, S. (2004) Improved Prediction of Signal Peptides, *J Mol Biol* **340**, 783-795.

Berrocal, M. M.; Rodriguez, J.; Ball, A. S.; PerezLeblic, M. I.; Arias, M. E. (1997) Solubilisation and Mineralisation of $_{14}$C-Lignocellulose from Wheat Straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during Growth in Solid-State Fermentation, *Appl Microbiol Biotechnol* **48**, 379–384.

Bisby F.A., Roskov Y.R., Orrell T.M., Nicolson D., Paglinawan L.E., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., Baillargeon G., Ouvrard D., eds (2011). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2011 Annual Checklist. Digital Resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2011/. Species 2000: Reading, UK. (Juni, 2011)

Blanchette, R. A. (1995) Degradation of the Lignocellulose Complex in Wood, *Can J Bot* **73**, S999-S1010.

Blom, N.; Sicheritz-Ponten, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. (2004) Prediction of Post-Translational Glycosylation and Phosphorylation of Proteins from the Amino Acid Sequence, *Proteomics* **4**, 1633–1649.

Bockle, B.; Martinez, M. J.; Guillen, F.; Martinez, A. T. (1999) Mechanism of Peroxidase Inactivation in Liquid Cultures of the Ligninolytic Fungus *Pleurotus pulmonarius*, *Appl Environ Microbiol* **65**, 923–928.

Bonnen, A. M.; Anton, L. H.; Orth, A. B. (1994) Lignin-Degrading Enzymes of the Commercial Button Mushroom, *Agaricus bisporus*, *Appl Environ Microbiol* **60**, 960–965.

Bordini, E.; Hamdan, M.; Righetti, P. G. (1999) Probing the Reactivity of S-S Bridges to Acrylamide in Some Proteins Under High pH Conditions by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation, *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**, 1818–1827.

Bordini, E.; Hamdan, M.; Righetti, P. G. (2000) Alkylation Power of Free Immobiline Chemicals Towards Proteins in Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Maps, as Explored by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry, *Electrophoresis* **21**, 2911–2918.

Bourbonnais, R.; Paice, M. G. (1990) Oxidation of Non-Phenolic Substrates. An Expanded Role for Laccase in Lignin Biodegradation, *FEBS Lett* **267**, 99–102.

Bouws, H. (2007): Molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Enzyme aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus*, Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität.

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.

Calderon, A. A.; Munoz, R.; Morales, M.; Barcelo, A. R. (1992) A Comparative-Study of 2 Spectrophotometric Methods for Measuring Coniferyl Alcohol Oxidation Catalyzed by Peroxidase, *Phytochem Anal* **3**, 238–240.

Camarero, S.; Bockle, B.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (1996) Manganese-Mediated Lignin Degradation by *Pleurotus pulmonarius*, *Appl Environ Microbiol* **62**, 1070–1072.

Camarero, S.; Sarkar, S.; Ruiz-Duenas, F. J.; Martinez, M. J.; Martinez, Á. T. (1999) Description of a Versatile Peroxidase Involved in the Natural Degradation of Lignin that has Both Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase Substrate Interaction Sites, *J Biol Chem* **274**, 10324–10330.

Camarero, S.; Ruiz-Duenas, F. J.; Sarkar, S.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (2000) The Cloning of a New Peroxidase Found in Lignocellulose Cultures of *Pleurotus eryngii* and Sequence Comparison with Other Fungal Peroxidases, *FEMS Microbiol Lett* **191**, 37–43.

Candiano, G.; Bruschi, M.; Musante, L.; Santucci, L.; Ghiggeri, G. M.; Carnemolla, B.; Orecchia, P.; Zardi, L.; Righetti, P. G. (2004) Blue Silver: A very Sensitive Colloidal Coomassie G-250 Staining for Proteome Analysis, *Electrophoresis* **25**, 1327–1333.

Carus, M.; Raschka, A.; Piotrowski, S. (Hg.): (2010) Entwicklung von Förderinstrumenten für die stoffliche Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen in Deutschland: Volumen, Struktur, Substitutionspotenziale, Konkurrenzsituation und Besonderheiten der stofflichen Nutzung sowie Entwicklung von Förderinstrumenten, 2. geringfügig überarb. Aufl., Oktober 2010. Hürth, Rheinland, nova-Institut für politische und ökologische Innovation; nova-Institut für politische und ökologische Innovation GmbH.

Caufrier, F.; Martinou, A.; Dupont, C.; Bouriotis, V. (2003) Carbohydrate Esterase Family 4 Enzymes: Substrate Specificity, *Carbohydr Res* **338**, 687–692.

Cherubini, F.; Stromman, A. H. (2010) Production of Biofuels and Biochemicals from Lignocellulosic Biomass: Estimation of Maximum Theoretical Yields and Efficiencies Using Matrix Algebra, *Energy Fuels* **24**, 2657–2666.

Chi, Y.; Hatakka, A.; Maijala, P. (2007) Can Co-Culturing of Two White-Rot Fungi Increase Lignin Degradation and the Production of Lignin-Degrading Enzymes?, *Int Biodeter Biodegr* **59**, 32–39.

Childs, R. E.; Bardsley, W. G. (1975) Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulphonic Acid) as Chromogen, *Biochem J* **145**, 93–103.

Crawford, D. L.; Crawford, D. L. (1980) Microbial-Degradation of Lignin, *Enzyme Microb Technol* **2**, 11–22.

Daniel, G.; Volc, J.; Nilsson, T. (1992) Soft Rot and Multiple T-Branching by the Basidiomycete *Oudemansiella mucida*, *Mycol Res* **96**, 49–54.

Drori, N.; Kramer-Haimovich, H.; Rollins, J.; Dinoor, A.; Okon, Y.; Pines, O.; Prusky, D. (2003) External pH and Nitrogen Source Affect Secretion of Pectate Lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*, *Appl Environ Microbiol* **69**, 3258–3262.

Eichlerova, I.; Homolka, L.; Lisa, L.; Nerud, F. (2006) The Influence of Extracellular H_2O_2 Production on Decolorization Ability in Fungi, *J Basic Microbiol* **46**, 449–455.

Elisashvili, V.; Kachlishvili, E. (2009) Physiological Regulation of Laccase and Manganese Peroxidase Production by White-Rot Basidiomycetes, *J Biotechnol* **144**, 37–42.

Elisashvili, V.; Kachlishvili, E.; Penninckx, M. (2008) Effect of Growth Substrate, Method of Fermentation, and Nitrogen Source on Lignocellulose-Degrading Enzymes Production by White-Rot Basidiomycetes, *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**, 1531–1538.

Eriksson, K. E.; Pettersson, B. (1975) Extracellular Enzyme-System Utilized by Fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for Breakdown of Cellulose, *Eur J Biochem* **51**, 213–218.

Eriksson, K.-E. L.; Blanchette, R. A.; Ander, P. (1990) Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Berlin, Springer.

Eshel, D.; Miyara, I.; Ailing, T.; Dinoor, A.; Prusky, D. (2002) pH Regulates Endoglucanase Expression and Virulence of *Alternaria alternata* in Persimmon Fruit, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**, 774–779.

Eyre, C.; Muftah, W.; Hiscox, J.; Hunt, J.; Kille, P.; Boddy, L.; Rogers, H. J. (2010) Microarray Analysis of Differential Gene Expression Elicited in *Trametes versicolor* During Interspecific Mycelial Interactions, *Fungal Biol.* **114**, 646–660.

Faix, O. (1992) New Aspects of Lignin Utilization in Large Amounts, *Papier* **46**, 733–740.

Falck, R. (1902) Die Cultur der Oidien und ihre Rückführung in die höhere Fruchtform bei den Basidiomyceten, *Cohn´s Beitr. Biol. Pfl.*, 308–374.

Faraco, V.; Palmieri, G.; Festa, G.; Monti, M.; Sannia, G.; Giardina, P. (2005) A New Subfamily of Fungal Subtilases: Structural and Functional Analysis of a *Pleurotus ostreatus* Member, *Biol Chem* **151**, 457–466.

Faraco, V.; Piscitelli, A.; Sannia, G.; Giardina, P. (2007) Identification of a New Member of the Dye-Decolorizing Peroxidase Family from *Pleurotus ostreatus*, *World J Microbiol Biotechnol* **23**, 889–893.

Ferreira, P.; Hernandez-Ortega, A.; Herguedas, B.; Martinez, A. T.; Medina, M. (2009) Aryl-Alcohol Oxidase Involved in Lignin Degradation: A Mechanistic Study Based on Steady and Pre-Steady State Kinetics and Primary and Solvent Isotope Effects with two Alcohol Substrates, *J Biol Chem* **284**, 24840–24847.

Ferreira, P.; Medina, M.; Guillen, F.; Martinez, M. J.; van Berkel, W. J.; Martinez, A. T. (2005) Spectral and Catalytic Properties of Aryl-Alcohol Oxidase, a Fungal Flavoenzyme Acting on Polyunsaturated Alcohols, *Biochem J* **389**, 731–738.

Fournand, D.; Cathala, B.; Lapierre, C. (2003) Initial Steps of the Peroxidase-Catalyzed Polymerization of Coniferyl Alcohol and/or Sinapyl Aldehyde: Capillary Zone Electrophoresis Study of pH Effect, *Phytochem* **62**, 139–146.

Fournand, D.; Lapierre, C. (2001) Capillary Zone Electrophoresis of Coniferyl Alcohol Oxidation Products, *J Agric Food Chem* **49**, 5727–5731.

Fragner, D.; Zomorrodi, M.; Kues, U.; Majcherczyk, A. (2009) Optimized Protocol for the 2-DE of Extracellular Proteins from Higher Basidiomycetes Inhabiting Lignocellulose, *Electrophoresis* **30**, 2431–2441.

Galvani, M.; Hamdan, M.; Herbert, B.; Righetti, P. G. (2001) Alkylation Kinetics of Proteins in Preparation for Two-Dimensional Maps: A Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Investigation, *Electrophoresis* **22**, 2058–2065.

Galvani, M.; Hamdan, M.; Righetti, P. G. (2000) Investigating the Reaction of a Number of Gel Electrophoresis Cross-Linkers with β-Lactoglobulin by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry, *Electrophoresis* **21**, 3684–3692.

Gevaert, K.; Vandekerckhove, J. (2000) Protein Identification Methods in Proteomics, *Electrophoresis* **21**, 1145–1154.

Ghosh, M.; Mukherjee, R.; Nandi, B. (1998) Production of Extracellular Enzymes by two *Pleurotus* Species Using Banana Pseudostem Biomass, *Acta Biotechnol* **18**, 243–254.

Glumhoff, T.; Harvey, P. J.; Molinari, S.; Goble, M.; Frank, G.; Palmer, J. M.; Smit, J. D.; Leisola, M. S. (1990) Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - Molecular and Kinetic Characterization of Isozymes, *Eur J Biochem* **187**, 515–520.

Gold, M. H.; Kuwahara, M.; Chiu, A. A.; Glenn, J. K. (1984) Purification and Characterization of an Extracellular H_2O_2-Requiring Diarylpropane Oxygenase from the White Rot Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch Biochem Biophys* **234**, 353–362.

Gooley, A. A.; Packer, N. H. (1997) The Importance of Protein Co- and Post-Translational Modifications in Proteone Projects, In: Wilkins, M. R.; Williamson, K. L.; Appel, R. D.; Hochstrasser, D. F. (Hg.) Proteome research. New Frontiers in Functional Genomics. Berlin, Springer, 65–86.

Goto, M.; Ekino, K.; Furukawa, K. (1997) Expression and Functional Analysis of a Hyperglycosylated Glucoamylase in a Parental Host, *Aspergillus awamori var. kawachi*, *Appl Environ Microbiol* **63**, 2940–2943.

Gralla, E. B.; Kosman, D. J. (1992) Molecular-Genetics of Superoxide Dismutases in Yeasts and Related Fungi, *Advances in Genetics: Incorporating Molecular Genetic Medicine* **30**, 251–319.

Gu, L.; Lajoie, C.; Kelly, C. (2003) Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in the Yeast *Pichia pastoris*, *Biotechnol Prog* **19**, 1403–1409.

Guettler, S.; Jackson, E. N.; Lucchese, S. A.; Honaas, L.; Green, A.; Hittinger, C. T.; Tian, Y.; Lilly, W. W.; Gathman, A. C. (2003) ESTs from the Basidiomycete *Schizophyllum commune* Grown on Nitrogen-Replete and Nitrogen-Limited Media, *Fungal Genet Biol* **39**, 191–198.

Guo, G. L.; Chen, W. H.; Chen, W. H.; Men, L. C.; Hwang, W. S. (2008) Characterization of Dilute Acid Pretreatment of Silvergrass for Ethanol Production, *Bioresour Technol* **99**, 6046–6053.

Gutfinger, T. (1981) Polyphenols in Olive Oils, *J Am Oil Chem Soc* **58**, 966–968.

Gutierrez, A.; Caramelo, L.; Prieto, A.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (1994) Anisaldehyde Production and Aryl-Alcohol Oxidase and Dehydrogenase-Activities in Ligninolytic Fungi of the Genus *Pleurotus*, *Appl Environ Microbiol* **60**, 1783–1788.

Gutierrez, A.; Rio, J. C. del; Martinez-Inigo, M. J.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (2002) Production of New Unsaturated Lipids During Wood Decay by Ligninolytic Basidiomycetes, *Appl Environ Microbiol* **68**, 1344–1350.

Ha, H. C.; Honda, Y.; Watanabe, T.; Kuwahara, M. (2001) Production of Manganese Peroxidase by Pellet Culture of the Lignin-Degrading Basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*, *Appl Microbiol Biotechnol* **55**, 704–711.

Hadar, Y.; Cohenarazi, E. (1986) Chemical-Composition of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* Produced by Fermentation, *Appl Environ Microbiol* **51**, 1352–1354.

Hadar, Y.; Kerem, Z.; Gorodecki, B.; Ardon, O. (1992) Utilization of Lignocellulosic Waste by the Edible Mushroom *Pleurotus*, *Biodegradation* **92**, 189–205.

Hädrich-Meyer, S.; Berger, R. G. (1994) Localization of Lipolytic and Esterolytic Activities of *Tyromyces sambuceus*, A 4-Decanolide-Producing Basidiomycete, *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 210–214.

Hammel, K. E.; Cullen, D. (2008) Role of Fungal Peroxidases in Biological Ligninolysis, *Curr Opin Plant Biol* **11**, 349–355.

Hari, V. (1981) A Method for the Two-Dimensional Electrophoresis of Leaf Proteins, *Anal Biochem* **113**, 332–335.

Hartmann, H. (2007) Handbuch Bioenergie-Kleinanlagen. Gülzow. Gülzow bei Güstrow, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.

Harvey, L. M.; McNeil, B.; Berry; White, S. (1998) Autolysis in Batch Cultures of *Penicillium chrysogenum* at Varying Agitation Rates, *Enzyme Microb Technol* **22**, 446–458.

Heijne, G. von; Abrahmsén, L. (1989) Species-Specific Variation in Signal Peptide Design - Implications for Protein Secretion in Foreign Hosts, *FEBS Lett* **244**, 439–446.

Heinfling, A.; Ruiz-Duenas, F. J.; Martinez, M. J.; Bergbauer, M.; Szewzyk, U.; Martinez, A. T. (1998) A Study on Reducing Substrates of Manganese-Oxidizing Peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*, *FEBS Lett* **428**, 141–146.

Henriksson, G.; Nutt, A.; Henriksson, H.; Pettersson, B.; Stahlberg, J.; Johansson, G.; Pettersson, G. (1999) Endoglucanase 28 (*cel12A*), a new *Phanerochaete chrysosporium* Cellulase, *Eur J Biochem* **259**, 88–95.

Herbert, B.; Galvani, M.; Hamdan, M.; Olivieri, E.; MacCarthy, J.; Pedersen, S.; Righetti, P. G. (2001) Reduction and Alkylation of Proteins in Preparation of Two-Dimensional Map Analysis: Why, When, and How?, *Electrophoresis* **22**, 2046–2057.

Herr, D. (1979) Secretion of Cellulase and Beta-Glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC-1433 in Submerged Culture on Different Substrates., *Biotechnol Bioeng* **21**, 1361–1371.

Heukeshoven, J.; Dernick, R. (1989) Improved Silver Staining Procedure for Fast Staining in Phastsystem Development Unit. I. Staining of Sodium Dodecyl Sulfate Gels, *Electrophoresis* **9**, 28–32.

Highley, T. L. (1987) Effect of Carbohydrate and Nitrogen on Hydrogen Peroxide Formation by Wood Decay Fungi in Solid Medium, *FEMS Microbiol Lett* **48**, 373–377.

Highley, T. L.; Micales, J. A. (1990) Effect of Aromatic Monomers on Production of Carbohydrate-Degrading Enzymes by White-Rot and Brown-Rot Fungi, *FEMS Microbiol Lett* **66**, 15–21.

Hilber, O. (1982) Die Gattung *Pleurotus*, *Biblioth Mycol* **87**, 1-448.

Hlasek, J. (2009) Xylaria polymorpha Dead Man's, Online verfügbar unter http://www.hlasek.com/xylaria_polymorpha_a8464.html, zuletzt aktualisiert am 11.10.2009, zuletzt geprüft am 27.06.2010.

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.; Vares, K.; Scheibner, K.; Galkin, S.; Sipila, J.; Hatakka, A. (1999) 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. (2001a) Conversion of Milled Pine Wood by Manganese Peroxidase from *Phlebia radiata*, *Appl Environ Microbiol* **67**, 4588–4593.

Hofrichter, M.; Steinbüchel, A. (Hg.): (2001b) Biopolymers: Lignin, Humic Substances and Coal. Weinheim, Wiley-VCH.

Hofrichter, M.; Ullrich, R. (2006) Heme-Thiolate Haloperoxidases: Versatile Biocatalysts with Biotechnological and Environmental Significance., *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 276–288.

Holladay, J. E.; White, J. F.; Bozell, J. J.; Johnson, D. (2007) Top Value-Added Chemicals from Biomass, Results of Screening for Potentional Candidates from Biorefinery Lignin. PNNL-16983, Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA.

Huckfeldt, T.; Schmidt, O. (Hg.): (2006) Hausfäule- und Bauholzpilze: Diagnose und Sanierung. Köln, Müller.

Hülsdau, B. (2007) Oxidativer Abbau von Carotenoiden durch Pilzenzyme, Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität.

Iimura, Y.; Ikeda, S.; Sonoki, T.; Hayakawa, T.; Kajita, S.; Kimbara, K.; Tatsumi, K.; Katayama, Y. (2002) Expression of a Gene for Mn-Peroxidase from *Coriolus versicolor* in Transgenic Tobacco Generates Potential Tools for Phytoremediation, *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 246–251.

Iiyama, K.; Lam, T. B.; Stone, B. A. (1994) Covalent Cross-Links in the Cell-Wall, *Plant Physiol* **104**, 315–320.

Isikhuemhen, O. S.; Mikiashvilli, N. A. (2009) Lignocellulolytic Enzyme Activity, Substrate Utilization, and Mushroom Yield by *Pleurotus ostreatus* Cultivated on Substrate Containing Anaerobic Digester Solids, *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**, 1353–1362.

Jennings, D. H. (1989) Some Perspectives on Nitrogen and Phosphorus Metabolism in Fungi, In: Boddy, L.; Machant, R.; Read, D. J. (Hg.) Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi. Cambridge, Cambridge University Press, 1–31.

Jensen, K. A.; Bao, W. L.; Kawai, S.; Srebotnik, E.; Hammel, K. E. (1996) Manganese-Dependent Cleavage of Nonphenolic Lignin Structures by *Ceriporiopsis subvermispora* in the Absence of Lignin Peroxidase, *Appl Environ Microbiol* **62**, 3679–3686.

Jiang, F.; Kongsaeree, P.; Charron, R.; Lajoie, C.; Xu, H.; Scott, G. M.; Kelly, C. (2008) Production and Separation of Manganese Peroxidase from Heme Amended Yeast Cultures, *Biotechnol Bioeng*, 540–549.

Jing, X. Y.; Zhang, X. X.; Bao, J. (2009) Inhibition Performance of Lignocellulose Degradation Products on Industrial Cellulase Enzymes During Cellulose Hydrolysis, *Appl Biochem Biotechnol* **159**, 696–707.

Julenius, K.; Molgaard, A.; Gupta, R.; Brunak, S. (2005) Prediction, Conservation Analysis, and Structural Characterization of Mammalian Mucin-Type O-Glycosylation Sites, *Glycobiology* **15**, 153–164.

Kachlishvili, E.; Penninckx, M. J.; Tsiklauri, N.; Elisashvili, V. (2006) Effect of Nitrogen Source on Lignocellulolytic Enzyme Production by White-Rot Basidiomycetes Under Solid-State Cultivation, *World J Microbiol Biotechnol* **22**, 391–397.

Kaltschmitt, M.; Hartmann, H.; Hofbauer, H. (2009) Energie aus Biomasse: Grundlagen, Techniken und Verfahren. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.

Kaluskar, V. M.; Kapadnis, B. P.; Jaspers, C.; Penninckx, M. J. (1999) Production of Laccase by Immobilized Cells of *Agaricus* sp - Induction Effect of Xylan and Lignin Derivatives, *Appl Biochem Biotechnol* **76**, 161–170.

Kamitsuji, H.; Honda, Y.; Watanabe, T.; Kuwahara, M. (2004) Production and Induction of Manganese Peroxidase Isozymes in a White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl Microbiol Biotechnol* **65**, 287–294.

Kamm, B.; Gruber, P. R.; Kamm, M. (Hg.): (2006) Biorefineries - industrial Processes and Products: Status quo and future directions, [Elektronische Ressource]. Weinheim, Wiley-VCH.

Kamra, D. N.; Zadrazil, F. (1986) Influence of Gaseous-Phase, Light and Substrate Pretreatment on Fruit-Body Formation, Lignin Degradation and *in-vitro* Digestibility of Wheat Straw Fermented with *Pleurotus* sp., *Agric Wastes* **18**, 1–17.

Katunuma, N.; Kominami, E. (1995) Structure, Properties, Mechanisms, and Assays of Cysteine Protease Inhibitors - Cystatins and E-64 Derivatives, *Biothiols, PT A* **251**, 382–397.

Kendrick, B. (2000) The Fifth Kingdom. Newburyport MA, Focus Publ.

Kensy, F.; Engelbrecht, C.; Buchs, J. (2009) Scale-Up from Microtiter Plate to Laboratory Fermenter: Evaluation by Online Monitoring Techniques of Growth and Protein Expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* Fermentations, *Microbial Cell Factories* **8**, 68.

Kersten, P. J.; Witek, C.; Wymelenberg, A. van den; Cullen, D. (1995) *Phanerochaete chrysosporium* Glyoxal Oxidase is Encoded by 2 Allelic Variants - Structure, Genomic Organization, and Heterologous Expression of Glx1 and Glx2, *J Bacteriol* **177**, 6106–6110.

Kilcawley, K. N.; Wilkinson, M. G.; Fox, P. F. (2002) Determination of Key Enzyme Activities in Commercial Peptidase and Lipase Preparations from Microbial or Animal Sources, *Enzyme Microb Technol* **31**, 310–320.

Kim, S. J.; Shoda, M. (1999) Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes, *Appl Environ Microbiol* **65**, 1029–1035.

Kirk, T. K.; Chang, H. M. (1975) Decomposition of Lignin by White-Rot Fungi .2. Characterization of Heavily Degraded Lignins from Decayed Spruce, *Holzforschung* **29**, 56–64.

Kirk, K. T.; Nakatsubo, F. (1983) Chemical Mechanism of an Important Cleavage Reaction in the Fungal Degradation of Lignin, *Biochim Biophys Acta* **756**, 376–384.

Klose, J. (1975) Protein Mapping by Combined Isoelectric Focusing and Electrophoresis of Mouse Tissues - Novel Approach to Testing for Induced Point Mutations in Mammals, *Humangenetik* **26**, 231–243.

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.

Krügener, S.; Zelenaa, K.; Zorn, H.; Nimtz, M.; Bergera, R. G. (2009) Heterologous Expression of an Extra-Cellular Lipase from the Basidiomycete *Pleurotus sapidus*, *J Mol Catal B Enzym* **57**, 16–21.

Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O. V. (2008) Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives, *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**, 377–391.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–685.

Langhoff, S. (2002) Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen, Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität.

Lawson, W. B.; Valenty, V. B.; Wos, J. D.; Lobo, A. P. (1982) Studies on the Inhibition of Human Thrombin Effects of Plasma and Plasma Constituents, *Folia Haematologica (Leipzig)* **109**, 52–60.

Lee, K.; Moon, S. H. (2003) Electroenzymatic Oxidation of Veratryl Alcohol by Lignin Peroxidase, *J Biotechnol* **102**, 261–268.

Liers, C.; Ullrich, R.; Steffen, K. T.; Hatakka, A.; Hofrichter, M. (2006) Mineralization of $_{14}$C-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.; 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.

Lilly, W. W.; Stajich, J. E.; Pukkila, P. J.; Wilke, S. K.; Inoguchi, N.; Gathman, A. C. (2008) An Expanded Family of Fungalysin Extracellular Metallopeptidases of *Coprinopsis cinerea*, *Mycol Res* **112**, 389–398.

Lindenfelser, L. A.; Detroy, R. W.; Ramstack, J. M.; Worden, K. A. (1979) Biological Modification of the Lignin and Cellulose Components of Wheat Straw by *Pleurotus ostreatus*, *Dev Ind Microbiol*, 541–551.

Lineweaver, H.; Burk, D. (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *J Am Chem Soc*, 658–666.

Lis, H.; Sharon, N. (1993) Protein Glycosylation - Structural and Functional-Aspects, *Eur J Biochem* **218**, 1–27.

MacCabe, A. P.; Orejas, M.; Perez-Gonzalez, J. A.; Ramon, D. (1998) Opposite Patterns of Expression of Two *Aspergillus nidulans* Xylanase Genes with Respect to Ambient pH, *J Bacteriol* **180**, 1331–1333.

Martinez, D.; Challacombe, J.; Morgenstern, I.; Hibbett, D.; Schmoll, M.; Kubicek, C. P.; Ferreira, P.; Ruiz-Duenas, F. J.; Martinez, A. T.; Kersten, P.; Hammel, K. E.; Wymelenberg, A. V.; Gaskell, J.; Lindquist, E.; Sabat, G.; BonDurant, S. S.; Larrondo, L. F.; Canessa, P.; Vicuna, R.; Yadav, J.; Doddapaneni, H.; Subramanian, V.; Pisabarro, A. G.; Lavin, J. L.; Oguiza, J. A.; Master, E.; Henrissat, B.; Coutinho, P. M.; Harris, P.; Magnuson, J. K.; Baker, S. E.; Bruno, K.; Kenealy, W.; Hoegger, P. J.; Kues, U.; Ramaiya, P.; Lucash, S.; Salamov, A.; Shapiro, H.; Tu, H.; Chee, C. L.; Misra, M.; Xie, G.; Teter, S.; Yaver, D.; James, T.; Mokrejs, M.; Pospisek, M.; Grigoriev, IV; Brettin, T.; Rokhsar, D.; Berka, R.; Cullen, D. (2009) Genome, Transcriptome, and Secretome Analysis of Wood Decay Fungus *Postia placenta* Supports Unique Mechanisms of Lignocellulose Conversion, *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 1954–1959.

Martinez, M. J.; RuizDuenas, F. J.; Guillen, F.; Martinez, A. T. (1996) Purification and Catalytic Properties of Two Manganese Peroxidase Isoenzymes from *Pleurotus eryngii*, *Eur J Biochem* **237**, 424–432.

McNeil, B.; Berry; Harvey, L. R.; Grant, A.; White, S. (1998) Measurement of Autolysis in Submerged Batch Cultures of *Penicillium chrysogenum*, *Biotechnol Bioeng* **57**, 297–305.

Michaelis, L.; Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertin-Wirkung, *Biochemische Zeitschrift*, 333–369.

Morais, H.; Ramos, C.; Matos, N.; Forgacs, E.; Cserhati, T.; Almeida, V.; Oliveira, J.; Darwish, Y.; Illes, Z. (2002) Liquid Chromatographic and Electrophoretic Characterisation of Extracellular β-Glucosidase of *Pleurotus ostreatus* Grown in Organic Waste, *J Chromatogra B* **770**, 111–119.

Moreira, P. R.; Duez, C.; Dehareng, D.; Antunes, A.; Almeida-Vara, E.; Frere, J. M.; Malcata, F. X.; Duarte, J. C. (2005) Molecular Characterisation of a Versatile Peroxidase from a *Bjerkandera* Strain, *J Biotechnol* **118**, 339–352.

Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Lehninger, A. L.; Beginnen, K.; Nelson-Cox (2005) Lehninger Biochemie: Mit 40 Tabellen. Berlin, Springer.

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.

Neuhoff, V.; Stamm, R.; Pardowitz, I.; Arold, N.; Ehrhardt, W.; Taube, D. (1990) Essential Problems in Quantification of Proteins Following Colloidal Staining with Coomassie Brilliant Blue Dyes in Polyacrylamide Gels, and their Solution, *Electrophoresis* **11**, 101–117.

Neustroev, K. N.; Golubev, A. M.; Firsov, L. M.; Ibatullin, F. M.; Protasevich, I. I.; Makarov, A. A. (1993) Effect of Modification of Carbohydrate Component on Properties of Glucoamylase, *FEBS Lett* **316**, 157–160.

Nie, G. J.; Reading, N. S.; Aust, S. D. (1999) Relative Stability of Recombinant Versus Native Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch Biochem Biophys* **365**, 328–334.

O´Farrell, P. H. (1975) High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins, *J Biol Chem* **250**, 4007–4021.

Ohgren, K.; Bengtsson, O.; Gorwa-Grauslund, M. F.; Galbe, M.; Hahn-Hagerdal, B.; Zacchi, G. (2006) Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Glucose and Xylose in Steam-Pretreated Corn Stover at High Fiber Content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400, *J Biotechnol* **126**, 488–498.

Palmieri, G.; Giardina, P.; Marzullo, L.; Desiderio, B.; Nitti, G.; Cannio, R.; Sannia, G. (1993) Stability and Activity of a Phenol Oxidase from the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl Microbiol Biotechnol* **39**, 632–636.

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.

Paul, G. C.; Thomas, C. R. (1998) Characterisation of Mycelial Morphology Using Image Analysis, *Adv Biochem Eng Biotechnol* **60**, 1–59.

Pemberton, T. J. (2006) Identification and Comparative Analysis of Sixteen Fungal Peptidyl-Prolyl *cis/trans* Isomerase Repertoires, *BMC Genomics* **7,** 244-274.

Penas, M. M.; Asgeirsdottir, S. A.; Lasa, I.; Culianez-Macia, F. A.; Pisabarro, A. G.; Wessels, J. G.; Ramirez, L. (1998) Identification, Characterization, and *in situ* Detection of a Fruit-Body-Specific Hydrophobin of *Pleurotus ostreatus*, *Appl Environ Microbiol* **64**, 4028–4034.

Perez-Boada, M.; Ruiz-Duenas, F. J.; Pogni, R.; Basosi, R.; Choinowski, T.; Martinez, M. J.; Piontek, K.; Martinez, A. T. (2005) Versatile Peroxidase Oxidation of High Redox Potential Aromatic Compounds: Site-Directed Mutagenesis, Spectroscopic and Crystallographic Investigation of Three Long-Range Electron Transfer Pathways, *J Mol Biol* **354**, 385–402.

Peters, T. (März 2003) Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten, Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität.

Pettersson, G.; Porath, J. (1963) Studies on Cellulolytic Enzymes .2. Multiplicity of Cellulolytic Enzymes of *Polyporus versicolor*, *Biochim Biophys Acta* **67**, 9-15.

Poehling, H. M.; Neuhoff, V. (1981) Visualization of Proteins with a Silver Stain - A Critical Analysis, *Electrophoresis* **2**, 141–147.

Polachek, I.; Cabib, E. (1981) A Simple Procedure for Protein Determination by the Lowry Method in Dilute Solutions and in the Presence of Interfering Substances, *Anal Biochem* **1981**, 311–314.

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 Enzyme, *Arch Biochem Biophys* **159**, 61–69.

Rabilloud, T.; Charmont, S. (2000) Detection of Proteins on Two-Dimensional Electrophoresis Gels, In: Rabilloud, T. (Hg.) Proteome Research. Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Berlin , New York, Springer.

Ramezani-Rad, M.; Hollenberg, C. P.; Lauber, J.; Wedler, H.; Griess, E.; Wagner, C.; Albermann, K.; Hani, J.; Piontek, M.; Dahlems, U.; Gellissen, G. (2003) The *Hansenula polymorpha* (Strain CBS4732) Genome Sequencing and Analysis, *FEMS Yeast Res* **4**, 207–215.

Ravalason, H.; Jan, G.; Mollé, D.; Pasco, M.; Coutinho, P. M.; Lapierre, C.; Pollet, B.; Bertaud, F.; Petit-Conil, M.; Grisel, S.; Sigoillot, J.-C.; Asther, M.; Herpoël-Gimbert, I. (2008) Secretome Analysis of *Phanerochaete chrysosporium* Strain CIRM-BRFM41 Grown on Softwood, *Appl Microbiol Biotechnol* **80**, 719-733.

Reale, S.; Attanasio, F.; Spreti, N.; Angelis, F. de (2010) Lignin Chemistry: Biosynthetic Study and Structural Characterisation of Coniferyl Alcohol Oligomers Formed In Vitro in a Micellar Environment, *Chem Europ J* **16**, 6077–6087.

Reddy, G. V.; Babu, P. R.; Komaraih, P.; Roy, K.; Kothari, I. L. (2003) Utilization of Banana Waste for the Production of Lignolytic and Cellulolytic Enzymes by Solid Substrate Fermentation Using Two *Pleurotus* Species (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*), *Process Biochem* **38**, 1457–1462.

Rehm, H.; Letzel, T. (2010) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Richardson, A.; Stewart, D.; McDougall, G. J. (1997) Identification and Partial Characterization of a Coniferyl Alcohol Oxidase from Lignifying Xylem of Sitka Spruce (*Picea sitchensis*), *Planta* **203**, 35–43.

Ritch, T. G.; Nipper, V. J.; Akileswaran, L.; Smith, A. J.; Pribnow, D. G.; Gold, M. H. (1991) Lignin Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* is Synthesized as a Preproenzyme, *Gene* **107**, 119–126.

Rolz, C.; Leon, R. de; Arriola, M. C. de (1988) Biological Pretreatment of Coffee Pulp, *Biol Wastes* **26**, 97–114.

Ruiz, E.; Cara, C.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; Castro, E. (2008) Evaluation of Steam Explosion Pre-Treatment for Enzymatic Hydrolysis of Sunflower Stalks, *Enzyme Microb Technol* **42**, 160–166.

Ruiz-Duenas, F. J.; Pogni, R.; Morales, M.; Giansanti, S.; Mate, M. J.; Romero, A.; Martinez, M. J.; Basosi, R.; Martinez, A. T. (2009a) Protein Radicals in Fungal Versatile Peroxidase Catalytic Tryptophan Radical in both Compound I and Compound I and Studies on W164Y, W164H, and W164S Variants, *J Biol Chem* **284**, 7986–7994.

Ruiz-Duenas, F. J.; Camarero, S.; Perez-Boada, M.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (2001) A New Versatile Peroxidase from *Pleurotus*, *Biochem Soc Trans* **29**, 116–122.

Ruiz-Duenas, F. J.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (1999) Molecular Characterization of a Novel Peroxidase Isolated from the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*, *Mol Microbiol* **31**, 223–235.

Ruiz-Duenas, F. J.; Morales, M.; Garcia, E.; Miki, Y.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T. (2009b) Substrate Oxidation Sites in Versatile Peroxidase and Other Basidiomycete Peroxidases, *J Exp Bot* **60**, 441–452.

Rumbold, K.; Biely, P.; Mastihubova, M.; Gudelj, M.; Gubitz, 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.

Rüpke, H. J.; Fiedler, C. (2010) Braunfäule und Weißfäule - die wichtigen, zu unterscheidenden Fäulearten holzzerstörender Pilze, Sachverständigenbüro für Holzschutz.Online verfügbar unter http://www.holzfragen.de/seiten/ braunfaeule.html, zuletzt aktualisiert am 30.05.2010, zuletzt geprüft am 27.06.2010.

Saparrat, M. C.; Guillen, F.; Arambarri, A. M.; Martinez, A. T.; Martinez, M. J. (2002) Induction, Isolation, and Characterization of Two Laccases from the White-Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida*, *Appl Environ Microbiol* **68**, 1534–1540.

Sarioglu, H.; Lottspeich, F.; Walk, T.; Jung, G.; Eckerskorn, C. (2000) Deamidation as a Widespread Phenomenon in Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Human Blood Plasma Proteins, *Electrophoresis* **21**, 2209–2218.

Sarkanen, K. V.; Ludwig, C. H. (Hg.): (1971) Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions. New York, Wiley-Interscience.

Savoie, J.-M.; Salmones, D.; Mata, G. (2007) Hydrogen Peroxide Concentration Measured in Cultivation Substrates During Growth and Fruiting of the Mushrooms *Agaricus bisporus* and *Pleurotus* spp., *J Sci Food Agric* **87**, 1337–1344.

Scheibner, M. (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoidabbauender Enzyme aus Basidiomyceten, Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität.

Scheibner, M.; Hulsdau, B.; Zelena, K.; Nimtz, M.; Boer, L. de; Berger, R. G.; Zorn, H. (2008) Novel Peroxidases of *Marasmius scorodonius* Degrade β,β-Carotene, *Appl Microbiol Biotechnol* **77**, 1241–1250.

Sensel, K.; Wragge, V.; Ellmer, F. (2009) Pflanzenbauliche Nutzung von Gärprodukten, In: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (Hg.) Gärrestaufbereitung für eine pflanzenbauliche Nutzung - Stand und F+E-Bedarf. 21. Januar 2009, Gülzow. Gülzow bei Güstrow, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe.

Shevchenko, A.; Sunyaev, S.; Loboda, A.; Shevchenko, A.; Bork, P.; Ens, W.; Standing, K. G. (2001) Charting the Proteomes of Organisms with Unsequenced Genomes by MALDI-Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry and BLAST Homology Searching, *Anal Chem* **73**, 1917–1926.

Shin, K. S.; Oh, I. K.; Kim, C. J. (1997) Production and Purification of Remazol Brilliant Blue R Decolorizing Peroxidase from the Culture Filtrate of *Pleurotus ostreatus*, *Appl Environ Microbiol* **63**, 1744–1748.

Sigman, D. S.; Kuwabara, M. D.; Chen, C. H.; Bruice, T. W. (1991) Nuclease Activity of 1,10-Phenanthroline Copper in Study of Protein-DNA Interactions, *Methods Enzymol* **208**, 414–432.

Smith, M. H.; Gold, M. H. (1979) *Phanerochaete chrysosporium* β-Glucosidases - Induction, Cellular-Localization, and Physical Characterization, *Appl Environ Microbiol* **37**, 938–942.

Snajdr, J.; Baldrian, P. (2008) Temperature Affects the Production, Activity and Stability of Ligninolytic Enzymes in *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor*, *Folia Microbiol (Praha)* **52**, 498–502.

Songulashvili, G.; Elisashvili, V.; Wasser, S. P.; Nevo, E.; Hadar, Y. (2007) Basidiomycetes Laccase and Manganese Peroxidase Activity in Submerged Fermentation of Food Industry Wastes, *Enzyme Microb Technol* **41**, 57–61.

Spadaro, J. T.; Gold, M. H.; Renganathan, V. (1992) Degradation of Azo Dyes by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl Environ Microbiol* **58**, 2397–2401.

Sprecher, E. (1959) Über die Guttation bei Pilzen, *Planta*, 565–574.

Staszczak, M. (2008) The Role of the Ubiquitin-Proteasome System in the Response of the Ligninolytic Fungus *Trametes versicolor* to Nitrogen Deprivation, *Fungal Genet Biol* **45**, 328–337.

Stewart, P.; Whitwam, R. W.; Kersten, P. J.; Cullen, D.; Tien, M. (1996) Efficient Expression of a *Phanerochaete chrysosporium* Manganese Peroxidase Gene in *Aspergillus niger*, *Appl Environ Microbiol*, 860–864.

St Leger, R. J.; Nelson, J. O.; Screen, S. E. (1999) The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* Alters Ambient pH, Allowing Extracellular Protease Production and Activity, *Microbiology -UK* **145**, 2691–2699.

Strasburger, E.; Sitte, P. (Hg.): (2002) Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 35. Aufl. Heidelberg, Spektrum Akad. Verl.

Streeter, C. L.; Conway, K. E.; Horn, G. W.; Mader, T. L. (1982) Nutritional-Evaluation of Wheat Straw Incubated with the Edible Mushroom, *Pleurotus ostreatus*, *J Animal Sci* **54**, 183–188.

Stryer, L. (1999) Biochemie. Heidelberg, Spektrum Akad. Verl.

Sugano, Y.; Sasaki, K.; Shoda, M. (1999) cDNA Cloning and Genetic Analysis of a Novel Decolorizing Enzyme, Peroxidase Gene Dyp from *Geotrichum candidum* Dec 1, *J Biosci Bioeng* **87**, 411–417.

Tenkanen, M. (1998) Action of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus oryzae* Esterases in the Deacetylation of Hemicelluloses, *Biotechnol Appl Biochem* **27**, 19–24.

Tien, M.; Kirk, K. T. (1984) Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* - Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H_2O_2-Requiring Oxygenase, *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 2280–2284.

Uzcategui, E.; Ruiz, A.; Montesino, R.; Johansson, G.; Pettersson, G. (1991) The 1,4-β-D-Glucan Cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. 1. A System of Synergistically Acting Enzymes Homologous to *Trichoderma reesei*, *J Biotechnol* **19**, 271–285.

van der Heide, M.; Leao, A. N.; van der Klei, I. J.; Veenhuis, M. (2007) Redirection of Peroxisomal Alcohol Oxidase of *Hansenula polymorpha* to the Secretory Pathway, *FEMS Yeast Res* **7**, 1093–1102.

Varela, E.; Bockle, B.; Romero, A.; Martinez, A. T.; Martinez, M. J. (2000) Biochemical Characterization, cDNA Cloning and Protein Crystallization of Aryl-Alcohol Oxidase from *Pleurotus pulmonarius*, *Biochim Biophys Acta* **1476**, 129–138.

Varela, E.; Martinez, A. T.; Martinez, M. J. (1999) Molecular Cloning of Aryl-Alcohol Oxidase from the Fungus *Pleurotus eryngii*, an Enzyme Involved in Lignin Degradation, *Biochem J* **341**, 113–117.

Wariishi, H.; Valli, K.; Gold, M. H. (1991) *In vitro* Depolymerization of Lignin by Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Biochem Biophys Res Commun* **176**, 269–275.

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.

Weiland, P. (2010) Biogas Production: Current State and Perspectives, *Appl Microbiol Biotechnol* **85**, 849–860.

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.

Whitwam, R. W.; Tien, M. (1996) Heterologous Expression and Reconstitution of Fungal Mn Peroxidase, *Arch Biochem Biophys*, 439–446.

Willick, G. E.; Seligy, V. L. (1985) Multiplicity in Cellulases of *Schizophyllum commune* - Derivation Partly from Heterogeneity in Transcription and Glycosylation, *Eur J Biochem* **151**, 89–96.

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.

Wolfenden, B. S.; Willson, R. L. (1982) Radical-Cations as Reference Chromogens in Kinetic-Studies of One-Electron Transfer-Reactions - Pulse-Radiolysis Studies of 2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulphonate), *J Chem Soc - Perk Tran 2*, 805–812.

Wymelenberg, A. V.; Gaskell, J.; Mozuch, M.; Kersten, P.; Sabat, G.; Martinez, D.; Cullen, D. (2009) Transcriptome and Secretome Analyses of *Phanerochaete chrysosporium* Reveal Complex Patterns of Gene Expression, *Appl Environ Microbiol* **75**, 4058–4068.

Wymelenberg, A. V.; Sabat, G.; Martinez, D.; Rajangam, A. S.; Teeri, T. T.; Gaskell, J.; Kersten, P. J.; Cullen, D. (2005) The *Phanerochaete chrysosporium* Secretome: Database Predictions and Initial Mass Spectrometry Peptide Identifications in Cellulose-Grown Medium, *J Biotechnol* **118**, 17–34.

Yamanaka, R.; Soares, C. F.; Matheus, D. R.; Machado, K. M. (2008) Lignolytic Enzymes Produced by *Trametes villosa* CCB176 Under Different Culture Conditions, *Braz J Microbiol* **39**, 78–84.

Yan, J. X.; Sanchez, J. C.; Rouge, V.; Williams, K. L.; Hochstrasser, D. F. (1999) Modified Immobilized pH Gradient Gel Strip Equilibration Procedure in SWISS-2DPAGE Protocols, *Electrophoresis* **20**, 723–726.

Yokota, S.; Umezawa, T.; Higuchi, T.; Kawai, S. (1990) Degradation of Phenolic β-1-Lignin Substructure Model Dimer by *Phanerochaete chrysosporium* and its Lignin Peroxidase, *Holzforschung* **44**, 271–276.

Zadrazil, F. (1980) Conversion of Different Plant Waste into Feed by Basidiomycetes, *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* **9**, 243–248.

Zamocky, M.; Ludwig, R.; Peterbauer, C.; Hallberg, B. M.; Divne, C.; Nicholls, P.; Haltrich, D. (2006) Cellobiose Dehydrogenase - A Flavocytochrome from Wood-Degrading, Phytopathogenic and Saprotropic Fungi, *Curr Protein Pept Sci* **7**, 255–280.

Zervakis, G.; Sourdis, J.; Balis, C. (1994) Genetic Variability and Systematics of eleven *Pleurotus* Species Based on Isozyme Analysis, *Mycol Res* **98**, 329–341.

Zhao, J.; Janse, B. J. H. (1996) Comparison of H_2O_2-producing Enzymes in Selected White Rot Fungi, *FEMS Microbiol Lett* **139**, 215–221.

Ziegenhagen, D.; Hofrichter, M. (2000) A Simple and Rapid Method to Gain High Amounts of Manganese Peroxidase with Immobilized Mycelium of the Agaric White-Rot Fungus *Clitocybula dusenii*, *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 553–557.

Zimmermann, W. (1990) Degradation of Lignin by Bacteria, *J Biotechnol* **13**, 119–130.

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.; Bouws, H.; Takenberg, M.; Nimtz, M.; Getzlaff, R.; Breithaupt, D. E.; Berger, R. G. (2005a) An Extracellular Carboxylesterase from the Basidiomycete *Pleurotus sapidus* Hydrolyses Xanthophyll Esters, *Biol Chem* **386**, 435–440.

Zorn, H.; Peters, T.; Nimtz, M.; Berger, R. G. (2005b) The Secretome of *Pleurotus sapidus*, *Proteomics* **5**, 4832–4838.

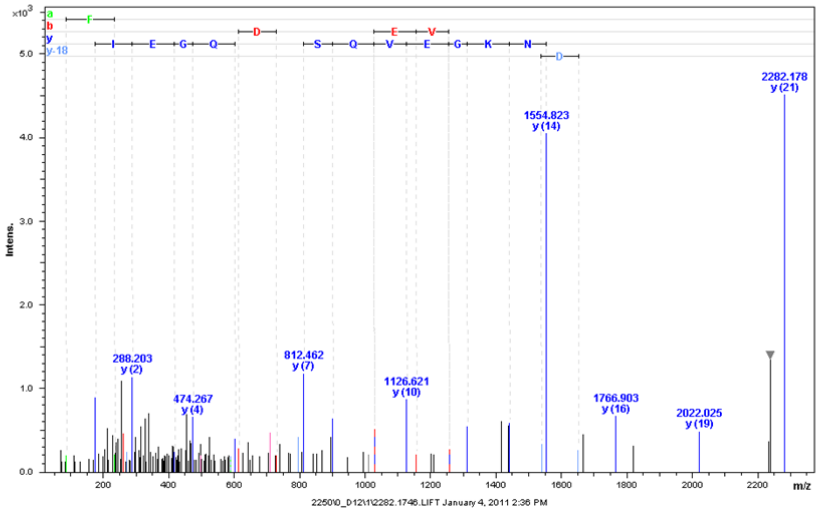
6 Anhang

6.1 Massenspektrometrische Identifizierung der gereinigten polyvalenten Peroxidase

PG284-P01-2010-1423 MS/MS 2282.1746 PROT@GEN®

LFPGTPDNKGEVQSPLQGEIR (Mascot-Score 112.1)

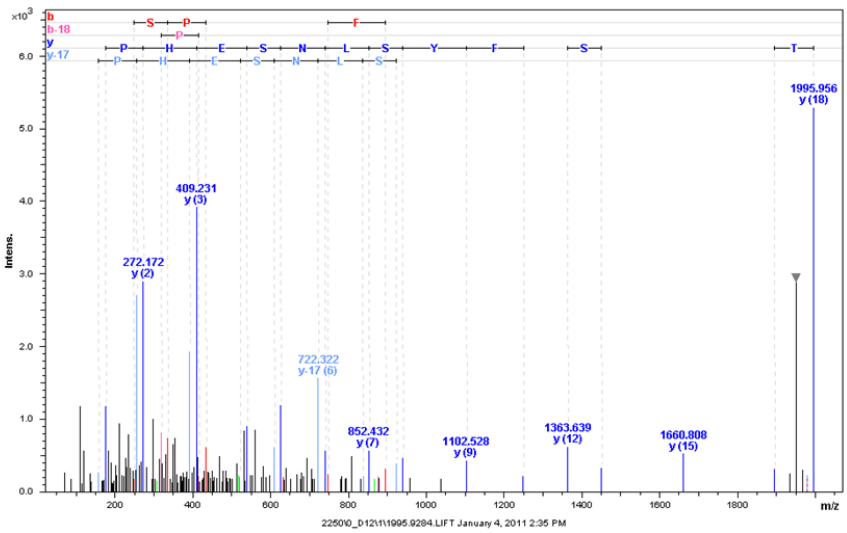
gi|74381896 putative versatile peroxidase [Pleurotus sapidus]



PG284-P01-2010-1423 MS/MS 1995.9283 PROT@GEN®

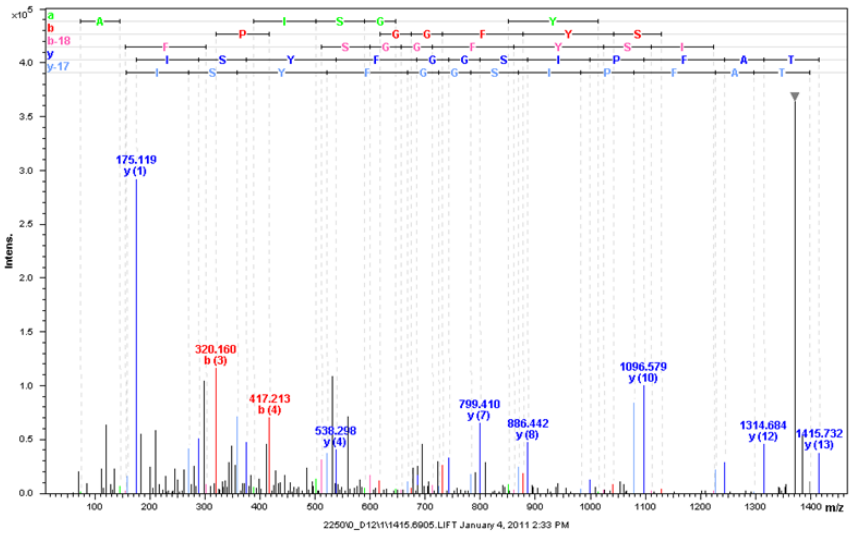
Peaks-Score >90%, Mascot-Score 142.3

TFSPLSGGFYSLNSEHPR TFSPLSNFYSLNSEHPR
TSFPLSGGFYSLNSEHPR TSFPLSNFYSLNSEHPR
THPPLSGGFYSLNSEHPR THPPLSNFYSLNSEHPR
TPHPLSGGFYSLNSEHPR TPHPLSNFYSLNSEHPR



PG284-P01-2010-1423 MS/MS 1415.6904 PROT@GEN®

TAFPISGGFYSIR (Peaks-Score >99%, Mascot-Score 96.9)



PG284-P01-2010-1423 MS/MS 1254.6415 PROT@GEN®

Peaks-Score >97%, Mascot-Score 55.6

R**AAQLAGFPAPR**

VG**AAQLAGFPAPR**

GV**AAQLAGFPAPR**

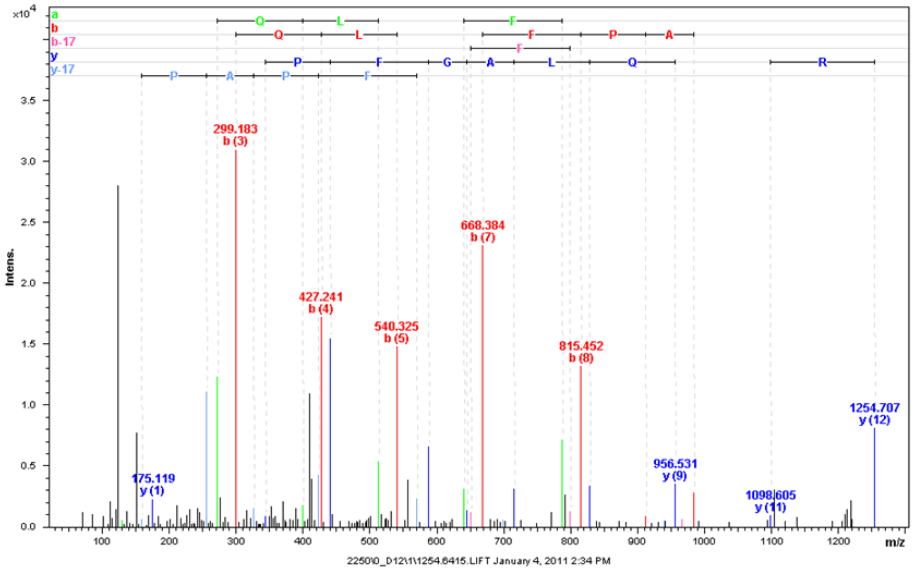


Abbildung a1: Massenspektren der identifizierten Peptide der 28 kDa Bande (2.1.1.2 e))

6.2 Heterologe polyvalente Peroxidase aus *Hansenula polymorpha*

Ausgehend von der Aminosäuresequenz (Abbildung a2) der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* wurden bei der Firma Artes® Biotechnology GmbH, Langenfeld rekombinante *Hansenula polymorpha* Stämme generiert.

```
ORIGIN·····
·····1·msfktlsalv·lalgaavgft·saavprvgkr·atcadgrtta·naaccvlfpi·lddigenlfd
·····61·gggcgeevhe·slrltfhdai·gfsptlgggg·adgsiitfdt·ietvfpanag·ideivsagkp
·····121·fvakhnisag·dfigfagavg·vsncpggvri·pfflgrpdav·aaspdhlvpe·pfdsvdtila
·····181·rmgdagfsav·evvwllashs·iaaadlvdps·ipgtpfdstp·gvfdsgffie·tglkgrlfpg
·····241·tpdnkgevgs·plggeirlgs·dhllardpgt·acewgsmvnn·gpkignrfaa·tmskmallgg
·····301·dksklidcsd·viptppalvg·aahlpagfsl·sdveqacaet·pfpaltadpg·pvtsvppvpg
·····361·s
```

Abbildung a2: Aminosäureseqeunz der polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus sapidus*; Accession-Nr: CAJ01576

Die polyvalente Peroxidase aus *Pleurotus sapidus* besteht aus 361 Aminosäuren, in denen ein N-terminales Signalpeptid enthalten ist. Mittels Edmann-Abbau des reifen Proteins wurde eine Länge des Signalpeptids von 30 Aminosäuren bestimmt. Bioinformatisch (Signal P) wurde ein Signalpeptid von 22 Aminosäuren erhalten. Es 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 MFα Präprosequenz, bei der D83 mit E ausgetauscht wurde. Diese Fusionsproteine wurden als MFαE-VP(331)-H6 (331 C-terminale Aminosäuren) und MFαE-VP(339)-H6 (339 C-terminale Aminosäuren der Peroxidase) bezeichnet. Die synthetischen Gene wurden 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.

Für die aufgeführten Zielplasmide (Tabelle t1) wurden je 30 rekombinante *Hansenula polymorpha* RB11-Stämme generiert. Um Peroxidase-positive Stämme zu identifizieren, wurden die Stämme im 500 µL Mikrotiterplattenmaßstab kultiviert. Dabei wurden Derepressionen/Methanol-Induktionen in drei verschiedenen Medien durchgeführt: Yeast Nitrogen Based (YNB) ungepuffert, YNB pH 6 (Natriumphosphat gepuffert) und Yeast-Pepton

Medium (YP). Für die Derepressionsphase wurde 2% Glycerol als Kohlenstoffquelle eingesetzt, die anschließende Methanol-Induktion erfolgte mit 1% Methanol (4.6.2.4). Als Negativkontrollstamm diente pFPMT121/RB11, bei dem der Vektor pFPMT121 (ohne Insert) genomisch integriert wurde. Aliquots der resultierenden Kulturüberstände wurden mittels ABTS-Assay (4.7.1.1) analysiert.

Tabelle t1: Zusammenfassung der Peroxidaseaktivitäten von Kulturüberständen rekombinanter *Hansenula polymorpha* RB11-Stämme nach Methanol-Induktion in verschiedenen Medien. Als positiv wurden Extinktionen$_{240nm}$ > 0,2 gewertet.

Stammserie	**Fusionsprotein**	**Medium**	**Positive**
pFPMT-MFαE-VP(331)-H6 # 8/RB11	MFαE-VP(331)-H6	YNB ungepuffert	3
		YNB pH6	0
		YP	0
pFPMT-MFαE-VP(339)-H6 # 1/RB11	MFαE-VP(339)-H6	YNB ungepuffert	4
		YNB pH6	0
		YP	0

Ein Stamm je Konstrukt wurde der Universität Giessen zur Analyse überlassen.

6.3 Peptiddaten der Übersichtsanalyse

Die zweidimensionalne Gele der Übersichtsanalyse wurden von der Firma Protagen AG, Dortmund durchgeführt.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgt nach einem modifizierten Protokoll (Klose, 1999 modifiziert) unter Nicht-Gleichgewichtsbedingungen (NEPHGE) (Weingarten *et al*., 2005) unter Verwendung von 20 cm Röhrchengelen. Nach Abbruch der Fokussierung wurden die IEF Gele auf SDS Gele (15% Arcylamid) der Dimension 250 x 200 mm^2 gelegt und anschließend nach ihrem apparenten Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Detektion der getrennten Proteinspots diente eine Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988). Nach dem Ausstechen der Proteinspots wurden die Gelstücke gewaschen und mit Trypsin

versetzt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Peptide mit 0.1% TFA extrahiert. Die Peptide wurden über eine Umkehrphasensäule gereinigt, bevor sie auf ein MALDI Target aufgegeben wurden. Als Matrix diente α-Cyanohydroxyzimtsäure. Die Messung erfolgte mittels Ultraflex III TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonik). Für Peptid-Massen-Fingerabdrucksprektren (PMF, MS) wurden 200 Einzelspektren aufsummiert. Die Signale im Spektrum wurden mittels des SNAP Algorithmus detektiert. Die resultierenden Massenlisten wurden in der Proteinscape™ Datenbank gespeichert und ausgewertet. Peptid-Fragmentierungs-Fingerabdruckspektren (PFF, MS/MS) wurden von denjenigen Signalen aufgenommen, bei denen dies technisch machbar war. Die Proteinidentifizierung wurde über eine Suche der Spektren gegen die NCBI Proteindatenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) vorgenommen. Hierzu wurden mehrere externe Suchalgorithmen verwendet (ProFound™, Mascot™, Sequest™).

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

Tabelle t2: Auflistung der mitels MALDI ermittelten Peptide

Spotnummer					**ermittelte Peptide**
126-01	Laccase2 [*Pleurotus sapidus*]				
SpecID	m/z	z	Mass		Peptide
126-01	1511,7812	1		1511,7812	TSNSDVVNLVNPPR
126-01	1667,8824	1		1667,8824	TSNSDVVNLVNPPRR
126-02	Arylalkohol Oxidase Vorläufer				
SpecID	m/z	z	Mass		Peptide
126-02	1446,77	1		1446,77	LVNSGTTNGLPAFR
126-02	1898,8151	1		1898,8151	DSSEFNADLDQWTNTR
126-02	2355,0789	1		2355,0789	YAAVTGDDGWNWDNIQQFVR
126-02	1232,6593	1		1231,65198	TKGPLYLGMPR
126-02	1664,80151	1		1663,79419	LSDPTNDAALPAGGPLR
126-02	1936,09314	1		1935,08582	KGLVSAGGKGVPA(CamC)NGGPGPR
126-02	2290,19531	1		2289,18799	(OxH)GTWFDYLVVGAGNAGNVVAAR
126-41	359,024536	2		716,034546	CAMHKK
126-41	500,748596	2		999,482666	DPSVCTGPPK
126-41	634,67688	2		1267,33923	CCTST(OxH)MVSKR
126-41	715,268188	2		1428,52185	(OxH)KCA(CamC)VEEAGPGR
126-41	765,920471	2		1529,82642	LYPTGAGNAHMTAAR
126-41	1456,55774	2		2911,10083	M(OxM)GPMENDNHCCGPGCGTPYEFMGCSK
126-03	Laccase2 [*Pleurotus sapidus*]				
SpecID	m/z	z	Mass		Peptide
126-03	1511,7812	1		1511,7812	TSNSDVVNLVNPPR

126-03	1667,8824	1	1667,8824	TSNSDVVNLVNPPRR
126-03	2037,1379	1	2037,1379	KPQDFLPSEQVIILPANK
126-03	2720,442	1	2720,442	LIEVSIPGAGAHPFHLHGHTFDIVR
126-03	2055,98389	1	2054,97656	APEVNDGEQAQLVTQDSVR
126-04	Carotinoidester Lipase Vorläufer [*Pleurotus sapidus*]			
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-04	1332,6543	1	1332,6543	ADGVFLTDNPQR
126-04	1439,7893	1	1439,7893	LPEPIPPYTGTVR
126-04	1531,7904	1	1531,7904	FLGIPYAQPPTGDR
126-04	1342,65698	1	1341,64966	DAGVGGGLGLQDQR
126-05				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-05	1105,55811	1	1104,55078	SALFPTDAQR
126-05	1293,64514	1	1292,63782	FPSPLAGTGAGYR
126-05	1783,87646	1	1782,86914	LVLDGVVDSENYFASR
126-05	3171,64697	1	3170,63965	VGVAAAAVFPKANKHEHL(OxM)EHLSAGEGGTAR
126-06	POXA3a Laccase Untereinheit [*Pleurotus ostreatus*]			
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-06	1126,6579	1	1126,6579	TLPNSINLVR
126-06	1933,9751	1	1932,96777	TPSNTNPALYQALSTCPR
126-06	2120,13184	1	2119,12451	VLMLDAKQFLTQAMVC(OxH)R
126-06	2136,14844	1	2135,14111	EDDLDAQQFLTKAGLTAGSR
126-06	2152,1272	1	2151,11987	(OxM)SSGGAPAQQ(OxM)LTGAAAVDNSR
126-07				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-07	982,511353	1	981,504089	A(OxH)QLGGMPR
126-07	1016,46301	1	1015,45575	GSGGKLAACPR
126-08				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-08	1281,65515	1	1280,64783	TPPASGSPTTPLR
126-08	1459,68079	1	1458,67346	NDLVWSPVAN(CamC)GK
126-09				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-09	1288,72559	1	1287,71826	ASKTSTVLTGVPK
126-09	2311,17383	1	2310,1665	TGGGGASNFELTPEG(OxH)LVETHGK
126-10				
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-10	1418,59302	1	1417,58569	ASH(OxM)NFADHNCR
126-11	PLMP_PLEOS Peptidyl-Lys metalloendopeptidase (MEP) (PoMEP)			
SpecID	m/z	z	Mass	Peptide
126-11	2559,1383	1	2559,1383	SNPAQAIDNADSHEYFAENNPALA
126-11	1465,711	1	1465,711	YTTWFGTFVTSR
126-11	1441,7183	1	1441,7183	GGTLIHESSHFTR
126-11	1083,5252	1	1083,5252	ATFVGCPAmSATR
126-11	1448,69275	1	1447,68542	YTALHESSNSPSR
126-11	1946,90637	1	1945,89905	NGGTDDHVYGQTGAQPCAR
126-37	341,011169	2	680,007813	VVHGAAK
126-37	688,301025	1	687,293762	(CamC)CLHR
126-37	573,735657	2	1145,45679	CAAKVH(CamC)(OxW)R
126-37	555,273438	2	1108,53235	CCPLVGCSSLK
126-37	620,459167	2	1238,90381	GPNLVCPTSHSK
126-37	498,69455	2	995,374573	WDPVN(OxH)GR
126-37	688,831665	2	1375,6488	DRAVTPPWLHGK
126-37	355,070374	2	708,126221	GGHDAPR

126-37		643,629028	2	1285,24353	THSPDCTTAEPK
126-37		1136,1803	2	2270,34595	ALLNFKHAEGTSMVLEQLAAK
126-37		337,165009	2	672,315491	AAPPSCK
126-37		491,258911	2	980,503296	TYLLCLQK
126-37		729,300293	2	1456,58606	KPHHEPAACGVRR
126-37		561,240906	2	1120,46729	GFAAPLCLMAK
126-12	Laccase2 [*Pleurotus sapidus*]				
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-12		928,5363	1	928,5363	KLDFHIR
126-12		1234,5699	1	1234,5699	NDVVSPDGFER
126-12		1478,7526	1	1478,7526	GTFIVYDPNDPLK
126-12		1577,7972	1	1577,7972	STSIHWHGLFQHK
126-12		1768,0367	1	1768,0367	AITVNGIFPGTPVILQK
126-39		807,791931	2	1613,56934	YWSCCQNS(OxH)GEER
126-39		705,391602	1	704,384338	NRPYR
126-39		654,753723	2	1307,49292	FGNSEMVVSPNK
126-39		593,359741	2	1184,70496	MDTAPSNGGAHK
126-39		507,295044	2	1012,57556	DAVLNGVGLR
126-39		429,089233	2	856,16394	NG(OxW)ATHR
126-39		1064,59839	2	2127,18213	TL(CamC)CCLSANPPKALL(CamC)HVK
126-13	Laccase2 [*Pleurotus sapidus*]				
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-43		1234,5699	1	1234,5699	NDVVSPDGFER
126-43		2006,0665	1	2006,0665	APLTGGNPTGNPNLDVSLIR
126-43		558,787781	2	1115,56104	TPAYPPVDTR
126-43		564,780762	2	1127,547	SDA(CamC)KTPHGR
126-43		589,289734	2	1176,56494	CPEHLFEFR
126-43		514,374451	1	513,367188	TTHR
126-43		655,385925	2	1308,75732	MNVHNGPENAVK
126-43		527,275513	2	1052,5365	VLLGP(OxH)VFR
126-43		746,345093	1	745,33783	E(OxH)ASMR
126-43		643,585144	1	642,577881	VHPYK
126-14					
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-14		1101,58765	1	1100,58032	GGGNPAFVVQR
126-14		1140,54224	1	1139,53491	GEDFTSAGGATK
126-15					
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-15		922,549622	1	921,542358	LNGLPPGVR
126-15		1315,65002	1	1314,6427	AASVSAELDLSPR
126-15		1347,67566	1	1346,66833	(OxM)SSDGLPAMGLPR
126-15		1370,78992	1	1369,78259	LGGGGGSALVAGGGGAGR
126-15		1442,81641	1	1441,80908	AGVLLQATLSADQR
126-15		1932,90442	1	1931,89709	AAAGGGGGNSSQTPASSGKSGAR
126-44		785,533691	1	784,526428	CCWCDR
126-44		274,905884	2	547,797241	(CamC)VDR
126-44		510,870972	1	509,863708	ARHK
126-44		486,763153	2	971,51178	DPALSGGGNGK
126-44		414,221313	2	826,428101	GAMTEYR
126-44		954,560913	1	953,55365	AYCCEHTK
126-44		435,331268	2	868,64801	VGVMAHGAK
126-44		486,713226	2	971,411926	HHADGGGPPK
126-44		1316,46399	2	2630,91333	THTSHCHSRHPVVV(OxH)GTLS(OxW)GHK
126-44		1105,24585	2	2208,47705	DAA(OxH)QAPCCGSNS(OxH)APALVSNK

126-44		489,39621	2	976,777893	DLSAVPGYR
126-44		988,529724	2	1975,04492	NGT(OxH)LAMHAGTNGTGNHNR
126-16	Laccase2 [*Pleurotus sapidus*]				
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-16		1768,0367	1	1768,0367	AITVNGIFPGTPVILQK
126-16		928,5363	1	928,5363	KLDFHIR
126-16		1234,5699	1	1234,5699	NDVVSPDGFER
126-16		1248,57764	1	1247,57031	GGDVVSPDG(OxH)HR
126-16		1449,69653	1	1448,68921	STSLHWHGL(OxM)HK
126-17	Laccase2 [*Pleurotus sapidus*]				
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-17		1478,7526	1	1478,7526	GTFIVYDPNDPLK
126-17		1797,0017	1	1797,0017	GGPLVPYAVINVEQGKR
126-17		2006,0665	1	2006,0665	APLTGGNPTGNPNLDVSLIR
126-18					
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-18		1013,57123	1	1012,56396	VGGPGTTLVGR
126-18		1127,67102	1	1126,6637	LVMGVNSV(OxH)R
126-18		1433,80078	1	1432,79346	KPLYSTTGGLAVAR
126-18		1876,92065	1	1875,91333	DVVTYAMGYGGGCNLNSR
126-19	Laccase2 [*Pleurotus sapidus*]				
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-19		1797,0017	1	1797,0017	GGPLVPYAVINVEQGKR
126-19		2006,0665	1	2006,0665	APLTGGNPTGNPNLDVSLIR
126-19		2020,08667	1	2019,07935	QAPTLNPTGNNCPTGGGGAHR
126-20					
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-20		924,466858	1	923,459595	GNTADAGYR
126-20		1022,59711	1	1021,58984	ATLVPLVGPR
126-20		1573,76074	1	1572,75342	SLKVPGPGFSETQAR
126-20		1659,84033	1	1658,83301	VGGGHGHHPNGEV(OxH)PR
126-40		529,757935	2	1057,50134	(OxH)FKTPDAAR
126-40		590,317017	1	589,309753	GNLMR
126-40		422,878693	2	843,742859	WSVS(OxH)GR
126-40		1003,11139	2	2004,20825	ECSNPAAGNTTKGLVYV(OxH)K
126-40		518,284363	1	517,2771	EVDR
126-21	Laccase2 [*Pleurotus sapidus*]				
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-21		1478,7526	1	1478,7526	GTFIVYDPNDPLK
126-21		2516,31348	1	2515,30615	DTPGAF(OxM)QTGSVPLPDTGLLNGVGR
126-21		2530,32959	1	2529,32227	QAGGGAFFKTGTVPLPDTGEPNGVGR
126-36		461,921356	1	460,914093	CPDK
126-36		744,838989	2	1487,66345	(CamC)PTCLETATPHCR
126-36		840,792358	2	1679,57019	MMGKAVPRLPASN(OxH)R
126-36		1178,12549	2	2354,23633	DPCNHSGVCAA(OxM)DAYACNNGPTK
126-36		1267,81519	2	2533,61572	AAPHMTPGQNQY(OxM)G(OxH)DHDDGAPR
126-36		897,209595	2	1792,40466	DA(OxH)MVSSG(OxH)GDA(OxM)DGCR
126-36		1447,6825	1	1446,67517	VTV(OxM)WNAAPA(OxM)PK
126-36		497,262146	2	992,509766	SECCAD(OxH)GR
126-36		1096,5968	2	2191,17896	NSCQCDVV(OxH)LKGNCHLDYK
126-36		552,292786	2	1102,57104	VYGLNTLVPK
126-36		593,361633	2	1184,70874	DMTAPSSLHVK
126-36		537,280823	1	536,27356	VPHGK
126-36		982,142395	2	1962,27026	AL(OxH)ASGGQAMACCANEPCGR

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

126-28		1033,5459	1	1032,53857	AGTAAETATLK
126-28		1071,51001	1	1070,50269	CL(OxH)VFAG(OxH)R
126-28		1093,49146	1	1092,48413	(OxM)PTEGAVASSK
126-28		1826,96472	1	1825,9574	KLPAAGLESSALNLSVTR
126-28		1830,96094	1	1829,95361	SPGAPAGNESSANSGGGGASAK
126-28		1931,96716	1	1930,95984	VGNGNDFLLLYSDGCCNK
126-29					
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-29		1126,65125	1	1125,64392	TLPNSLNLVR
126-29		1933,97571	1	1932,96838	TPSNTNPALYQALSTCPR
126-29		1949,9696	1	1948,96228	SQSNTPLALYQALSTLSR
126-29		2120,12964	1	2119,12231	FPDPDAQQ(OxM)LTQAGCPDNR
126-29		2122,90479	1	2121,89746	SSNNLGAQKFLTEAGLFVVK
126-29		2136,14746	1	2135,14014	MNNLDAKQFLTKAGLTAGSR
126-29		2152,13062	1	2151,12329	GRYLNAQQ(OxM)LTQAAVTQSR
126-30					
SpecID	m/z		z	Mass	Peptide
126-30		1101,57507	1	1100,56775	GNNPAFVVGAR

6.4 Peptiddaten der kinetischen Sekretomanalyse

Tabelle t3: Zuordnung der Spotnummer identifizierter Protein zu den Datensätzen der kinetischen Analyse (2.2.2.4)

Spotnummer (Abbildung 71)	ID in kinetischer Analyse (Abbildung 73)	Spotnummer (Abbildung 71)	ID in kinetischer Analyse (Abbildung 73)
284-349	ID11704	284-457	ID10985
284-353	ID11693	284-459	ID10952
284-354	ID11813	284-461	ID10969
284-355	ID11695	284-462	ID10949
284-359	ID11721	284-463	ID10926
284-371	ID11674	284-465	ID10986
284-378	ID11499	284-470	ID10942
284-380	ID11504	284-473	ID10933
284-382	ID11474	284-481	ID10889
284-383	ID11481	284-482	ID10892
284-384	ID11361	284-485	ID10863
284-389	ID11367	284-486	ID11061
284-389	ID11406	284-487	ID10868
284-395	ID11251	284-488	ID10895
284-396	ID11195	284-488	ID10883
284-397	ID11169	284-492	ID10794
284-399	ID11163	284-493	ID10805
284-400	ID11176	284-493	ID10785
284-401	ID11143	284-494	ID10744

284-402	ID11192	284-495	ID10766
284-405	ID11153	284-496	ID10745
284-406	ID13921	284-500	ID10833
284-407	ID11151	284-501	ID10838
284-408	ID11167	284-502	ID10827
284-412	ID11142	284-503	ID10832
284-414	ID11173	284-504	ID10866
284-415	ID11160	284-506	ID10842
284-416	ID11068	284-507	ID10870
284-417	ID11086	284-508	ID10894
284-418	ID11052	284-510	ID11025
284-423	ID11099	284-511	ID11036
284-425	ID11071	284-512	ID10858
284-425	ID11093	284-514	ID10823
284-427	ID11079	284-515	ID10825
284-428	ID11092	284-516	ID10822
284-429	ID11089	284-519	ID10804
284-431	ID11074	284-520	ID10828
284-432	ID11107	284-521	ID10760
284-433	ID11060	284-523	ID10661
284-434	ID11081	284-524	ID10706
284-436	ID11029	284-525	ID14157
284-437	ID11014	284-528	ID10729
284-439	ID11035	284-532	ID10786
284-440	ID11051	284-533	ID10809
284-441	ID11049	284-534	ID10810
284-443	ID11059	284-536	ID10731
284-444	ID11046	284-537	ID10733
284-445	ID11038	284-539	ID10705
284-446	ID11010	284-540	ID10715
284-447	ID10992	284-541	ID10726
284-449	ID11028	284-543	ID10702
284-450	ID10968	284-544	ID10628
284-452	ID10982	284-545	ID10624
284-453	ID11009	284-546	ID10640
284-454	ID10996	284-547	ID10645
284-455	ID10981	284-549	ID10675
284-456	ID10993	294-529	ID10763

Tabelle t4: Mittels BLAST und PFAM gefundene, homologe Proteine

Spot-nummer	Genlokus Jgi|PleosPC9|….	idetifiziertes Protein	Spezies	e-value	Zuordnung über eine Proteinfamilie	e-value
351	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	*P. sapidus*	0		
354	101837	Ubiquitin	*L. bicolor*	2,00E-167		
371	86240	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	1,5	Ricin-Typ β-Lectin Domäne	1,60E-11
380	88329	Carbohydrat-binde Modul Familie 13 Protein	*L. bicolor*	4,00E-31		
382	114053	Cerato-Platanin ähnliches sekretiertes Protein	*L. bicolor*	6,00E-37	Cerato-platanin	2,20E-50
383	80476	mögliches Cyclophillin	*Pleurotus sp.*	7,00E-88		
389	116196	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-103	Pectat Lyase	1,30E-62
390	52745	Peptidyl-Lysin-Metalloendopeptidase	*C. molybdites*	3,00E-121		
395	100792	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	4,00E-03	Phosphotransferase Enzymfamilie	4,50E-07
396	116143	Laccase 1	*P. ostreatus*	0		
397	156060	hypothetisches Protein	*L. bicolor*	2,00E-39	GDSL-ähnliche Lipase/Acylhydrolase	7,90E-04
399	128248	hypothetisches Protein	*L. bicolor*	3,00E-60		
400	61738	Glycosid Hydrolase Familie 12	*L. bicolor*	4,00E-71		
401	117691	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	1,00E-21		
402	90424	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	4,00E-06	Glycosid Hydrolase Familie 61	6,70E-63
403	97339	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	1,00E-61	Glycosid Hydrolase Familie 61	6,70E-63
405	108781	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	6,00E-41		
406	122311	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	7,00E-99	Glycosid Hydrolase Familie 61	6,70E-63
407	84996	Endocellulase	*P. arcularius*	4,00E-91	Glycosid Hydrolase Familie 12	4,50E-33
408	122311	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	2,00E-98	Glycosid Hydrolase Familie 61	6,70E-63

409	116143	Laccase 1	*P. ostreatus*	0		
411	128966	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	0	Rhamnogalacturonase B	1,10E-91
412	61549	Arabinosidase	*A. tabescens*	6,00E-115	Glycosid Hydrolase Familie 43	7,20E-18
413	50696	hypothetisches Protein	*U. maydis*	2,00E-03		
414	110973	hypothetisches Protein	*L. bicolor*	1,00E-03		
415	116926	Kohlenhydrat Esterase Familie 8 Protein	*L. bicolor*	3,00E-113	Pektinesterase	6,00E-04
416	46813	Thaumatin ähnliches Protein	*L. bicolor*	3,00E-119	Thaumatin Familie	6,10E-59
417	67014	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-96	Pectat Lyase	2,20E-37
418	67014	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-96	Pectat Lyase	2,20E-37
420	156060	hypothetisches Protein	*L. bicolor*	2,00E-39	GDSL-ähnliche Lipase/Acylhydrolase	7,90E-04
421	76980	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	3,00E-46		
423	64582	Endoglucanase	*V. volvacea*	5,00E-149	Glycosid Hydrolase Familie 5	1,20E-43
425	83989	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-104	Pectat Lyase	6,60E-35
427	50696	hypothetisches Protein	*U. maydis*	2,00E-03		
429	83989	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-104	Pectat Lyase	6,60E-35
432	71759	Peptidase 1	*P. ostreatus*	0	Subtilase Familie (S8)	8,60E-42
433	83989	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	4,00E-108	Pectat Lyase	2,90E-39
434	83989	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	4,00E-108	Pectat Lyase	2,90E-39
436	82945	Glycosid Hydrolase Familie 16 Protein	*L. bicolor*	2,00E-107		
439	56431	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	8,00E-77	Glycosid Hydrolase Familie 61	4,20E-52
440	87575	Peptidase 1	*P. ostreatus*	1,00E-130	Subtilase Familie (S8)	8,60E-42
441	87575	Peptidase 1	*P. ostreatus*	1,00E-130	Subtilase Familie (S8)	8,60E-42

443	45547	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-96	Glycosid Hydrolase Familie 43	7,30E-18
444	88371	Aminopeptidase	*A. bisporus*	1,00E-144	Peptidase Familie M28	1,90E-29
445	116196	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-103	Pectat Lyase	1,30E-62
446	83989	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-104	Pectat Lyase	6,60E-38
450	116926	Kohlenhydrat Esterase Familie 8 Protein	*L. bicolor*	3,00E-113	Pektinesterase	9,60E-36
451	77872	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	3,00E-56		
452-456	45206	Cellobiohydrolase II-I	*V. volvacea*	0	Glycosid Hydrolase Familie 6	8,60E-117
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	4,00E-15
457	78619	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	2,00E-16		
458	83989	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	5,00E-100	Pectat Lyase	5,60E-36
459	126566	Cellobiohydrolase II-I	*V. volvacea*	0	Glycosid Hydrolase Familie 6	8,60E-117
	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	*P. sapidus*	0		
461-462	89918	Endo-1,6-α-Mannosidase	*L. bicolor*	2,00E-128		
463	91073	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	0		
464	116896	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-124		
465	116196	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-103	Pectat Lyase	1,30E-62
466	116196	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-104	Pectat Lyase	6,60E-35
467	58117	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-148	Rhamnogalacturonase B	1,10E-91
468-469	89740	Xylanase	*P. ostreatus*	4,00E-122	Glycosid Hydrolase Familie 11	1,70E-79
471	116926	Kohlenhydrat Esterase Familie 8 Protein	*L. bicolor*	3,00E-113	Pektinesterase	9,60E-36
472	778722	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	3,00E-56		
473	130231	Cellobiohydrolase	*A. bisporus*	5,00E-94	Glycosid Hydrolase Familie 6	

476-477	115140	Aspartyl Peptidase	*L. bicolor*	1,00E -114		
478	115581	Glycosid Hydrolase Familie 72 Protein	*L. bicolor*	0	Glycosid Hydrolase Familie 72	
481	125269	Endoglucanase	*P. chrysosporium*	1,00E -146	Glycosid Hydrolase Familie 5	4,40E -50
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,70E -14
482	60171	hypothetisches Protein	*L. bicolor*	0		
484	82044	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	2,00E -47	Pectat Lyase	1,10E -03
485	64582	Endoglucanase	*V. volvacea*	5,00E -149	Glycosid Hydrolase Familie 5	1,20E -43
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,80E -10
486-487	116971	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	6,00E -135	FAD Binde-Domäne	7,70E -26
488	126936	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	6,00E -111	pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,10E -11
489	117351	Acetyl-Xylan Esterase	*V. volvacea*	1,00E -124	Esterase PHB Depolymerase	2,60E -27
489					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,90E -14
490	100231	Cellobiohydrolase	*S. commune*	0		
491-493	45206	Cellobiohydrolase II-I	*V. volvacea*	0	Glycosid Hydrolase Familie 6	8,60E -117
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,10E -11
494	51443	Mannanase (CEL4b)	*A. bisporus*	2,00E -146		
495	83972	hypothetisches Protein	*L. bicolor*	0		
496	82770	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	3,00E -71	Histidin Saure Phosphatase Superfamilie	1,00E -04
500-502	117351	Acetyl-Xylan Esterase	*V. volvacea*	1,00E -124		
503	113478	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	1,00E -122	Aldose Epimerase	1,00E -42
504	54867	Galactan 1,3-β-galactosidase	*P. chrysosporium*	0	Glycosid Hydrolase Familie 46	2,70E -18
					Kohlenhydrat Bind-Domäne	3,20E -05
506	113478	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	1,00E	Aldose Epimerase	1,00E

				-122		-42
507	54867	Galactan 1,3-beta-galactosidase	*P. chrysosporium*	0	Glycosid Hydrolase Familie 46	2,70E-18
					Kohlenhydrat Bind-Domäne	3,20E-05
508	88922	hypothetisches Protein	*L. bicolor*	2,00E-120		
510-511	83969	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	4,00E-108	Pectat Lyase	2,90E-39
512	58117	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	2,00E-148	Rhamnogalacturonase B	1,10E-91
514	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	*P. sapidus*	0		
515	85079	Glycosid Hydrolase Familie 5 Protein	*L. bicolor*	5,00E-68		
516	89439	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	5,00E-35	Peptidase Familie M28	1,60E-22
517	62103	Cellobiose Dehydrogenase	*G. frondosa*	0		
518-520	128966	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	0	Rhamnogalacturonase B	3,10E-80
521	89214	Kupfer Radikal Oxidase	*P. chrysosporium*	2,00E-157	Glyoxaloxidase	1,70E-50
522	81117	Phenoloxidase 2	*P. ostreatus*	0		
523	47295	Cellulose 1,4-β-cellobiosidase Vorläufer	*Pleurotus sp.*	0	Glycosid Hydrolase Familie 7	8,60E-117
					pilzliche Cellulose Binde-Domäne	1,10E-11
524	81117	Phenoloxidase 2	*P. ostreatus*	0		
525	114510	Arylalkohol Oxidase	*P. eryngii*	5,00E-119		
527-528	124117	Glycosid Hydrolase Familie 15 Protein	*L. bicolor*	0	Glycosid Hydrolase Familie 15	5,00E-102
					Stärke Binde-Domäne	3,00E-27
529	57949	hypothetisches Protein	*L. bicolor*	0		
533-534	110973	hypothetisches Protein	*P. placenta*	1,00E-60	Glycosid Hydrolase Familie 28	9,70E-05
536	90219	Glycosid Hydrolase Familie 27 Protein	*L. bicolor*	1,00E-140	Melibiase	6,50E-02
	116339	Carotinoidester Lipase Vorläufer	*P. sapidus*	0		
537-538	116339	Carotinoidester Lipase	*P. sapidus*	0		

		Vorläufer				
539	50696	hypothetisches Protein	*U. maydis*	2,00E-03		
540	50696	hypothetisches Protein	*U. maydis*	2,00E-03		
541-542	89668	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	7,00E-111	Acetyl-Xylan Esterase	0,044
543	94793	hypothetisches Protein	*C. cinerea*	0	α-L-Arabinofuranosidase	5,00E-11
544-545	115581	Glycosid Hydroase Familie 72 Protein	*L. bicolor*	0		
546-547	62166	Glyoxal Oxidase	*L. bicolor*	0	Glyoxaloxidase	1,60E-35
548-549	116309	Arylalkohol Oxidase Vorläufer	*P. eryngii*	0		
551	65411	hypothetisches Protein	*M. perniciosa*	3,00E-132	α-Amylase	3,00E-21
					Stärke Binde-Domäne	2,00E-25
555	114098	Exo-β-1,3-glucanase	*L. edodes*	0		
558	98024	Glycosid Hydrolase Familie 3 Protein	*L. bicolor*	0		
559	116143	Laccase 2	*P. sapidus*	0		

Tabelle t5: Auflistung der Peptiddaten der Protagen AG, -LIFT identifiziert

Spotname	Peptide	Spotname	Peptide
284-347	EGIPPDQQR	284-465	IAAGQTFTPSQPYTR
284-347	ESTLHLVLR	284-466	KPLYSTDEGFAVARG
284-348	ENTYIGTETGYGR	284-467	FYSSIPFIR
284-348	IQPGVYLIR	284-467	NSANQYWVSGSGGSFTR
284-348	NFANMEVYLQPGAPPSR	284-467	TSTITHYYIVR
284-349	ENTYIGTETGYGR	284-468	GTVTCNGATYTILQTTR
284-349	IQPGVYLIR	284-468	GWNPGNSNR
284-351	LAAFQGDAVFQAPR	284-468	VNQPSIDGTQTFQQFWSVR
284-353	IQPGVYLIR	284-468	GTVTCNGATYTILQTTR
284-354	EGIPPDQQR	284-468	GWNPGNSNR
284-354	ESTLHLVLR	284-468	VNQPSIDGTQTFQQFWSVR
284-355	TGGNASNFEITPEPLLVETHGK	284-469	GWNPGNSNR
284-359	ENTYIGTETGYGR	284-469	VNQPSIDGTQTFQQFWSVR
284-359	IQPGVYLIR	284-470	FYSSIPFIR
284-371	ADEQDQVLQAVSYGPDVVVDDLDQSR	284-470	NSANQYWVSGSGGSFTR
284-371	RQIWLFETVN	284-470	WTASSSQIGAR
284-380	SIIGYENHNGDNQK	284-471	NSFGQGSQAIAISNYGSR
284-380	VNSGSTYIFVNEK	284-471	TSPPSGAIVVR
284-382	AMNTLTNGQAVQLGR	284-472	TAFPISGGFYSIR
284-382	INVLAVDHTDAGFNIALK	284-473	ALLVAEVPTFLWIDR

284-383	ELATGQNGFGYAGSGFHR
284-383	FADENFQLK
284-384	TLPNSINLVR
284-389	ENTYIGTETGYGR
284-389	IQPGVYLIR
284-389	IAAGQTFTPSQPYTR
284-390	GGTLIHESSHFTR
284-390	NGGTDDHVYGQTGAQSLAR
284-390	YTTWFGTFVTSR
284-395	ADATLTLNGITR
284-395	FNNLNWIVFR
284-396	AAIGPTGNMYIVNEDVSPDGFAR
284-397	EGIYAGLNTLHTR
284-397	NIIVVDNYGR
284-399	GNPNAFVVGAR
284-399	WDFTSQGATK
284-400	FLTSSQGVSSSQYLK
284-400	SYSNIQQNQNAGK
284-400	TTWTWTGGSGVK
284-401	DPNFAADGGLLYIIMVHR
284-402	TGWQPYNDPSSQSSIER
284-402	TIGGQTFTGWQPYNDPSSQSSIER
284-402	VPGPPVWNGQ
284-403	ITENHWSNGPIQDVTSKAFR
284-405	AFVMTENESTAR
284-405	GIDIIPDQGATDLISGDWFYVR
284-405	LAGANANLLADIKR
284-405	PFYAYFSQVSTDVTWR
284-406	HSVVIPSSLPGGEYLLR
284-407	GGIQPVGSQIQSNVNVAGHTWNLWR
284-407	SAPTTWNWHYETQSSGIR
284-408	HSVVIPSSLPGGEYLLR
284-409	NDVVSPDGFER
284-411	GGTAIEGSDVYTVNGQTR
284-411	LNSNTLPNGYPQSSIR
284-412	GPAYTPPTGLIR
284-412	TLPGGLNGFVR
284-412	YIYSDSADLYNWSAYR
284-412	TPYAYSYHGASWR
284-413	AYSYHGASWR
284-413	FIDSHQLYPNIR
284-413	FLAAEVAASWCEFVEAR
284-414	FTYVDRPDTK
284-414	GSDTSNPDSWVEYLPDGTQR
284-414	GSVNYDQNDR
284-414	LIAIGNNEYR
284-414	VPATIAQDQLR
284-415	AGTTTSGEFSTINAALASLPNDSSAR
284-415	NSFGQGSQAIAISNYGSR
284-415	SIFIFPGTYSGQVTSITR
284-416	DFYDVSLVDGYNLPMR
284-416	GPFDASGFPVGCR
284-416	TGTGVPPASVAEWTLQGDGNR
284-417	FGTGHLFNNVFDNNNDGINTR
284-417	VIDVSNVIIR
284-417	VLAPGDNVAVQASSQVWLDHLDLSSDR
284-418	FGTGHLFNNVFDNNNDGINTR
284-418	VGGNTSVLGNGAVLNGIGLR
284-418	VIDVSNVIIR
284-418	VLAPGDNVAVQASSQVWLDHLDLSSDR
284-473	ASSGELDISQAGLAR
284-473	GLPAHFIVDQGR
284-473	GVATNVSNYNGLGTSTNYGYDELDYVR
284-473	IAAVTSIGGYLQDAR
284-473	QVVNIEVYNLPDR
284-476	AAADLPVVNQR
284-476	GVPGVQLEESGGVFTLGGR
284-477	AAADLPVVNQR
284-477	GVPGVQLEESGGVFTLGGR
284-478	DLPFLQQLGVNTVR
284-478	SSSALVGYAAINGASTWR
284-478	VSPSWSTNILDQYIR
284-478	YLYQDDGTR
284-481	QSSSPFVILDVHNYAR
284-481	YDATVQTALR
284-482	ADLQTFLNQLLPASR
284-482	AYPDLSAQANR
284-482	GSTILFSSGDSGVGGGDCR
284-482	IGIAGYLEEFGNR
284-482	SGGGFSNTFAR
284-482	STSYGENEQTIPLDYR
284-484	IVVFAVGGVINIDSR
284-484	LLAFPGAEGFGAQATGGR
284-484	TGSVYVVTNLNDSGAGSFR
284-484	TLYIDNQTR
284-485	GAFAIIEPHNYAR
284-485	LFGVNQSGAEFGETK
284-486	SFISLVLASPSDATAGQR
284-487	SFISLVLASPSDATAGQR
284-488	VVQNIAASTSTNSADWHLGVLR
284-489	QWTNVFGVSETPTSTQTNNPLNGYTR
284-489	SGYPGFTGTRPK
284-489	TGQQWGDQVR
284-489	YAIANYGVDASR
284-490	FVTTGANTNVGSR
284-490	SVVLDSNWR
284-491	DYVDQIVAQIAQYPQVR
284-491	FLAHFIVDQGR
284-491	NQLVQIVVYDLPDR
284-491	VPTLGTYLADALSIQQSTGR
284-492	DYVDQIVAQIAQYPQVR
284-492	FLAHFIVDQGR
284-492	NQLVQIVVYDLPDR
284-492	VPTLGTYLADALSIQQSTGR
284-493	DYVDQIVAQIAQYPQVR
284-493	FLAHFIVDQGR
284-493	NQLVQIVVYDLPDR
284-493	VPTLGTYLADALSIQQSTGR
284-494	NYVKTFVSR
284-494	YVNEPTILGWELANEPR
284-495	VNPAFNIYR
284-496	GVFSDTSASGIGNIAIR
284-496	PDDREATVSLTFR
284-496	TILPSIFTDLK
284-496	TSAFYNSPEFLAKA
284-500	SGFPGFTGTRPK
284-500	TGQQWGDQVR
284-500	YAIANYGVDASR
284-501	SGFPGFTGTRPK
284-501	TGQQWGDQVR

284-420	EGIYAGLNTLHTR
284-420	NIIVVDNYGR
284-421	FDINHFPGR
284-423	GAFAIIEPHNYAR
284-425	FGHGHIFNNVFDNNNDGINTR
284-425	NAVLNGVGLR
284-425	VIDVNNVIIR
284-427	AVIPIQVPTDILKPTLSSLR
284-427	AYSYHGASWR
284-427	FIDSHQLYPNIR
284-427	TPYAYSYHGASWR
284-429	IFNNVFDNNNDGINTR
284-429	NAVLNGVGLR
284-429	VIDVSNVIIR
284-431	FTYVDRPDTK
284-431	GSDTSNPDSWVEYLPDGTQR
284-431	GSVNYDQNDR
284-431	LIAIGNNEYR
284-431	LNSISITDASGNQVRPVK
284-431	VPATIAQDQLR
284-432	VLTDGGTGSVADIVSGLNFVLSTAR
284-432	VTQTNAPWGLSR
284-433	FGHGHLFNNVFENNNDGINTR
284-433	ITVTYANNYFSNINSR
284-433	KPLYSTTGGLAVAR
284-433	VGPNTTIVGR
284-433	VLDVSNVIIR
284-434	FGHGHLFNNVFENNNDGINTR
284-434	ITVTYANNYFSNINSR
284-434	KPLYSTTGGLAVAR
284-434	VGPNTTIVGR
284-434	VLDVSNVIIR
284-436	GYGPQFNANGGGWYAIER
284-436	SDHTTVLTPGGPGR
284-436	VWFWTNSDLVPNDVR
284-437	FGTGHIFNNVFDNNNDGINTR
284-437	IFNNVFDNNNDGINTR
284-437	VIDVSNVIIR
284-438	FGDLYYFGAR
284-438	IGESLFVNNGWQLSEIR
284-438	LSEVDGTTFVYDFTSR
284-439	AEIAALHEANVAYTANPIR
284-439	HTTVYGLWVNGAFQGDGR
284-439	SVTIPDIPAGDYLLR
284-439	TVPVQQGDLVTFEWYHDTR
284-440	APSAITVGASNIADAR
284-440	QDSDVVTQTDAPWGLAR
284-440	WGATFGSYK
284-441	APSAITVGASNIADAR
284-441	QDSDVVTQTDAPWGLAR
284-443	LSSSTGKPSSTSVTALAQR
284-443	PSSTSVTALAQR
284-443	WFVFSTAPGLEIR
284-444	APGADDDGTGTVNLIEALR
284-444	SSTGADASTWILNTVR
284-444	FGHGHIFNNVFDNNNDGINTR
284-444	IFNNVFDNNNDGINTR
284-444	NAVLNGVGLR
284-444	VIDVNNVIIR
284-444	IAAGQTFTPSQPYTR
284-501	YAIANYGVDASR
284-502	QWTNVFGVSETPTSTQTNNPLNGYTR
284-502	SGFPGFTGTRPK
284-502	TGQQWGDQVR
284-502	YAIANYGVDASR
284-503	VDISTNQPATQVYTSFWLDTPR
284-504	FFTANSLSGTWSSQADIGPQAVR
284-504	SLSGTWSSQADIGPQAVR
284-504	SPCGPFTFR
284-504	WRPSLLGSSR
284-506	DVILGYDDNSQLLTDPAHPVFNPIVGR
284-506	VDISTNQPATQVYTSFWLDTPR
284-507	SLSGTWSSQADIGPQAVR
284-507	SPCGPFTFR
284-507	SSFKPLGAESR
284-507	WRPSLLGSSR
284-508	IQGSIAQPQGSGPR
284-510	FGHGHLFNNVFENNNDGINTR
284-510	ITVTYANNYFSNINSR
284-510	KPLYSTTGGLAVAR
284-510	VLDVSNVIIR
284-511	FGHGHLFNNVFENNNDGINTR
284-511	ITVTYANNYFSNINSR
284-511	KPLYSTTGGLAVAR
284-511	VLDVSNVIIR
284-512	FYSSIPFIR
284-512	NSANQYWVSGSGGSFTR
284-512	TSTITHYYIVR
284-512	WTASSSQIGAR
284-514	ADGVFLTDNPQR
284-514	DAGVGNLGLQDQR
284-514	FLGIPYAQPPTGDR
284-514	LAAFQGDAVFQAPR
284-514	LPEPIPPYTGTVR
284-515	HFGNFVKPGSQR
284-515	SGNNWVLSLR
284-515	TSASEDFATVAGATR
284-515	TVGILADESSSLGNAR
284-516	ATGGYEVVYR
284-516	SGDHVPFLQR
284-516	VYVISGHYDSR
284-517	ARPNFTYR
284-517	DYTFVNSIIR
284-517	IGIDVALRPR
284-517	VILSGGSFGSPR
284-518	GGTAIEGSDVYTVNGQTR
284-518	LNSNTLPNGYPQSSIR
284-519	GGTAIEGSDVYTVNGQTR
284-519	LNSNTLPNGYPQSSIR
284-519	SQIASGIGASCSWTR
284-520	LNSNTLPNGYPQSSIR
284-521	AAWSAEIDLPSR
284-521	FSSDGIPASTIPR
284-521	IFVELVLLPDGR
284-522	ANPNLGSTGFAGGINSAILR
284-522	SAGSTTYNFDTPAR
284-523	AVTLDSNWR
284-523	YAGVCNKNGCDFNSYR
284-524	SAGSTTYNFDTPAR
284-525	AGDFAALDIDDDDALHAFLR

284-444	SLAGINTNYGDTATIR
284-445	AATNAFPTPPTTVHLSSPMR
284-445	GSGACGDQDEGGDADAVFLLEEGATISR
284-445	IAAGQTFTPSQPYTR
284-445	SLAGINTNYGDTATIR
284-446	FGTGHIFNNVFDNNNDEINT
284-446	KPLYSTDEGFAVARG
284-447	FTYVDRPDTK
284-447	GSVNYDQNDR
284-447	LIAIGNNEYR
284-447	LNSISITDASGNQVRPVK
284-447	VDNYDSAPLSGVSR
284-447	VPATIAQDQLR
284-448	FTYVDRPDTK
284-448	GSVNYDQNDR
284-448	LNSISITDASGNQVRPVK
284-448	VPATIAQDQLR
284-449	FTYVDRPDTK
284-449	GSDTSNPDSWVEYLPDGTQR
284-449	GSVNYDQNDR
284-449	LIAIGNNEYR
284-449	LNSISITDASGNQVRPVK
284-449	VDNYDSAPLSGVSR
284-449	VPATIAQDQLR
284-450	AGTTTSGEFSTINAALASLPNDSSAR
284-450	IILAPNAASNTAGNVYLGRPWGAFAK
284-450	NSFGQGSQAIAISNYGSR
284-450	SIFIFPGTYSGQVTSITR
284-451	TAFPISGGFYSIR
284-452	DYVDQIVAQIAQYPQVR
284-452	FLAHFIVDQGR
284-453	FLAHFIVDQGR
284-454	GAFAIIEPHNYAR
284-455	DYVDQIVAQIAQYPQVR
284-455	FLAHFIVDQGR
284-455	NQLVQIVVYDLPDR
284-455	VPTLGTYLADALSIQQSTGR
284-456	AIIEPHNYAR
284-456	GAFAIIEPHNYAR
284-456	KLFGVNQSGAEFGETK
284-456	LQAATAWLQQHGFK
284-457	SIEYVEAIGPDAAHR
284-457	SLGAEPVLVTSLTR
284-458	KPIFSTDDGFAVQR
284-459	GLATNVANFNALR
284-459	ADGVFLTDNPQR
284-459	ANSVTLDSATFTGTTSGR
284-459	DAGVGNLGLQDQR
284-459	FLGIPYAQPPTGDR
284-459	FRLPEPIPPYTGTVR
284-459	LPEPIPPYTGTVR
284-461	FSNTRPLNER
284-461	IAGSTINQAR
284-461	VIANLNTAFR
284-462	FSNTRPLNER
284-462	IAGSTINQAR
284-462	NLALDTVNAHDCSR
284-462	QDFGVPLSWR
284-462	QDFGVPLSWRK
284-525	FFSSTPWNGYVLGR
284-525	FTAVEFVESVNR
284-527	SIYTVNSGIPANQAVATGR
284-527	VAQFTPSSGGLAEQYDR
284-528	SIYTVNSGIPANQAVATGR
284-528	VAQFTPSSGGLAEQYDR
284-529	ATGGLGVVLEHR
284-529	NWNPAIGSTR
284-529	YYGESIPVPDFSTDNLR
284-532	GWQLDQIR
284-532	THSAYLVHGYR
284-532	TSFVYDYGGR
284-533	AWAGQGVGAGR
284-533	ISNTDGWNIYR
284-534	AWAGQGVGAGR
284-534	ISNTDGWNIYR
284-534	NIVYNNLHIDAR
284-536	EILAINQDPVVGASISPFR
284-536	ADGVFLTDNPQR
284-536	FLGIPYAQPPTGDR
284-536	LAAFQGDAVFQAPR
284-536	LPEPIPPYTGTVR
284-537	LAAFQGDAVFQAPR
284-538	LAAFQGDAVFQAPR
284-539	AVIPIQVPTDILKPTLSSLR
284-539	TPYAYSYHGASWR
284-540	AVIPIQVPTDILKPTLSSLR
284-540	AYSYHGASWR
284-540	FIDSHQLYPNIR
284-540	FLAAEVAASWCEFVEAR
284-540	TPYAYSYHGASWR
284-541	GALVAGAFDER
284-541	IALTIPQESGSGGSASWR
284-541	IIDALEITPAVNVDLTR
284-541	NEISQLLQR
284-541	TDTTYSNFDQTR
284-542	GALVAGAFDER
284-542	IALTIPQESGSGGSASWR
284-542	IIDALEITPAVNVDLTR
284-542	NEISQLLQR
284-542	TDTTYSNFDQTR
284-543	FPGGNNLWQTVPTR
284-543	LIAFDTGNVYR
284-543	TGTVFWGVTR
284-543	TTSGSTIVSQSVPIR
284-543	WPAFVNALR
284-544	SSSALVGYAAINGASTWR
284-544	TQYNQASGPNSPAR
284-544	YLYQDDGTR
284-545	DLPFLQQLGVNTVR
284-545	SSSALVGYAAINGASTWR
284-545	TQYNQASGPNSPAR
284-545	VSPSWSTNILDQYIR
284-545	YLYQDDGTR
284-546	AEIFYPPYFSASTR
284-546	WSNAGLSTSNIAR
284-547	AEIFYPPYFSASTRPVPSGVPK
284-547	WSNAGLSTSNIAR
284-548	DSSEFNADLDQWTNTR

284-462	VIANLNTAFR
284-462	YTNAAIQSANWMR
284-463	DAWIQADVNR
284-463	DGALENDIIVHENTHGITNR
284-463	FAGANSCTLWR
284-463	MFLWTLTSPQR
284-463	THPYSTSATVNPLR
284-463	VTISVQDAAGTNNADFATPADGQSGR
284-464	DGGSTIPFETILR
284-464	DLAGLNTQIWTYTR
284-464	NVLQNVPSGR
284-464	SPSGQQTWVNGIR
284-548	LVNSGTTNGLPAFR
284-548	TQGPIYLVGER
284-549	DNANTIFHPVGTASMSPR
284-549	DSSEFNADLDQWTNTR
284-549	IVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGER
284-549	LPTADFDYIVVGAGNAGNVVAAR
284-549	LVNSGTTNGLPAFR
284-549	TQGPIYLVGER
284-549	YAAVTGDDGWNWDNIQQFVR
284-551	AQYEEIAQR
284-551	SISISVAGGGGGFGAAGGFGGR
284-551	YEELQVTVGR
284-551	ETDGGEVWESDPNR
284-551	GWVAGSKANVFVTNHDTER
284-551	HIASGDLANILSR
284-551	LAAYANDLR
284-551	NTVGSAGITNWVSPQSQQIAFGR
284-555	GATFNNINSPVPVVR
284-555	HQGTAAFNPNPAGYQVFR
284-558	HFDQANIAPR
284-558	TQHELYALPFLR
284-559	APLTGGNPTGNPNLDVSLIR
284-559	NDVVSPDGFER

Tabelle t6: Auflistung der Peptiddaten der Protagen AG, -PMF identifiziert

Spot	Peptide	Spot	Peptide
284-348	AMLDDWNMQGTQK	284-500	PRILMSDNLVCVRVQYNTLVCNW
284-348	ENTYIGTETGYGR	284-500	QWTNVFGVSETPTSTQTNNPLNGYTR
284-348	IQPGVYLIR	284-500	SGFPGFTGTR
284-348	NFANMEVYLQPGAPPSR	284-500	SGFPGFTGTRPK
284-348	NKRENTYIGTETGYGR	284-500	TGQQWGDQVR
284-348	RENTYIGTETGYGR	284-500	VQFWHGTADTTLYPQNFQEEIK
284-349	AMLDDWNMQGTQK	284-500	YAIANYGVDASR
284-349	ENTYIGTETGYGR	284-502	QWTNVFGVSETPTSTQTNNPLNGYTR
284-349	IQPGVYLIR	284-502	SGFPGFTGTR
284-349	NFANMEVYLQPGAPPSR	284-502	SGFPGFTGTRPK
284-349	RENTYIGTETGYGR	284-502	TGQQWGDQVR
284-354	CHTTFK	284-502	VQFWHGTADTTLYPQNFQEEIK
284-354	EGIPPDQQR	284-502	YAIANYGVDASR
284-354	EGIPPDQQRLIFAGKQLEDGR	284-503	DVILGYDDNSQLLTDPAHPVFNPIVGR
284-354	ESTLHLVLR	284-503	EQQIGAR
284-354	KHLSCRQADMQIFVK	284-503	FVSFGATMTELWVK
284-354	LRRECPNCGAGIFMANHPDR	284-503	HEVSNGGVLK
284-354	QYCGKCHTTFKLSA	284-503	HVDNADEGFPGVVTAFAK
284-354	TITLEVESSDTIDNVK	284-503	NGKCHECQVTLHGGIYGWDRR
284-354	TLSDYNIQK	284-503	PFFWSSTYK
284-355	EGARDVC	284-503	REQQIGAR
284-355	SGAETATVTFEK	284-503	TSVTYKHVDNADEGFPGVVTAFAK
284-355	TGGNASNFEITPEPLLVETHGK	284-503	VDISTNQPATQVYTSFWLDTPR
284-355	VWVSNR	284-503	VDISTNQPATQVYTSFWLDTPRK
284-359	AMLDDWNMQGTQK	284-504	AHNSALFR
284-359	ENTYIGTETGYGR	284-504	DMGLFQDDDSAR
284-359	ENTYIGTETGYGRAGTK	284-504	FFTANSLSGTWSSQADIGPQAVR
284-359	IQPGVYLIR	284-504	NGVYYLFASHTSGWDPNPNK
284-359	NFANMEVYLQPGAPPSR	284-504	NNEYVMWFHSDSSNYGAAQVGVATAK
284-359	RENTYIGTETGYGR	284-504	QNDALTPVSGTMISTSNIVER

284-380 LWVPGTK
284-380 NQCWR
284-380 SIIGYENHNGDNQK
284-380 VNSGSTYIFVNEK
284-380 WAAGRNQCWRLQDA
284-380 YNMDLSDHGNPTPGTPVTLWGK
284-382 AMNTLTNGQAVQLGR
284-382 GPNGLITR
284-382 INVLAVDHTDAGFNIALK
284-382 KINVLAVDHTDAGFNIALK
284-382 LKVQTFGK
284-382 LPNFPNIGGASAVGGWNSAQCGTCWELSYNGR
284-383 ELATGQNGFGYAGSGFHR
284-383 FADENFQLK
284-383 IEGYGSQSGKPSATIK
284-383 KIEGYGSQSGKPSATIK
284-383 LFDDVVPK
284-383 VIPQFMLQGGDFTK
284-389 ADEQDQVLQAVSYGPDVVVDDLDQSR
284-389 AMLDDWNMQGTQK
284-389 ENTYIGTETGYGR
284-389 IQPGVYLIR
284-389 NFANMEVYLQPGAPPSR
284-389 NFANMEVYLQPGAPPSRR
284-389 NKRENTYIGTETGYGR
284-389 RENTYIGTETGYGR
284-389 RQIWLFETVN
284-390 ATFVGCSATR
284-390 GGTLIHESSHFTR
284-390 NGGTDDHVYGQTGAQSLAR
284-390 SNPAQAIDNADSHEYFAENNPALA
284-390 YTTWFGTFVTSR
284-405 AFVMTENESTAR
284-405 FVDTDGGVVYGNIADNAPK
284-405 FVDTDGGVVYGNIADNAPKK
284-405 GIDIIPDQGATDLISGDWFYVR
284-405 KPGWELVN
284-405 LAGANANLLADIK
284-405 LAGANANLLADIKR
284-405 PFYAYFSQVSTDVTWR
284-405 VNPQFYNHNVAVFNILNFFSDAR
284-409 AITVNGIFPGTPVILQK
284-409 GTFIVYDPNDPLK
284-409 KLDFHIR
284-409 LDFHIR
284-409 NDKVQINTINELTDPGMR
284-409 NDVVSPDGFER
284-409 NDVVSPDGFERR
284-409 STSIHWHGLFQHK
284-409 VQINTINELTDPGMR
284-409 VQINTINELTDPGMRR
284-411 GGNSNNYITITCTAGSVTQYYVAR
284-411 GGTAIEGSDVYTVNGQTR
284-411 ITGKATGFPSGFSSLMTIGWSNSAAQYWAR
284-411 LNSNTLPNGYPQSSIR
284-411 SKFYSSR
284-411 SQIASGIGASCSWTR
284-411 YTDPAIHMATYISAEPSVGELR
284-412 AVIPIQVPTDILKPTLSSLR
284-412 CNGGGAQWSHFIDSHQLYPNIR
284-412 GLYLPAK
284-504 QNDALTPVSGTMISTSNIVERPK
284-504 SGANSITFSAGQSNYAADLDK
284-504 SPCGPFTFR
284-504 SSFKPLGAESR
284-504 TAYLLYASDNNQNFK
284-504 TYFSQNTFDLPLGQNGIYMGDR
284-504 VGSTWYWHGEDK
284-504 VIFNQK
284-504 WRPSLLGSSR
284-506 DVILGYDDNSQLLTDPAHPVFNPIVGR
284-506 EQQIGAR
284-506 FVSFGATMTELWVK
284-506 FVSFGATMTELWVKDR
284-506 HEVSNGGVLK
284-506 HVDNADEGFPGVVTAFAK
284-506 NGKCHECQVTLHGGIYGWDRR
284-506 PFFWSSTYK
284-506 REQQIGAR
284-506 TSVTYKHVDNADEGFPGVVTAFAK
284-506 VDISTNQPATQVYTSFWLDTPR
284-506 VDISTNQPATQVYTSFWLDTPRK
284-507 AHNSALFR
284-507 DMGLFQDDDSAR
284-507 FFTANSLSGTWSSQADIGPQAVR
284-507 LDADYYNIAAQVNTIPGSTLEAPGIIKR
284-507 NGVYYLFASHTSGWDPNPNK
284-507 QNDALTPVSGTMISTSNIVER
284-507 QNDALTPVSGTMISTSNIVERPK
284-507 SGANSITFSAGQSNYAADLDK
284-507 SPCGPFTFR
284-507 SPCGPFTFRSSFKPLGAESR
284-507 SSFKPLGAESR
284-507 TAYLLYASDNNQNFK
284-507 TYFSQNTFDLPLGQNGIYMGDR
284-507 VGSTWYWHGEDK
284-507 VIFNQK
284-507 WRPSLLGSSR
284-508 FPVPYIYVSNR
284-508 GMEFGPASVGGEEFLVASGVAGTGGVVIYR
284-508 IIATAGSPER
284-508 IQGSIAQPQGSGPR
284-508 NLVEVAR
284-508 NSDIPTR
284-510 FGHGHLFNNVFENNNDGINTR
284-510 GGSLVGVGLR
284-510 GNDFGGGSNTAPTGSFTSAPYSYPLISTSSVVSSVR
284-510 GSLVGHSDSNASEDTK
284-510 ITVTYANNYFSNINSR
284-510 KPLYSTTGGLAVAR
284-510 LYDHYK
284-510 LYDHYKGSLVGHSDSNASEDTK
284-510 PLYSTTGGLAVAR
284-510 VGAELLVENNVWTGTNK
284-510 VGAELLVENNVWTGTNKKPLYSTTGGLAVAR
284-510 VGPNTTIVGR
284-510 VLDVSNVIIR
284-511 FGHGHLFNNVFENNNDGINTR
284-511 GGSLVGVGLR
284-511 GNDFGGGSNTAPTGSFTSAPYSYPLISTSSVVSSVR
284-511 GSLVGHSDSNASEDTK
284-511 ITVTYANNYFSNINSR

284-412 LANPGSHLYLVFNVAEYPTK
284-412 RVADVESK
284-412 RVADVESKLR
284-412 TPYAYSYHGASWR
284-413 AVIPIQVPTDILKPTLSSLR
284-413 CNGGGAQWSHFIDSHQLYPNIR
284-413 FLAAEVAASWCEFVEAR
284-413 LANPGSHLYLVFNVAEYPTK
284-413 RVADVESK
284-413 TPYAYSYHGASWR
284-417 DFYDGLLDITHGPTGVTITNSILHDHWK
284-417 FGTGHLFNNVFDNNNDGINTR
284-417 GSLVGHSDNNGAEDVAITVTYANNYFSNLNSR
284-417 VIDVSNVIIR
284-417 VLAPGDNVAVQASSQVWLDHLDLSSDR
284-418 FGTGHLFNNVFDNNNDGINTR
284-418 GSLVGHSDNNGAEDVAITVTYANNYFSNLNSR
284-418 IVIVSGTITGDAIVK
284-418 VGGNTSVLGNGAVLNGIGLR
284-418 VIDVSNVIIR
284-418 VLAPGDNVAVQASSQVWLDHLDLSSDR
284-420 EGIYAGLNTLHTR
284-420 GIYETPSGDAFK
284-420 GIYETPSGDAFKEGIYAGLNTLHTR
284-420 LASAAGATLLDFAEIGAVTDK
284-420 NIIVVDNYGR
284-420 TLLPTTSSGANDFVGQAHNYINQR
284-420 TLWDGVLGSSPGYEAFGYTSK
284-421 AAILSLMLFESGNFK
284-421 ALVLEDR
284-421 FDINHFPGR
284-421 FDINHFPGRPGQGTR
284-421 LSFASGMWFYK
284-421 QSAPFVNQGFEDYAITSK
284-423 GAFAIIEPHNYAR
284-423 GVLGEIGAGSNDVCIAAVK
284-423 ILPEALQPFL
284-423 IPFKLER
284-423 LQAATAWLQQHGFK
284-423 LSPPAGGLTSPNFDSAYLASLK
284-423 SNDHVVFDIINEPYGIPATDAFALNQAAVNAIR
284-423 YVDNVITSTSDFATWWGNVANQFK
284-425 FGHGHIFNNVFDNNNDGINTR
284-425 KPLYATDEGFAVAR
284-425 NAVLNGVGLR
284-425 NAVLNGVGLRVIDVNNVIIR
284-425 PLYATDEGFAVAR
284-425 VGSNTSVLGR
284-425 VIDVNNVIIR
284-425 VIDVNNVIIRNIK
284-427 AVIPIQVPTDILKPTLSSLR
284-427 CNGGGAQWSHFIDSHQLYPNIR
284-427 CQPASVAPACCPATVIPAPPASVLIR
284-427 FLAAEVAASWCEFVEAR
284-427 HNAVCPQGYGWVK
284-427 KHNAVCPQGYGWVK
284-427 LANPGSHLYLVFNVAEYPTK
284-427 RVADVESK
284-427 TPYAYSYHGASWR
284-427 VADVESKLRAEAQK
284-428 DIENQYETQITQIEHEVSSSGQEVQSSAK
284-511 KPLYSTTGGLAVAR
284-511 LYDHYK
284-511 VGAELLVENNVWTGTNK
284-511 VGAELLVENNVWTGTNKKPLYSTTGGLAVAR
284-511 VLDVSNVIIR
284-512 ALRMQIRSNTCIR
284-512 DQVHGVTGSGVGVFMIIPSVSYETSSGGPFFR
284-512 FYSSIPFIR
284-512 GTVSGTYSGTLSGPAVTIGFK
284-512 NSANQYWVSGSGGSFTR
284-512 PGTYTVTLFQGELEAGTGSVSVSAGR
284-512 PQITVNSFTSNAPAAPTAVDSR
284-512 SALPNGIPEAEMNGGAVVEGSDVFSINGQTRSK
284-512 SGTNTIYIGTFASQEPDVGELR
284-512 TLMKPGTYTVTLFQGELEAGTGSVSVSAGR
284-512 TSSVTLTSSLSR
284-512 TSTITHYYIVR
284-512 TTEAFAGGR
284-512 TTEAFAGGRPQITVNSFTSNAPAAPTAVDSR
284-512 WTASSSQIGAR
284-514 ADGVFLTDNPQR
284-514 ANSVTLDSATFTGTTSGR
284-514 DAGVGNLGLQDQR
284-514 DAGVGNLGLQDQREALRWIQK
284-514 EALRWIQKYISSFGGDPTK
284-514 FFLQQR
284-514 FLGIPYAQPPTGDR
284-514 FRLPEPIPPYTGTVR
284-514 LAAFQGDAVFQAPR
284-514 LPEPIPPYTGTVR
284-514 LSAFGFLASQEVK
284-514 QNTWAFLSK
284-514 RFFLQQR
284-514 RFFLQQRSGK
284-514 SIQLGEPVIYVSMNYR
284-514 YISSFGGDPTK
284-515 APETFYVAPGVYDWNK
284-515 DAQGIYFLNAAAQR
284-515 GVPSLTAFVNSAPAPMTAGK
284-515 GWSQGYDPTIK
284-515 HFGNFVK
284-515 HFGNFVKPGSQR
284-515 HFWTFK
284-515 NGNFQLYLTK
284-515 SGNNWVLSLR
284-515 TSASEDFATVAGATR
284-515 WNIGGGGVNVSNPVR
284-516 DNVNWGVR
284-516 DPFVIR
284-516 DWIASEMR
284-516 FTEPHENFNHQHQDVR
284-516 FVHEVATNDATGMSIQMIYR
284-516 IPVNTVISDVVATLR
284-516 LSIGGENDSPAR
284-516 LVSFGTR
284-516 MFAQGVPSSETPAQVSTR
284-516 MTVTVPSYVQVPANR
284-516 NPHEPFWTHVVPVGR
284-516 RIESIIQK
284-516 SGDHVPFLQR
284-516 SPATFPFPG

284-428 EIETYHNLLEGGQEDFESSGAGK
284-428 EVTQLR
284-428 FEMEQNLR
284-428 FSSSGGGGGGGR
284-428 GGSGGSYGR
284-428 HGVQELEIELQSQLSK
284-428 IKFEMEQNLR
284-428 MTLDDFR
284-428 QLRWR
284-428 SGGGGGGGLGSGGSIR
284-428 STMQELNSR
284-428 TLLDIDNTR
284-428 TLNDMR
284-428 WRQLR
284-429 ASLVGHSDSNGSEDVAITVTYANNVFSTLNSR
284-429 FGHGHIFNNVFDNNNDGINTR
284-429 IVIISGTITGNAVVK
284-429 KIVIISGTITGNAVVK
284-429 LHDHWK
284-429 NAVLNGVGLR
284-429 PLYATDEGFAVAR
284-429 VGSNTSVLGR
284-429 VIDVSNVIIR
284-429 VLASAGDAIGVQAAHQVWIDHLDLSSDR
284-433 FGHGHLFNNVFENNNDGINTR
284-433 GGSLVGVGLR
284-433 GNDFGGGSNTAPTGSFTSAPYSYPLISTSSVVSSVR
284-433 GSLVGHSDSNASEDTK
284-433 ITVTYANNYFSNINSR
284-433 KPLYSTTGGLAVAR
284-433 LYDHYK
284-433 PLYSTTGGLAVAR
284-433 SSAGATLSL
284-433 VGAELLVENNVWTGTNK
284-433 VGAELLVENNVWTGTNKKPLYSTTGGLAVAR
284-433 VGPNTTIVGR
284-433 VLDVSNVIIR
284-434 FGHGHLFNNVFENNNDGINTR
284-434 GGSLVGVGLR
284-434 GNDFGGGSNTAPTGSFTSAPYSYPLISTSSVVSSVR
284-434 GSLVGHSDSNASEDTK
284-434 GSLVGHSDSNASEDTKITVTYANNYFSNINSR
284-434 ITVTYANNYFSNINSR
284-434 KPLYSTTGGLAVAR
284-434 LYDHYK
284-434 PLYSTTGGLAVAR
284-434 VGAELLVENNVWTGTNK
284-434 VGAELLVENNVWTGTNKKPLYSTTGGLAVAR
284-434 VGPNTTIVGR
284-434 VLDVSNVIIR
284-436 GYGPQFNANGGGWYAIER
284-436 SDHTTVLTPGGPGR
284-436 SLGLATVDGEDLILR
284-436 SNKVFTTHVAVFNIK
284-436 VFTTHVAVFNIK
284-436 VNYLDQATSR
284-436 VWFWTNSDLVPNDVR
284-436 GYGPPFNANGGGWYAIER
284-436 SDHTTVLTPGGPGR
284-436 SLGLATVDGEDLILR
284-436 SNKVFTTHVAVFNIK
284-516 TDVMDFVNDSPGANDDASGVATVMELAR
284-516 VNGAGLWSLANAPGTPK
284-516 VYVISGHYDSR
284-517 ARPNFTYR
284-517 ARPNFTYRDYTFVNSIIR
284-517 DHVYGYSSFFFQGGK
284-517 DYTFVNSIIR
284-517 IGIDVALRPR
284-517 LLDPQGYR
284-517 MNFWR
284-517 PADAAQYISSQSGVFASSSPR
284-517 VILSGGSFGSPR
284-517 VLVEPWFTDPIDK
284-517 WLQGTVR
284-517 YLPQSFNVAK
284-518 AQDQSKRSQIASGIGASCSWTR
284-518 GGNSNNYITITCTAGSVTQYYVAR
284-518 GGTAIEGSDVYTVNGQTR
284-518 LNSNTLPNGYPQSSIR
284-518 SQIASGIGASCSWTR
284-518 TIGAVTVR
284-518 TLQIGTTLAFAGGR
284-518 YTDPAIHMATYISAEPSVGELR
284-519 ATGFPSGFSSLMTIGWSNSAAQYWAR
284-519 GGNSNNYITITCTAGSVTQYYVAR
284-519 GGTAIEGSDVYTVNGQTR
284-519 LNSNTLPNGYPQSSIR
284-519 SKFYSSR
284-519 SQIASGIGASCSWTR
284-519 TIGAVTVR
284-519 TLQIGTTLAFAGGR
284-519 YTDPAIHMATYISAEPSVGELR
284-520 ATGFPSGFSSLMTIGWSNSAAQYWAR
284-520 GGTAIEGSDVYTVNGQTR
284-520 LNSNTLPNGYPQSSIR
284-520 SKFYSSR
284-520 TIGAVTVR
284-520 TLQIGTTLAFAGGR
284-520 YTDPAIHMATYISAEPSVGELR
284-521 FSSDGIPASTIPR
284-521 IFVELVLLPDGR
284-521 IFVSANQQAMILDWK
284-521 IYPPGPAFVYVVTNEGVPSFGHK
284-521 LPGIPNGVR
284-521 LVLTTAGIAAGWK
284-521 LVLTTAGIAAGWKVER
284-521 MEFFSPPYMFR
284-521 MEFFSPPYMFRPR
284-521 NPLMVNGHAAWSAEIDLPSR
284-521 VLLVNGAR
284-521 VNPSTLSSQTPASDQCAR
284-521 VTAPANGR
284-521 YPTEYR
284-522 ANPNLGSTGFAGGINSAILR
284-522 GDNFQLNVVNQLSDTTMLK
284-522 SAGSTTYNFDTPAR
284-522 SAGSTTYNFDTPARR
284-522 SVPATGPAPATVSIPGVLVQGNK
284-522 YAGGPTSPLAIINVESTK
284-522 YAGGPTSPLAIINVESTKR
284-522 YSFVLTADQTVGNYWIR

284-436 VFTTHVAVFNIK
284-436 VNYLDQATSR
284-436 VWFWTNSDLVPNDVR
284-439 AEIAALHEANVAYTANPIR
284-439 GPVQVYIAPTSSNGAGPVWTK
284-439 GVQMYMSCSQIR
284-439 SPPNNNPVK
284-439 VVPNTVPVQQGDLVTFEWYHDTR
284-440 APSAITVGASNIADAR
284-440 ASFSNYGAVVDVFAPGQDVISSWIGSDDATNK
284-440 DADGHGHGTHCAGTVAGSTYGVAK
284-440 DALTGIPSGTANR
284-440 STPLDNAVATLTAGGVHVVIAAGNSNTDAANTSPAR
284-440 VLSDGGSGSVADIVSGLNYVLDSYQASGR
284-440 WGATFGSYK
284-441 APSAITVGASNIADAR
284-441 DADGHGHGTHCAGTVAGSTYGVAK
284-441 DALTGIPSGTANR
284-441 STPLDNAVATLTAGGVHVVIAAGNSNTDAANTSPAR
284-441 TPAEIEALVVELSSK
284-441 WGATFGSYK
284-445 AATNAFPTPPTTVHLSSPMR
284-445 GSGACGDQDEGGDADAVFLLEEGATISR
284-445 IAAGQTFTPSQPYTR
284-445 SCGNCKTQYKR
284-445 SLAGINTNYGDTATIR
284-445 TGSGPDGTYCK
284-445 TTQVHSVSSICDR
284-448 FALDGQR
284-448 FNWVDSNPAIFGDLK
284-448 FTYVDRPDTK
284-448 GIGRSDCLLGTADHTGTITIK
284-448 GSDTSNPDSWVEYLPDGTQR
284-448 GSVNYDQNDR
284-448 LIAIGNNEYR
284-448 LNSISITDASGNQVR
284-448 LNSISITDASGNQVRPVK
284-448 LSTVTSSINNAVVHTHVDNYDSAPLSGVSR
284-448 PIKGSGLR
284-448 RWDEGLGDAAASSALSGFASAAK
284-448 VGLCYIYQVWK
284-448 VPATIAQDQLR
284-450 AGLYACGFYGFQDTLYSNQGTQVYLK
284-450 AGTTTSGEFSTINAALASLPNDSSAR
284-450 EADNAAIYVLNANK
284-450 IILAPNAASNTAGNVYLGR
284-450 IILAPNAASNTAGNVYLGRPWGAFAK
284-450 LGQAYFGGNTIAVSSK
284-450 NSFGQGSQAIAISNYGSR
284-450 PWGAFAK
284-450 SIFIFPGTYSGQVTSITR
284-450 VIYTNNVVTLPLNPAIWSVWNTGDER
284-454 GAFAIIEPHNYAR
284-454 ILPEALQPFL
284-454 IPFKLER
284-454 LFGVNQSGAEFGETK
284-454 LQAATAWLQQHGFK
284-454 LSPPAGGLTSPNFDSAYLASLK
284-454 SNDHVVFDIINEPYGIPATDAFALNQAAVNAIR
284-454 YVDNVITSTSDFATWWGNVANQFK
284-456 GAFAIIEPHNYAR
284-527 AGLLANIGPSGAK
284-527 ALANLFVYVNAFR
284-527 EGKTPVSWGASGLTVPTTCER
284-527 FNGAVTWESDPNR
284-527 FNIDLTAFTGAWGR
284-527 KFNGAVTWESDPNR
284-527 NDGHPLSAVDLTWSYASALTAFAAR
284-527 SIYTVNSGIPANQAVATGR
284-527 SQGAQAGVVIASPSATDPPYLFTWTR
284-527 SQTILQQVSNPSGTVSSGGLGEPK
284-527 TFADGFVAK
284-527 TPVSWGASGLTVPTTCER
284-527 VAQFTPSSGGLAEQYDR
284-527 VINTPAPGSFIENDTWR
284-528 AGLLANIGPSGAK
284-528 ALANLFVYVNAFR
284-528 DSNTVLTSIHTFDAEAGCDAATFQPCSDK
284-528 EGKTPVSWGASGLTVPTTCER
284-528 FNGAVTWESDPNR
284-528 FNIDLTAFTGAWGR
284-528 KFNGAVTWESDPNR
284-528 NDGHPLSAVDLTWSYASALTAFAAR
284-528 PHIDNYVR
284-528 SIYTVNSGIPANQAVATGR
284-528 SQGAQAGVVIASPSATDPPYLFTWTR
284-528 SQTILQQVSNPSGTVSSGGLGEPK
284-528 TFADGFVAK
284-528 TPVSWGASGLTVPTTCER
284-528 VAQFTPSSGGLAEQYDR
284-528 VINTPAPGSFIENDTWR
284-529 ATGGLGVVLEHR
284-529 FLSNEQAAADSANFMANVK
284-529 LAIIDGEVDPWRPDTPHSEDAK
284-529 LAIIDGEVDPWRPDTPHSEDAKPR
284-529 NWNPAIGSTR
284-529 STVEECFGTFDDSQYQAIGLDQDWR
284-529 YIKDNVASR
284-529 YWVNSR
284-529 YYGESIPVPDFSTDNLR
284-536 ADGVFLTDNPQR
284-536 ANSVTLDSATFTGTTSGR
284-536 DAGVGNLGLQDQR
284-536 EALRWIQKYISSFGGDPTK
284-536 FFLQQR
284-536 FLGIPYAQPPTGDR
284-536 FRLPEPIPPYTGTVR
284-536 LAAFQGDAVFQAPR
284-536 LPEPIPPYTGTVR
284-536 LSAFGFLASQEVK
284-536 QNTWAFLSK
284-536 SIQLGEPVIYVSMNYR
284-536 TPFIFDYQSLALARIPR
284-536 YISSFGGDPTK
284-536 YTTSSPNLVTFNDNLLFPVTITQDTFR
284-537 ADGVFLTDNPQR
284-537 ANSVTLDSATFTGTTSGR
284-537 ATAFGPACPQQSAR
284-537 FFLQQR
284-537 FLGIPYAQPPTGDR
284-537 FRLPEPIPPYTGTVR
284-537 LAAFQGDAVFQAPR

284-456 GVLGEIGAGSNDVCIAAVK
284-456 ILPEALQPFL
284-456 IPFKLER
284-456 LERLSPPAGGLTSPNFDSAYLASLKSTVSYITGK
284-456 LFGVNQSGAEFGETK
284-456 LQAATAWLQQHGFK
284-456 LSPPAGGLTSPNFDSAYLASLK
284-456 SNDHVVFDIINEPYGIPATDAFALNQAAVNAIR
284-456 STVSYITGK
284-456 YVDNVITSTSDFATWWGNVANQFK
284-459 ADGVFLTDNPQR
284-459 ANSVTLDSATFTGTTSGR
284-459 ATAFGPACPQQSAR
284-459 AVFPDNEDCLSINVVVPTSATPTSK
284-459 DAGVGNLGLQDQR
284-459 EALRWIQKYISSFGGDPTK
284-459 FLGIPYAQPPTGDR
284-459 FLGIPYAQPPTGDRR
284-459 FRLPEPIPPYTGTVR
284-459 LPEPIPPYTGTVR
284-459 LSAFGFLASQEVK
284-459 SIQLGEPVIYVSMNYR
284-459 SVPYATLK
284-459 YISSFGGDPTK
284-461 CSSVITPAQASAGR
284-461 FSNTRPLNER
284-461 GAPWQGSNGVITEGSSPNSNNDGVGFK
284-461 GLHEAFER
284-461 IAGSTINQAR
284-461 NLALDTVNAHDCSR
284-461 SMAGGVFWR
284-461 SPDSWIFTYNSGK
284-461 VIANLNTAFR
284-461 WWATAAVYAHR
284-461 YTNAAIQSANWMR
284-462 CSSVITPAQASAGR
284-462 FSNTRPLNER
284-462 GAPWQGSNGVITEGSSPNSNNDGVGFK
284-462 GLHEAFER
284-462 IAGSTINQAR
284-462 KFSNTRPLNER
284-462 MTYDPHQINTPGEYIWTSTVPLLTMYSK
284-462 NLALDTVNAHDCSR
284-462 SFTLAGTCDGK
284-462 SMAGGVFWR
284-462 SPDSWIFTYNSGK
284-462 VIANLNTAFR
284-462 VIANLNTAFRLNANYDK
284-462 YTNAAIQSANWMR
284-463 DAWIQADVNR
284-463 DGALENDIIVHENTHGITNR
284-463 FAGANSCTLWR
284-463 GLGVGAANHR
284-463 THPYSTSATVNPLR
284-463 TNAFYIVNSVHDIAYK
284-463 VTISVQDAAGTNNADFATPADGQSGR
284-464 ATYANLANGLQAAVSLVGK
284-464 DGGSTIPFETILR
284-464 DLAGLNTQIWTYTR
284-464 IRIWTSTSNSQYSLNYGLALAK
284-464 IWTSTSNSQYSLNYGLALAK
284-537 LPEPIPPYTGTVR
284-537 LSAFGFLASQEVK
284-537 QNTWAFLSK
284-537 RFFLQQR
284-537 SIQLGEPVIYVSMNYR
284-537 VTIWGESAGAISVALHMVANNGNHEGLFR
284-537 YTTSSPNLVTFNDNLLFPVTITQDTFR
284-538 ADGVFLTDNPQR
284-538 ANSVTLDSATFTGTTSGR
284-538 FFLQQR
284-538 FLGIPYAQPPTGDR
284-538 FLGIPYAQPPTGDRR
284-538 FRLPEPIPPYTGTVR
284-538 LAAFQGDAVFQAPR
284-538 LAAFQGDAVFQAPRR
284-538 LPEPIPPYTGTVR
284-538 LSAFGFLASQEVK
284-538 QNTWAFLSK
284-538 QNTWAFLSKR
284-538 RFFLQQR
284-538 RLAAFQGDAVFQAPR
284-538 SIQLGEPVIYVSMNYR
284-538 SVPYATLK
284-538 YISSFGGDPTK
284-539 AEAQKASSVSK
284-539 AVIPIQVPTDILKPTLSSLR
284-539 CNGGGAQWSHFIDSHQLYPNIR
284-539 FLAAEVAASWCEFVEAR
284-539 GLYLPAK
284-539 LANPGSHLYLVFNVAEYPTK
284-539 RVADVESK
284-539 TPYAYSYHGASWR
284-540 AEAQKASSVSK
284-540 AVIPIQVPTDILKPTLSSLR
284-540 CNGGGAQWSHFIDSHQLYPNIR
284-540 FLAAEVAASWCEFVEAR
284-540 KAQDEADRK
284-540 LANPGSHLYLVFNVAEYPTK
284-540 RVADVESK
284-540 TPYAYSYHGASWR
284-541 AQWTCQR
284-541 GALVAGAFDER
284-541 IALTIPQESGSGGSASWR
284-541 IGVTGCSR
284-541 IIDALEITPAVNVDLTR
284-541 NEISQLLQR
284-541 SISFAVK
284-541 TDTTYSNFDQTR
284-541 YELGTMPPKPQSVTASFSGGTLTINVSDQGK
284-542 AQWTCQR
284-542 GALVAGAFDER
284-542 IALTIPQESGSGGSASWR
284-542 IGVTGCSR
284-542 IGVTGCSRNGK
284-542 IIDALEITPAVNVDLTR
284-542 NEISQLLQR
284-542 TDTTYSNFDQTR
284-542 YELGTMPPKPQSVTASFSGGTLTINVSDQGK
284-543 AALGRAQPFK
284-543 ANGMRDDIATALAEMK
284-543 FPGGNNLWQTVPTR

284-464 NHGANIAR
284-464 NVLQNVPSGR
284-464 SPSGQQTWVNGIR
284-464 YKDGGSTIPFETILR
284-467 DINNQGSAQQELYWYMNSNHEQTESYR
284-467 DQVHGVTGSGVGVFMIIPSVSYETSSGGPFFR
284-467 FTQLSSGLGSATVTHSVANNIAIVTIK
284-467 FYSSIPFIR
284-467 GTVSGTYSGTLSGPAVTIGFK
284-467 IEHMHPSDSR
284-467 NADKIEHMHPSDSR
284-467 NSANQYWVSGSGGSFTR
284-467 PGTYTVTLFQGELEAGTGSVSVSAGR
284-467 SGTNTIYIGTFASQEPDVGELR
284-467 TSSVTLTSSLSR
284-467 TSSVTLTSSLSRPSTIWSIGTVDGTPAGFK
284-467 TSTITHYYIVR
284-469 AISYTGTYTPNGNSYLSVYGWTR
284-469 GTVTCNGATYTILQTTR
284-469 GWNPGNSNR
284-469 SPLIEYYVVESYGSYNPSSAASQK
284-469 VNQPSIDGTQTFQQFWSVR
284-470 ALRMQIRSNTCIR
284-470 DQVHGVTGSGVGVFMIIPSVSYETSSGGPFFR
284-470 FYSSIPFIR
284-470 GTVSGTYSGTLSGPAVTIGFK
284-470 MSSWGPTTFTIGSSSIPDFPMAQFK
284-470 NSANQYWVSGSGGSFTR
284-470 PGTYTVTLFQGELEAGTGSVSVSAGR
284-470 PQITVNSFTSNAPAAPTAVDSR
284-470 TLMKPGTYTVTLFQGELEAGTGSVSVSAGR
284-470 TSSVTLTSSLSR
284-470 TTEAFAGGR
284-470 TTEAFAGGRPQITVNSFTSNAPAAPTAVDSR
284-470 WTASSSQIGAR
284-471 AGTTTSGEFSTINAALASLPNDSSAR
284-471 EADNAAIYVLNANK
284-471 IILAPNAASNTAGNVYLGR
284-471 LGQAYFGGNTIAVSSK
284-471 MYNVNVK
284-471 NSFGQGSQAIAISNYGSR
284-471 PWGAFAK
284-471 SIFIFPGTYSGQVTSITR
284-471 TSPPSGAIVVR
284-473 ALLVAEVPTFLWIDR
284-473 ASSGELDISQAGLAR
284-473 GLPAHFIVDQGR
284-473 GVATNVSNYNGLGTSTNYGYDELDYVR
284-473 IAAVTSIGGYLQDAR
284-473 KQVVNIEVYNLPDR
284-473 NLAPLLTAR
284-473 QVVNIEVYNLPDR
284-473 QVVNIEVYNLPDRDCSAK
284-473 SGGDWCNNK
284-473 SGQQDYPR
284-473 VINPAAAVR
284-482 ADLQTFLNQLLPASR
284-482 AGWDPATGLGTPDFAK
284-482 AGWDPATGLGTPDFAKLR
284-482 AYPDLSAQANR
284-482 AYPDLSAQANRFEVFVGGR
284-543 LFSTNMGNEYIPSTLPSR
284-543 LTFSTMQSASGEAAYMIGMER
284-543 LTYVEIGNEDFFASDTYTYR
284-543 NGVTFFEGEYAAISTNPNDIFGSPANGR
284-543 SASYFVQK
284-543 TGTVFWGVTR
284-543 TTSGSTIVSQSVPIR
284-543 WPAFVNALR
284-545 DLPFLQQLGVNTVR
284-545 LSFVMSQYFEINNR
284-545 NFANFNVAAYFSEFGCITSPPR
284-545 SSSALVGYAAINGASTWR
284-545 TIDTFSK
284-545 TQYNQASGPNSPAR
284-545 VSPSWSTNILDQYIR
284-545 YDNVLAFNVGNEVVVQEATGVSPYVK
284-545 YLYQDDGTR
284-548 CVEYAER
284-548 DSSEFNADLDQWTNTR
284-548 FLSGQAWADFVIRPFDAR
284-548 GASWGVVDPDLK
284-548 GRMLGGSSSVHYMVMMR
284-548 GSIEDFDR
284-548 IVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGER
284-548 LVNSGTTNGLPAFR
284-548 TGPLTALIANHLAWLR
284-548 YAAVTGDDGWNWDNIQQFVR
284-549 CVEYAER
284-549 DNANTIFHPVGTASMSPR
284-549 DSSEFNADLDQWTNTR
284-549 FLSGQAWADFVIRPFDAR
284-549 GASWGVVDPDLK
284-549 GRMLGGSSSVHYMVMMR
284-549 GSIEDFDR
284-549 IVDGSILPFAPNAHTQGPIYLVGER
284-549 LVNSGTTNGLPAFR
284-549 MLGGSSSVHYMVMMR
284-549 SSSSTAYLRPAQSRPNLSVLINAQVTK
284-549 TGPLTALIANHLAWLR
284-549 YAAVTGDDGWNWDNIQQFVR
284-550 DAEAWFNEK
284-550 HGNSHQGEPR
284-550 IRLENEIQTYR
284-550 LAADDFR
284-550 LENEIQTYR
284-550 NQILNLTTDNANILLQIDNAR
284-550 NVQALEIELQSQLALK
284-550 NVSTGDVNVEMNAAPGVDLTQLLNNMR
284-550 QSLEASLAETEGR
284-550 QSVEADINGLR
284-550 SEITELR
284-550 SEITELRR
284-550 SLLEGEGSSGGGGR
284-550 YENEVALR
284-551 AAFGGSGGR
284-551 AQYEEIAQR
284-551 GFSSGSAVVSGGSR
284-551 GGGFGGGSGFGGGSGFGGGSGFSGGGFGGGGFGGGR
284-551 GSSSGGGYSSGSSSYGSGGR
284-551 IEISELNR
284-551 LALDVEIATYR

284-482	FEVFVGGR
284-482	GSTILFSSGDSGVGGGDCR
284-482	IGIAGYLEEFGNR
284-482	IPVSVAERMLDTK
284-485	FKLFGVNQSGAEFGETK
284-485	GAFAIIEPHNYAR
284-485	GVLGEIGAGSNDVCIAAVK
284-485	ILPEALQPFL
284-485	IPFKLER
284-485	LFGVNQSGAEFGETK
284-485	LQAATAWLQQHGFK
284-485	LSPPAGGLTSPNFDSAYLASLK
284-485	SNDHVVFDIINEPYGIPATDAFALNQAAVNAIR
284-485	STVSYITGK
284-485	YVDNVITSTSDFATWWGNVANQFK
284-490	DGCDFNSFR
284-490	DPSEPGVMR
284-490	EFLGEGLTVDTTK
284-490	EFLGEGLTVDTTKK
284-490	FGDLGTTF
284-490	FVTTGANTNVGSR
284-490	GNCATTSGVPADVEAQHPDASVTFSNIK
284-490	ITVVTQFITSNNSTSGALSEIR
284-490	SVVLDSNWR
284-490	VYLMADESTYQMFNLK
284-490	YGTGYCDSQCPHDIK
284-492	AASVANIPTFIWFDVVAK
284-492	CAGAQAAYTEGVTYALQK
284-492	DYVDQIVAQIAQYPQVR
284-492	NQLVQIVVYDLPDR
284-492	VPTLGTYLADALSIQQSTGR
284-492	VVAVVEPDSLANMVTNLNVAK
284-492	YDGHCGLASAK
284-551	LLEGEECR
284-551	NLDLDSIIAEVKAQYEEIAQR
284-551	NVQDAIADAEQR
284-551	RYLDGLTAER
284-551	SCQISCKSR
284-551	SISISVAGGGGGFGAAGGFGGR
284-551	VDLLNQEIEFLK
284-551	VLYDAEISQIHQSVTDTNVILSMDNSR
284-551	YEDEINKR
284-551	YEELQVTVGR
284-551	YLDGLTAER
284-559	AITVNGIFPGTPVILQK
284-559	APLTGGNPTGNPNLDVSLIR
284-559	GAPAVEPTTVATTDGHK
284-559	GGPLVPYAVINVEQGK
284-559	GGPLVPYAVINVEQGKR
284-559	GTFIVYDPNDPLK
284-559	KLDFHIR
284-559	KPQDFLPSEQVIILPANK
284-559	LDFHIR
284-559	NDVVSPDGFER
284-559	STSIHWHGLFQHK
284-559	TSNSDVVNLVNPPR
284-559	TSNSDVVNLVNPPRR
284-559	VQINTINELTDPGMR
284-559	YKGAPAVEPTTVATTDGHK
284-562	DAEAWFNEK
284-562	ELTTEIDNNIEQISSYK
284-562	HGNSHQGEPR
284-562	IRLENEIQTYR
284-562	LAADDFR
284-562	LENEIQTYR
284-562	NQILNLTTDNANILLQIDNAR
284-562	NVSTGDVNVEMNAAPGVDLTQLLNNMR
284-562	QSLEASLAETEGR
284-562	QSVEADINGLR
284-562	SEITELR
284-562	SEITELRR
284-562	SLLEGEGSSGGGGR
284-562	VLSSMVESETK
284-562	YENEVALR