

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

Biochemische Charakterisierung und Applikation der Peroxidase MsP1

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
- Dr. rer. nat. -
im Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl.-Ing. (FH) Renata Teresa Szweda, M.Sc.
geboren am 30.09.1979 in Oppeln, PL

Gießen, 10.10.2016

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Zorn
2. Gutachter: Prof. Dr. S. Schindler
Prüfer: Prof. Dr. K. Sträßer
Prüfer: Prof. Dr. M. Rühl

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Gießen, 10.10.2016

Renata Teresa Szweda

Danksagung

Zu großem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. Holger Zorn für die Vergabe dieses spannenden Themas, sein stete Ansprechbarkeit und seine motivierend wirkende Begeisterung für die Naturwissenschaften verpflichtet. Seine konstruktive Kritik hat mir geholfen, viele Herausforderungen zu meistern. Vor allem danke ich ihm für die hervorragenden und familienfreundlichen Arbeitsbedingungen sowie die gewährte zusätzliche Unterstützung im Labor während meiner Schwangerschaft.

Herrn Prof. Dr. Siegfried Schindler danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der AG Biochemie in Dortmund und des Instituts für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie verdienen Dank für das freundschaftliche Arbeitsklima. Durch unsere verschiedenen Vorbildungen war es immer möglich, einen Spezialisten zur Beantwortung einer Frage zu finden. Besonders möchte ich Dr. Ina Schüttmann für die vielen Diskussionen auch außerhalb des Büros und für ihre Freundschaft Dank aussprechen.

Ebenso bedanke ich mich bei dem Projektpartner DSM Food Specialties (Delft, NL) für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der eingesetzten Enzyme. Der AG von Prof. Dr. Roland Winter, insbesondere Dr. Matthias Pühse, bin ich für die Zusammenarbeit bei der Messung der Druck- und Temperaturabhängigkeiten von MsP1 sehr dankbar. Der AG von Prof. Dr. Smarsly danke ich für die Herstellung der funktionalisierten Kieselgel-Monoliten und Prof. Dr.-Ing. Czermak für die Möglichkeit der Nutzung des *Malvern Mastersizers*.

Besonderen Dank verdient Prof. Dr. Klaus Stadlander von der Fachhochschule Südwestfalen für die Unterstützung und den gewährten Freiraum für das Schreiben dieser Arbeit während meiner jetzigen Anstellung.

Meinem Mann Martin Eichelberg und meinen Kindern Adam und Lydia danke ich dafür, dass jeder Tag für mich ein Lächeln bereithält. Mein größter Dank gilt meiner Mutter Edeltraud Szweda, die mit ihrer Liebe und ihrem Optimismus vieles ermöglicht hat.

Publikationen

Begutachtete Originalbeiträge in wissenschaftlichen Zeitschriften

Schüttmann I, Bouws H, **Szweda RT**, Suckow M, Czermak P, Zorn H (2014) Induction, Characterization, and Heterologous Expression of a Carotenoid Degrading Versatile Peroxidase from *Pleurotus sapidus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 103:79-84.

Szweda RT, Schmidt K, Zorn H (2013) Bleaching of Colored Whey and Milk by a Multiple-Enzyme System. *European Food Research and Technology* 237:377-384.

Schmidt K, Kunkel K, **Szweda RT**, Portz A, Fraatz MA, Zorn H (2013) Biotechnological Production of Norisoprenoid Aroma Compounds. In: Winterhalter P, Eberle SE (Eds) *Carotenoid Cleavage Products*. ACS Symposium Series; American Chemical Society, Washington, DC, pp 157-168

Pühse M, **Szweda RT**, Ma Y, Jeworrek C, Winter R, Zorn H (2009) *Marasmius scorodoni* Extracellular Dimeric Peroxidase - Exploring its Temperature and Pressure Stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* 1794:1091-1098.

Patent

Zorn H, **Szweda RT**, Wilms J, Kumar M (2008) Method for Modifying Non-Starch Carbohydrate Material: PCT/EP2009/058871 eingetragen am 10. Juli 2009. (CN102112620 A)

Sonstiges

Zorn H, Riemer S, **Szweda RT**, Fraatz MA (2010) Neue enzymatische Verfahren für die Lebensmittel- und Aromabiotechnologie. *Lebensmittelchemie* 64:18

Szweda RT, Berger RG, Zorn H (2010) Pilzperoxidasen - effiziente Werkzeuge für die Lebensmittelbiotechnologie. *Lebensmittelchemie* 64:7

Bouws H, Schüttmann I, **Szweda RT**, Zorn H (2009) Sekretome von Basidiomyceten zum enzymatischen Aufschluss von Rapsstroh. *Lebensmittelchemie* 63:130

Schüttmann I, **Szweda RT**, Zorn H (2009) Pilzsekretome Werkzeugkasten für die Biotechnologie nachwachsender Rohstoffe. In: Gülzower Fachgespräche (Band 31) Stoffliche Nutzung von Lignin. Fachagentur nachwachsende Rohstoffe e.V., Gülzow

Zorn H, **Szweda RT**, Fraatz MA (2009) Enzymatic Degradation of Carotenes, Xanthophylls, and Xanthophyll Esters by Fungal Peroxidases (44th International Detergency Conference, Düsseldorf)

Zorn H, Riemer SJJ, **Szweda RT**, Fraatz MA (2009) Neue enzymatische Verfahren für die Lebensmittel- und Aromabiotechnologie (Plenarvortrag, Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin)

Zorn H, Schüttmann I, **Szweda RT**, Kopp S, Bouws H (2008) Fungal Secretomes Versatile Toolbox for White Biotechnology (SusChemEng Conference on Sustainable Biochemical and Chemical Engineering, Dortmund)

Zusammenfassung

In den Submerskulturen des Basidiomyceten *Mycetinis scorodonius* wurden die Aktivitäten von Cellulasen, Xylanasen, Laccasen, diversen Peroxidasen und Esterasen über den Kulturverlauf gemessen. Kultiviert wurde auf Stroh und den Rückständen einer Biogasanlage. Alle Enzyme zeigten ein wellenförmiges Expressionsmuster. Die Expression der Laccasen war der der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen nachgeschaltet. Bei den Kulturen mit den Rückständen einer Biogasanlage waren die Aktivitäten von Peroxidasen und Laccasen bis zu 10 mal gegenüber den Kulturen auf Stroh erhöht. Für die ungewöhnliche β,β -Carotin abbauende Dyp-Typ Peroxidase MsP1 aus *M. scorodonius* wurde die Fähigkeit, Lignin abzubauen, mittels Messung der Partikelgrößenverteilung, Größenausschlusschromatographie, Elektronenmikroskopie und dem photometrischen Nachweis von Glucose untersucht. Für den direkten Nachweis wurde eine Suspension von organosolv Lignin eingesetzt. Als Ergebnis dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass MsP1 in der Lage ist, sowohl ungelöste Partikel als auch gelöste Moleküle von organosolv Lignin zu modifizieren und abzubauen. Für den indirekten Nachweis wurde MsP1 als Vorbehandlungsschritt in der Verzuckerung von Stroh mittels Cellulasen und Xylanasen eingesetzt. Damit konnte eine Steigerung in der Verzuckerungsrate von Stroh erzielt werden. Ein weiteres Einsatzgebiet für MsP1 ist die Bleichung von Milchprodukten durch den Abbau von Carotinoiden, welche nach der Färbung von Käse bis zu 20 % in der Molke verbleiben. Es wurde sowohl ein zwei- und als auch ein drei-Enzym-System zur Bleichung von Molke bzw. Milch entwickelt. Durch den Einsatz von Glucoseoxidase bzw. Glucoseoxidase und Lactase konnte das für die Bleichung mittels MsP1 benötigte H_2O_2 *in situ* generiert werden. Der zeitliche Verlauf der Bleichung wurde spektralphotometrisch nach CIELab verfolgt. Des Weiteren wurde MsP1 biochemisch untersucht. Temperatur- und Druckoptimum von MsP1 wurden mittels dynamischer Differenzkalorimetrie, Fluoreszenz- und FT-IR-Spektroskopie sowie enzymatischen Assays mit β,β -Carotin und 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) als Substrat untersucht. MsP1 ist thermo- und druckstabil bis zu einer Temperatur von 65 °C bzw. einem Druck von 8-10 kbar. Als Besonderheit zeigte sich eine Aktivitätserhöhung bei 500 bar, welche vermutlich auf geringe strukturelle Änderungen zurückgeht. Für einen optimalen industriellen Einsatz wurden weitere Rahmenbedingungen wie H_2O_2 - und Lösemittel-Toleranz, pH-Optimum, sowie die kinetischen Parameter untersucht. Das pH-Optimum wurde bei pH 2,6 gefunden. MsP1 wurde schon bei geringen Konzentrationen von H_2O_2 gehemmt. Die inhibierende H_2O_2 -Konzentration hängt von der Konzentration des Zweitsubstrates und des Einsatzmediums (Puffer oder Molke) ab. Die Wechselzahl (k_{cat}) von MsP1 für die beiden Substrate β,β -Carotin und ABTS beträgt $0,38 \pm (6,6 \%)$ bzw. $176 \pm (6,2 \%) s^{-1}$. Zur Steigerung der Aktivität von MsP1 gegenüber β,β -Carotin wurden Mediatoren eingesetzt. Von den vier Mediatoren Coniferylalkohol, Ferulasäureethylester, 4-Ethylphenol und *p*-Coumarsäure zeigte Coniferylalkohol die höchste Steigerung der Effizienz des enzymatischen Umsatzes, dies jedoch in einem sehr kleinen Konzentrationsbereich. Für die Möglichkeit des wiederholten Einsatzes von MsP1 im industriellen Gebrauch wurde MsP1 auf Kieselgel immobilisiert.

Schlagerworte: *Mycetinis scorodonius*, Sekretom, Peroxidase, Lignocelluloseabbau, Molkebleichung, Immobilisierung

Abstract

The present work addresses the production of cellulases, xylanases, laccases, several peroxidases, and esterases in submerged cultures of the basidiomycete *Mycetinis scorodonius*. The lignocelluloses from corn stover and residues from a biogas plant were used as substrates for cultivation. All enzymes showed a wave-like expression pattern. The expression of laccase followed consistently those of β,β -carotene-cleaving peroxidases. The activities of peroxidases and laccases were 10 times higher in cultures with residues from a biogas plant than in those with corn stover. The ability to degrade lignin was investigated for the β,β -carotene-cleaving peroxidase MsP1 from *M. scorodonius*. For verification, an organosolv lignin suspension was used as substrate. It was shown that MsP1 is able to degrade and modify suspended lignin particles as well as dissolved lignin molecules. For indirect evidence, corn stover was pretreated with MsP1/H₂O₂ followed by saccharification using cellulases and xylanases. Consequently, the yield of reducing sugars increased. Product analysis was performed by the determination of glucose using photometric assays, a determination of the particle size distribution, electron microscopy, and HPSEC analysis. A further application for MsP1 is bleaching of dairy products. Carotenoids are broadly used to enhance the colour of cheese types like Cheddar and Gouda. While ~80% of the colourants are transferred into the cheese, the rest remains in the whey and impedes its commercial utilization. The ability of the fungal peroxidase MsP1 to degrade carotenoids was successfully employed for the bleaching of coloured whey and milk in fine tuned two- and three enzyme systems, respectively. The systems were composed of MsP1, glucose oxidase to generate H₂O₂ *in situ*, and if necessary, acid lactase. Time dependent bleaching was monitored colorimetrically, and the results were expressed by using the international colorimetric system of CIELab. Furthermore, biochemical properties of MsP1 were explored. Therefore, the temperature and pressure dependent stability and function of MsP1 were investigated. Several biophysical techniques such as DSC, fluorescence and FT-IR spectroscopy were combined with enzymatic studies of the enzyme with ABTS and β,β -carotene as substrates. The dimeric MsP1 turned out to be not only rather thermostable, but also highly resistant to pressure, i.e., up to temperatures of about 65 °C and pressures as high as 8-10 kbar at ambient temperatures. Remarkably, the activity of MsP1 increased by a factor of two until ~500 kbar, which may result from slight structural changes stabilizing the transition state of the enzymatic reaction. To prepare for optimal industrial applications, basic parameters such as tolerance to H₂O₂ and solvents, pH-optimum, as well as steady-state kinetics were investigated. The pH-optimum was found at pH=2.6. The value of the inhibiting H₂O₂ concentration depended on the concentration of the second substrate and the media (buffer or whey). Nevertheless, MsP1 was inhibited at low H₂O₂-concentrations at all conditions. Steady-state kinetics were determined for β,β -carotene and ABTS as substrates, k_{cat} was determined to be $0.3 \pm (6.6\%)$ and $176 \pm (6.2\%) \text{ s}^{-1}$, respectively. An activity enhancement of MsP1 towards β,β -carotene was realized by the addition of mediators. Four mediators were applied: coniferyl alcohol, ferulic acid ethylester, 4-ethylphenol, and *p*-coumaric acid. Coniferyl alcohol increased the catalytic efficiency to its optimum, although the effective concentration range was very narrow. Finally, MsP1 was immobilized on a silica surface for the option of a reapplication of MsP1 for the industrial application.

Keywords: *Mycetinis scorodonius*, secretome, peroxidase, lignocellulose degradation, whey bleaching, immobilization

Abkürzungen

4-BP	4-Bromphenol
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-Ethylbenzthiazolin)- 6-Sulfonsäure
AFEX	<i>ammonia fibre explosion</i>
AmNH ₂	4-Aminoantipyrin
AnaPX	Peroxidase aus <i>Anabaena sp.</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CPZ	Chlorpromazin
CPZSO	Chlorpromazinsulfoxid
CSM	<i>center of spectral mass</i>
CWPO-C	<i>cell wall peroxidase</i>
DAD	Diodenarray-Detektor
DMCA	3,4-Dimethoxycinnamic acid
DNS	Dinitrosalicylsäure
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTT	Dithiothreitol
DyP-Typ	<i>dye decolorizing peroxidase</i> -Typ
E	Enzym
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FA	Ferulasäure
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FSEE	Ferulasäureethylester
FT-IR-Spektroskopie	Fourier-Transform-Infrarot- Spektroskopie
GOX	Glucoseoxidase
G-P-6-Dehydrogenase	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HEC	Hydroxyethylcellulose
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPSEC	<i>high performance size exclusion chroma- tography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
k_{cat}	Wechselzahl
kDa	kiloDalton
k_m	Michaelis-Menten-Konstante
LiP	Ligninperoxidase
MAPTMS	3-Methylaminopropyl-Trimethoxisilan
MnP	Mangan-Peroxidase
MsP1	<i>Mycetinis scorodoni</i> Peroxidase 1
MsP2	<i>Mycetinis scorodoni</i> Peroxidase 2
NaAc-Puffer	Natriumacetat-Puffer
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PhOH	Phenol
RBBR	<i>Remazol brilliant blue R</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
S	Substrat
SBP	Sojabohnenperoxidase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SNL	Standard-Nähr-Lösung
SSF	<i>simultaneous saccharification and fermentation</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
Trp	Tryptophan
U	Unit: 1 μmol Substrat pro Minute
UV	Ultraviolett
VA	Veratrylalkohol
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
VIS	<i>visible</i>
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
VO	Veratrol
VP	polyvalente Peroxidase
ZoPrx	Zo-Peroxidase

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund	1
1.2	Zielsetzung	6
2	Materialien und Methoden	9
2.1	Geräte und Chemikalien	9
2.2	Kulturführung	13
2.2.1	Stammhaltung	13
2.2.2	Vorkultur	13
2.2.3	Submerskultur I	14
2.2.4	Submerskultur II	15
2.3	Enzymaktivitäten	15
2.3.1	Cellulaseaktivitäten	16
2.3.2	Xylanaseaktivität	16
2.3.3	Laccaseaktivität	17
2.3.4	Peroxidaseaktivitäten	17
2.3.5	Esteraseaktivität	18
2.4	Proteinkonzentration	18
2.5	Glucosekonzentration	18
2.6	Phenolkonzentration	19
2.7	Lignin- und Strohabbau	20
2.7.1	Inkubation von organosolv Lignin mit MsP1	20
2.7.2	Partikelgrößenbestimmung von mit MsP1 behandeltem Lignin	20
2.7.3	Analytik der Molekulargewichte der entstandenen gelösten Ligninmoleküle mittels HPSEC	20
2.7.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung von mit MsP1 behandeltem Lignin	21
2.7.5	Inhibierung der Cellulase GC220	21
2.7.6	Strohverdau	22
2.8	Biochemische Methoden	25
2.8.1	Temperatur- und Druckabhängigkeiten von MsP1	25
2.8.2	pH-Optimum	27
2.8.3	Lösungsmitteltoleranz	27
2.8.4	Stabilität von MsP1 in Lösungsmitteln	27
2.8.5	H ₂ O ₂ -Toleranz von MsP1	27
2.8.6	Proteinreinigung von MsP1 zur Bestimmung der kinetischen Konstanten	28
2.8.7	Gradienten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
2.8.8	Bestimmung der Reinheitszahl	30
2.8.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	30

2.8.10	Bestimmung der kinetischen Konstanten	30
2.9	Mediatoren	30
2.9.1	Enzymaktivität von MsP1 mit Ferulasäureethylester als Substrat	30
2.9.2	Enzymaktivität von MsP1 und Laccase mit Coniferylalkohol als Substrat	31
2.9.3	Aktivität von MsP1 in Gegenwart von Coniferylalkohol	31
2.9.4	Vergleich verschiedener Mediatoren zur Steigerung der MsP1- Aktivität gegenüber β,β -Carotin	32
2.9.5	Bestimmung der kinetischen Konstanten in Gegenwart verschie- dener Mediatoren	33
2.10	Immobilisierung	34
2.10.1	Immobilisierung von MsP1 auf Kieselgel	34
2.10.2	Messung der Enzymaktivität von immobilisiertem MsP1	34
2.10.3	Messung der Enzymaktivität von immobilisiertem MsP1 in meh- reren Zyklen	35
2.11	Carotinoidbleichung in Molke und Milch	36
2.11.1	MsP1-Reinigung über Ammoniumsulfat-Fällung	36
2.11.2	Enzym-Assays	36
2.11.3	Bleichung	36
2.12	Entsorgung	38
2.12.1	Sterilisation von S1-Abfällen	38
2.12.2	Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Submerskulturen von <i>Mycetinis scorodoni</i>	39
3.1.1	Messung der Aktivitäten von Cellulase, Xylanase, Laccase und Peroxidase	39
3.1.2	Messung der lignolytischen Enzyme auf verschiedenen lignocellu- losehaltigen Substraten	42
3.2	Lignin- und Strohabbau	52
3.2.1	Abbau von organosolv Lignin	52
3.2.2	Strohabbau	58
3.3	Biochemische Charakterisierung von MsP1	64
3.3.1	Temperatur- und Druckoptimum	64
3.3.2	Temperatur- und Druckabhängigkeit der MsP1-Aktivität	67
3.3.3	pH-Optimum der Reaktion von MsP1 mit β,β -Carotin	69
3.3.4	Lösemitteltoleranz von MsP1	70
3.3.5	Stabilität von MsP1 in Lösungsmitteln	70
3.3.6	H ₂ O ₂ -Toleranz	71
3.3.7	Bestimmung der kinetischen Konstanten von MsP1	73
3.4	Nutzung verschiedener Mediatoren zur Steigerung der MsP1-Aktivität .	77
3.4.1	Enzymaktivität von MsP1 gegenüber Ferulasäureethylester	78
3.4.2	Enzymaktivität von MsP1 und Laccase gegenüber Coniferylalkohol	78
3.4.3	Aktivität von MsP1 in Gegenwart von Coniferylalkohol	81
3.4.4	Vergleich verschiedener Mediatoren zur Steigerung der MsP1- Aktivität gegenüber β,β -Carotin	86

3.4.5	Bestimmung der kinetischen Konstanten von MsP1 in Gegenwart verschiedener Mediatoren	88
3.5	Immobilisierung	91
3.5.1	Wiederholter Einsatz des immobilisierten MsP1	91
3.6	Bleichung von gefärbter Molke und Milch	95
3.6.1	H ₂ O ₂ -Abhängigkeit der Bleichung von Molke	95
3.6.2	Bleichung von Molke mit einem 2-Enzym-System	95
3.6.3	Bleichung von Milch mit einem 3-Enzym-System	96
4	Diskussion	99
4.1	Submerskulturen von <i>Mycetinis scorodoni</i>	99
4.2	Ligninabbau	108
4.3	Biochemische Charakterisierung von MsP1	114
4.4	Immobilisierung	127
4.5	Bleichung von Milchprodukten	131
	Literaturverzeichnis	136

1 Einleitung

1.1 Hintergrund

Sie begegnen uns beinahe täglich als Glückssymbol (*Amanita muscaria*), als Köstlichkeit (*Cantharellus cibarius*) oder als Heilmittel in der traditionellen chinesischen Medizin (*Ganoderma lucidum*). Basidiomyceten als die höchstentwickelten Pilze verfügen jedoch über noch viel mehr für uns nutzbare Eigenschaften. Da sie ihre Nahrung aus der Umwelt aufnehmen müssen, exprimieren sie eine Vielzahl an unterschiedlichen extrazellulären Enzymen (Zorn et al., 2005; Bouws et al., 2008; Lomascolo et al., 2011; Hori et al., 2014; Alfaro et al., 2014). Zum Abbau von Lignocellulosen sekretieren sie verschiedene Enzyme, darunter Peroxidasen und Laccasen (Asgher et al., 2010; Doddapaneni et al., 2013; Colpa et al., 2014), Cellulasen und Xylanasen (Aguiar et al., 2013; Belova et al., 2014), Lipasen (Singh et al., 2014a; Singh und Mukhopadhyay, 2012) und Esterasen (Linke et al., 2013; Haase-Aschoff et al., 2013; Dippe et al., 2012), Aryl-Alkoholoxidasen (Barrasa et al., 1998; Ferreira et al., 2009) und Peptidasen (Iketani et al., 2013; Kudryavtseva et al., 2008). Die Höhe der Expression der jeweiligen Enzyme ist abhängig vom Pilz, bei gleichem Pilz aber auch von den Kulturbedingungen (Fernández-Fueyo et al., 2014a) und den zur Verfügung stehenden Substraten (Elisashvili et al., 2008). Dies bietet ein großes Spektrum an Enzymen für die verschiedenen Anwendungsgebiete in der Industrie. Besonders attraktiv macht die Enzyme ihre häufig sehr hohe Temperatur-Stabilität, die bis 70 °C (Ding et al., 2012; Li et al., 2012b; Hilden et al., 2007) reicht, wobei ihre Temperaturoptima um 60 °C (Shi et al., 2015; Cai et al., 2010) liegen. Zudem arbeiten die Enzyme oft bei niedrigen pH-Werten (Fernández-Fueyo et al., 2014c; Gomes et al., 2009; Hilden et al., 2007).

Es gibt viele mögliche Einsatzgebiete für Enzyme aus Basidiomyceten, darunter in der Nahrungsmittelindustrie, Kraftstoffherstellung, Textilindustrie, Pharmazie und Abwasserbehandlung (Martinez et al., 2014; Mate und Alcalde, 2015; Mendonca Maciel, Marcia Jaqueline et al., 2010; Lomascolo et al., 2011). Insbesondere im Schadstoffabbau können diese Enzyme aufgrund ihrer Fähigkeit, mit schwer abbaubaren Verbindungen zu reagieren, eingesetzt werden. Zum Beispiel werden für den Abbau von Farbstoffen in Abwässern Laccasen (Daassi et al., 2014; Kamal et al., 2011) und Peroxidasen (Jamal et al., 2012) und von Aflatoxinen Mangan-Peroxidasen (MnP) (Yehia, 2014) genutzt.

In der Nahrungsmittelindustrie ist der Einsatz von Basidiomyceten (Bosse et al., 2013) und deren Enzymen für die Aromaherstellung interessant. Eine Biotransformation mit Hilfe von Enzymen ermöglicht eine stereoselektive Herstellung von industriell gefragten Produkten aus kostengünstigen und leicht zugänglichen Ausgangssubstraten. Eine Oxigenase aus *P. sapidus* katalysiert die Oxidation von Terpenen wie (+)-Valencen zu dem Grapefruitaroma (+)-Nootkaton (Fraatz et al., 2009; Krügener et al., 2010) und von α -Pinen zu dem in Rosmarin enthaltenen Aroma Verbenon (Krings et al., 2009). Kürzlich

wurde eine direkte Fermentation von Würze mittels Shiitake (*Lentinula edodes*) zur Herstellung eines Erfrischungsgetränkes erfolgreich durchgeführt (Zhang et al., 2014a). Zwei Peroxidasen aus *Mycetinis scorodoni* (früher *Marasmius scorodoni* (Wilson und Desjardin, 2005)) ermöglichen die Herstellung von Veilchen- und Rosenaromen aus β,β -Carotin (Zelena et al., 2009). *M. scorodoni*, auch kleiner Knoblauchschildling genannt, dient mit seinem intensiven Knoblaucharoma in der Küche als Würzpilz. Die *M. scorodoni* Peroxidase 1 (MsP1: EC 1.11.1.19) wurde bei der Suche nach einem β,β -Carotin abbauenden Enzym in Kulturen von *M. scorodoni* gefunden. MsP1 wurde aus Kulturüberständen von *M. scorodoni* gereinigt und aus einer cDNA-Bibliothek kloniert. Eine Dimerstruktur wurde auf Grundlage einer Größenausschlusschromatographie und SDS-PAGE-Analyse vermutet (Scheibner et al., 2008). Auf Grund einer Homologie von 48% der Aminosäuresequenz zu den Enzymen DyP (Q8WZK8) und TAP (Q8NKF3) aus *Bjerkandera adusta* (früher *Thanatephorus cucumeris* bzw. *Termitomyces albuminosus*), wurde MsP1 in die Gruppe der so genannten DyP-Typ Peroxidasen (Faraco et al., 2007; Colpa et al., 2014) eingeordnet. Industriell wird MsP1 unter dem Namen MaxiBright™ (Zorn et al., 2007) von der Firma DSM Food Specialties (Delft) zur Bleichung von Molkereiprodukten vermarktet. MsP1 ist in der Lage, Carotine und Xanthophylle zu Norisoprenoiden, welche nicht gefärbt sind, abzubauen (Abb. 1.1) (Zorn et al., 2003; Zelena et al., 2009).

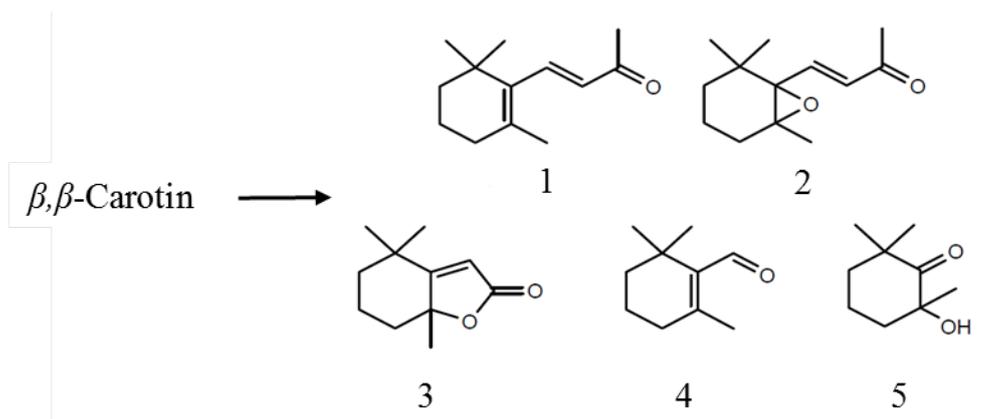


Abbildung 1.1: Aus dem β,β -Carotinabbau mittels MsP1 entstandene Norisoprenoide. 1: β -Ionon, 2: β -Ionon-5,6-Epoxid, 3: Dihydroactinidiolid, 4: β -Cyclocitral, 5: 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon (Zelena et al., 2009).

Bleichung von Milchprodukten

Carotinoide wie Annatto (U.S. Food and Drug Administration, 2014e) (E 160b) und β,β -Carotin (U.S. Food and Drug Administration, 2014d) (E 160a) (Bundesministerium für Gesundheit, 2012) (Council of the European Union, 2008) werden eingesetzt, um die gelbe und orangene Farbe von verschiedenen Käsesorten wie Cheddar und Gouda zu verstärken. Alleine in den USA wurden 2014 $\sim 1,45$ Millionen Tonnen Cheddar und $\sim 0,4$ Millionen Tonnen Trockenmolke produziert (National Agricultural Statistics Service, 2015). Schon 1937 analysierte Barnicoat Käse und Molke und fand heraus, dass nur 80-85% der Farbstoffe in den Käse übergehen und der Rest in der Molke verbleibt

(Barnicoat, 1937). Molke ist ein hochwertiges Lebensmittel. Es beinhaltet lösliche Molkeproteine, Lactose, Mineralien und Vitamine (Kosikowski, 1979). Molke kann durch ihren Proteingehalt zur Formulierung von Lebensmitteln eingesetzt werden. Sie kann genutzt werden, Fleisch- und Eiersatz (Childs et al., 2007; Alfaifi und Stathopoulos, 2009) sowie Molkeprotein-Konzentrate herzustellen. Weitere Einsatzgebiete eröffnen sich über die Möglichkeit, Molkeproteine über z.B. enzymatische Hydrolyse oder Polymerisation zu modifizieren (Foegeding et al., 2002).

In Molkedrinks und speziell in Molkeprotein-Konzentraten sind die Farbstoffe unerwünscht, da sie das Endprodukt gelblich färben. Aus diesem Grunde wird die Bleichung von Molke im industriellen Maßstab durchgeführt. Zu diesem Zweck werden hauptsächlich Wasserstoffperoxid und Benzoylperoxid als Bleichungsreagenzien eingesetzt (U.S. Food and Drug Administration, 2014c,a; McDonough et al., 1968). Annatto und β,β -Carotin besitzen eine mehrfach ungesättigte Struktur, durch welche sie dem oxidativen Abbau ausgesetzt sind (Carrie, 1938). Alternativ könnte eine Bleichung auch durch UV-Licht, säureaktiviertes Bentonit und Ozon realisiert werden (Kang et al., 2010). All diese Bleichungsprozesse erfolgen bei Temperaturen größer 50 °C, was zur Entstehung von Fehlparomen führt (Croissant et al., 2009; Listiyani et al., 2012). Eine enzymatische Bleichung unter milden Reaktionsbedingungen kann dies verhindern. Deswegen wird MsP1 zur Bleichung von Molkereiprodukten eingesetzt.

Um eine Farbänderung in der trüben Molke zeitlich quantitativ verfolgen zu können, bietet sich die Spektralcolorimetrie als ideales Werkzeug an. Die Ergebnisse werden im internationalen colorimetrischen System CIELab dargestellt. Das CIELab System ist definiert über ein Koordinatensystem mit den drei Achsen L, a und b. Die Koordinaten a und b stellen die gemessenen Wellenlängen als Farben dar. Die a-Achse erstreckt sich von Grün (-a) nach Rot (+a) und die b-Achse von Blau (-b) nach Gelb (+b). Die spezifische Helligkeit wird auf der vertikalen L-Achse dargestellt und ist eine Funktion der Reflexion. Die Kalibration basiert auf einem Schwarz-Standard (L=0) und einem Weiß-Standard (L=100) (Commission Internationale de l'Éclairage, 1988).

Abbau und Nutzung von Lignocellulose

Im Bereich der Kraftstoffherstellung gewann der Ligninabbau mit Hilfe von Enzymen aus Basidiomyceten in den vergangenen Jahrzehnten an Bedeutung und rückte in den Fokus der Wissenschaft (Kirk und Farrell, 1987). In Anbetracht der steigenden Preise für Öl wuchs zudem das Interesse an erneuerbaren Energien und alternativen Quellen für organische Grundchemikalien (Ghaffar und Fan, 2014). In diesem Zusammenhang steht die Erzeugung von Bioethanol und Biogas im Fokus des Interesses. Zurzeit werden beide über die Fermentation von Pflanzen mit hohen Stärke- oder Glucosegehalten wie Mais, Zuckerrohr und Zuckerrübe erzeugt. Die Verwendung dieser primär als Nahrungsmittel verwendeten Pflanzen führte zu drastischen Preissteigerungen (Rotman, 2008). Es gibt z.B. einen direkten Zusammenhang zwischen dem Preis von Mais und der Börseneinführung von Ethanol (Demirer et al., 2012).

Eine nachhaltige Alternative bieten die Biokraftstoffe zweiter Generation aus Lignocellulose. Dafür können Reste aus Land- und Forstwirtschaft weiterverarbeitet werden (Torre et al., 2013). Lignocellulose ist im Übermaß vorhanden und bietet als

nachwachsender Rohstoff eine Quelle für Zucker als Substrat. Dieses kann zu Ethanol, welcher als Kraftstoffzusatz oder Chemie-Rohstoff eingesetzt wird, fermentiert werden. Lignocellulose als Biomasse besteht hauptsächlich aus vier Polymeren mit variablen Anteilen (Abb. 1.2): Cellulose (~33-51%), Hemicellulose (~19-34%), Pectin (~2-20%) und Lignin (~20-30%) (Aristidou und Penttilä, 2000). Die Biokonversion von Lignocellulose zu Ethanol beinhaltet drei Schritte: einen Vorbehandlungsschritt zur Steigerung der Substratzugänglichkeit, enzymatische Hydrolyse der Cellulose und Hemicellulose zu Einfachzuckern und die Fermentation der Zucker zu Ethanol. In der Lignocellulose liegt die Cellulose physikalisch gebunden an der Hemicellulose und physikalisch und chemisch gebunden am Lignin vor (Abb. 1.2) (Hori et al., 2014). Die Auswirkungen der Hemicellulose und Ligninmatrix (Zeng et al., 2014) auf eine enzymatische Hydrolyse der Cellulose wurden für verschiedene Lignocellulosen, unter anderem Getreide (Mussatto et al., 2008) und Mais (Ohgren et al., 2006), untersucht.

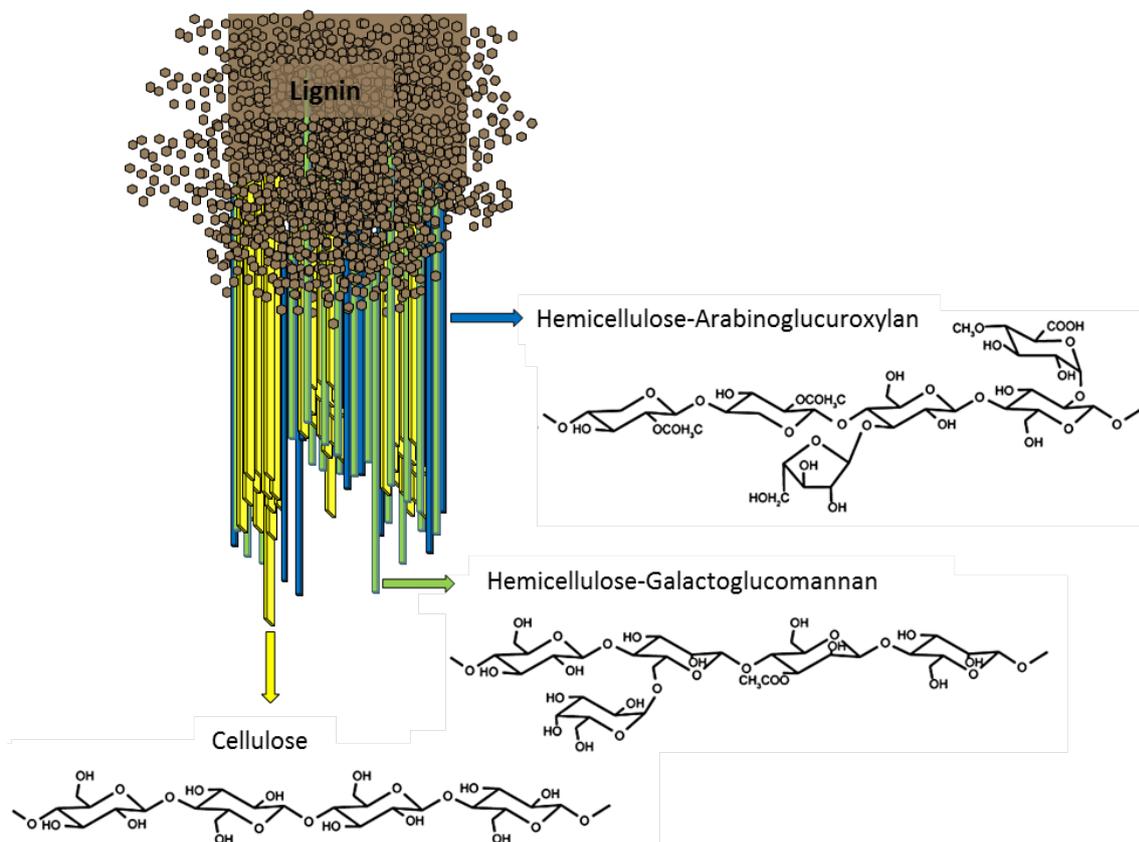


Abbildung 1.2: Die in Holz vorhandenen Polymere sind das schwer abzubauen Lignin, Hemicellulose und Cellulose, modifiziert nach (Hori et al., 2014).

Lignin (Abb. 1.4) leitet sich hauptsächlich von drei Monolignolen ab: *p*-Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol (Abb. 1.3a). Je nach Einbauort in der Zelle unterscheiden sich die Anteile der jeweiligen Monomere im Lignin (Abb. 1.3b) (Davin und Lewis, 2005). Um die Hydrolyse der Lignocellulosen zu erleichtern, stehen mehrere Vorbehandlungsmethoden, wie der Einsatz von heißem Wasser (Mosier et al., 2005) oder verdünnten Säuren (Lu et al., 2007) sowie das AFEX- (*ammonia fibre explosion*), Dampfexplosions-

(Galbe und Zacchi, 2007) oder das Organosolv-Verfahren (Sun und Chen, 2008), zur Verfügung.

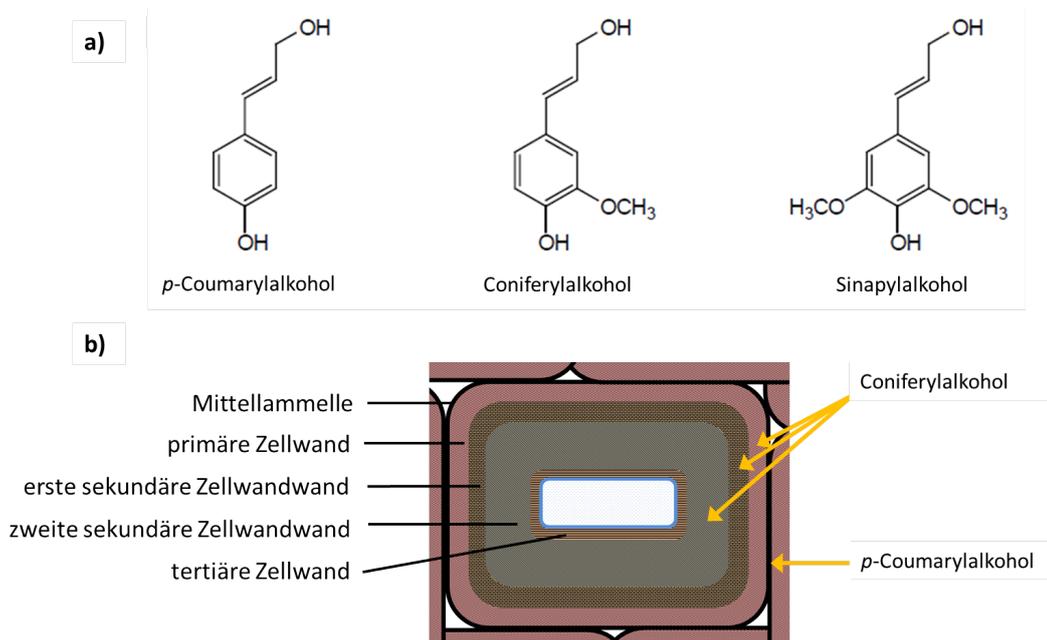


Abbildung 1.3: a) Die drei Monolignole des Holzes. b) Darstellung einer Koniferentracheide. *p*-Coumarylalkohol ist vorrangig in der Mittellammelle und Coniferylalkohol in der Sekundärwand der Zelle eingebaut, modifiziert nach (Lewin, 1991, S. 44) und (Whiting und Goring, 1982).

Die Cellulose hydrolysierenden Enzyme sind in drei Gruppen eingeteilt: Endoglucanasen, Cellobiohydrolasen (Exoglucanasen) und β -Glucosidasen. Ethanol kann aus lignocellulotischem Material durch dessen Hydrolyse und einem anschließenden Fermentationsprozess hergestellt werden (Kumar et al., 2008). Die Fermentation zur Herstellung von Alkoholen kann nacheinander (Palmqvist et al., 1996) oder simultan zu der Verzuckerung (Ohgren et al., 2007) (Ibrahim et al., 2015) durchgeführt werden. Es gibt mehrere geeignete Mikroorganismen für die Produktion von Ethanol wie thermotolerante und Xylose-*co*-fermentierende Species. Dazu gehören rekombinante *Saccharomyces cerevisiae* (Katahira et al., 2008) oder andere Hefespecies wie *Hansenula polymorpha* (Ryabova et al., 2003). Während des Vorbehandlungsprozesses zur Entfernung des Lignins entstehen verschiedene toxische und inhibierende Stoffe, die die Fermentation von Zuckern zu Ethanol (Delgenes et al., 1996; Mussatto et al., 2008) und die Hydrolyse der Cellulose (Cantarella et al., 2004) inhibieren.

Eine Lösung der Probleme der chemischen und physikalischen Vorbehandlung von Lignocellulosen kann eine enzymatische Delignifizierung sein. Diese hat wesentliche Vorteile, wie geringere Investitionskosten, geringeren Energieverbrauch und die Vermeidung toxischer Nebenprodukte. Saprophytische Asco- und Basidiomyceten sind die einzigen Organismen, die im größeren Maßstab Lignocellulose abbauen können. Sie sind in der Lage, die für den Abbau von Lignocellulose benötigten Enzyme zu produzieren (Bouws et al., 2008; Fernández-Fueyo et al., 2014b). Laccase-Mediator-Systeme (Munk et al.,

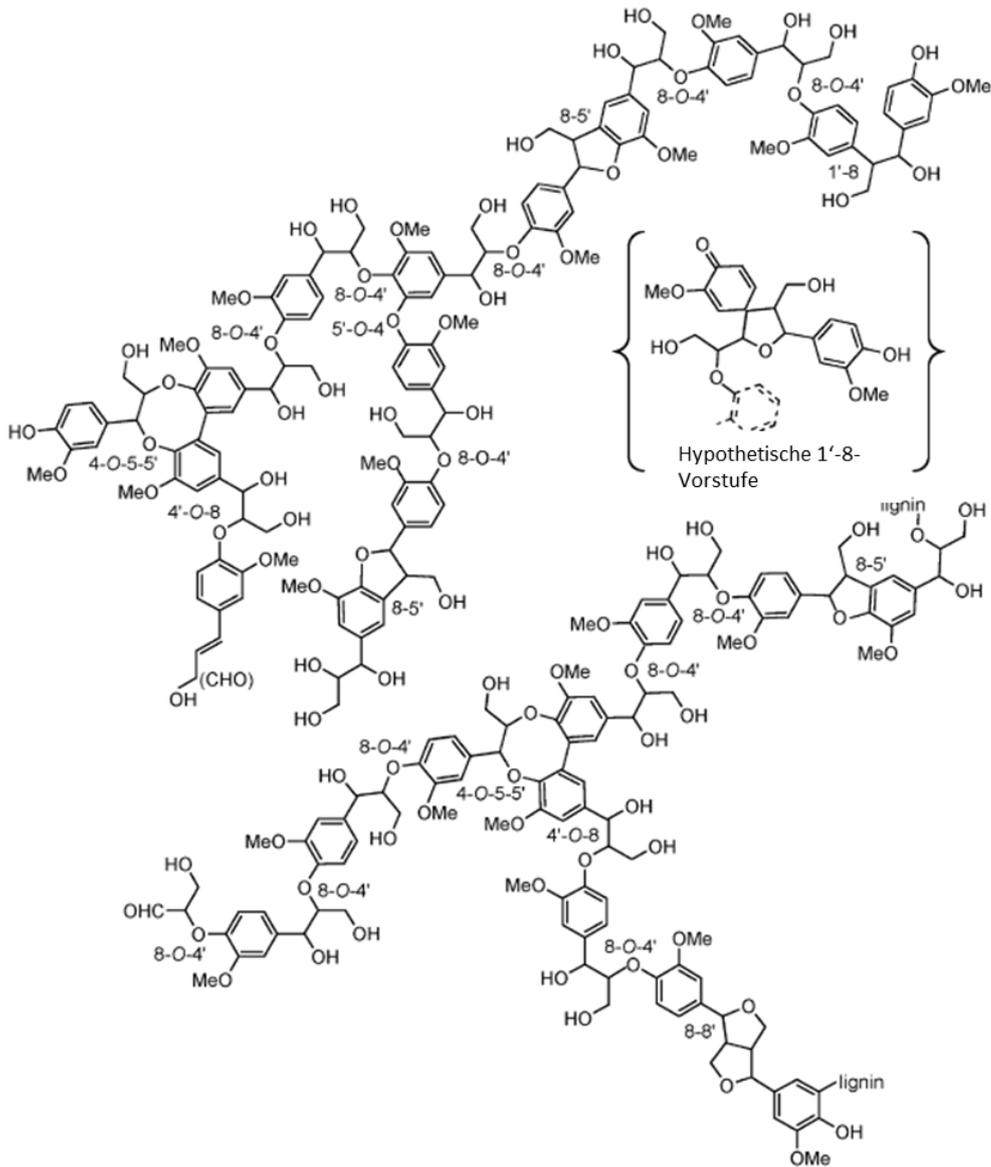


Abbildung 1.4: Ligninstruktur von Gymnospermen, modifiziert nach (Chen und Sarkanen, 2003)

2015) und lignolytische Peroxidasen sind hauptsächlich für den Ligninabbau verantwortlich. Zu den lignolytischen Peroxidasen gehören die Ligninperoxidasen (LiP) (Tien und Kirk, 1984), MnPs (Gold et al., 2000), polyvalente Peroxidasen (VP) (Camarero et al., 1999; Schüttmann et al., 2014) und die DyP-Typ Peroxidasen (Salvachua et al., 2013; Colpa et al., 2014), zu denen auch MsP1 gehört (Liers et al., 2013).

1.2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die Enzymaktivitäten im Sekretom des Basidiomyceten *M. scrodonius* biochemisch charakterisiert werden. Dazu werden Minimalmedien mit Maistroh und den Rückständen einer Biogasanlage als einzige C-Quelle für Submerskulturen

verwendet. Als Summenparameter werden hydrolytische und oxidative Enzymaktivitäten, sowie Protein-, Glucose- und Phenolgehalt über den Kulturverlauf hinweg mittels photometrischer Assays erfasst. Besonderes Augenmerk gilt der von *M. scorodoni* sekretierten Peroxidase MsP1 im Zusammenspiel mit den anderen sekretierten Enzymen.

Das rekombinant hergestellte und kommerziell erhältliche MsP1 (MaxiBright™) soll *in vitro* zum Aufschluss von Lignocellulosen eingesetzt werden, um die Ausbeute bei der Verzuckerung mittels Cellulasen, welche über photometrische Assays nachgewiesen wird, zu steigern. Des Weiteren soll der Abbau von Lignin durch MsP1 mit Hilfe von organosolv Lignin mittels Messung der Partikelgrößenverteilung, HPSEC-DAD und Elektronenmikroskopie untersucht werden.

Ein weiteres Einsatzgebiet von MsP1 ergibt sich in der Lebensmittelbleichung. Hier soll ein 2- bzw. 3-Enzym-System entwickelt werden, welches es erlaubt, gefärbte Moleküle und Milch ohne den direkten Zusatz von H_2O_2 zu entfärben. Dies soll durch die *in situ*-Generierung von H_2O_2 durch die beiden Enzyme Lactase und Glucoseoxidase realisiert werden. Die Färbung soll quantitativ mit einem Reflexionsspektrometer nach CIELab-System gemessen werden.

Die optimalen Bedingungen für einen Einsatz in den verschiedenen Bereichen der weißen Biotechnologie sollen durch kinetische und biophysikalische Untersuchungen an MsP1 definiert werden. Hierfür werden die kinetischen Konstanten und die Toleranz gegenüber H_2O_2 und Lösungsmitteln, sowie die Temperatur-, pH- und Druckstabilitäten untersucht. Die hierzu genutzten Methoden beinhalten unter anderem photometrische Assays, FT-IR- und Fluoreszenzmessungen.

Aufgrund neuer EU-Verordnungen ist die Verwendung aller Lebensmittelenzyme einheitlich geregelt. Die Zulassung erfolgt auch unter der Bedingung, dass die vorgeschlagene Dosis der Lebensmittelenzyme für den Verbraucher gesundheitlich unbedenklich ist (Council of the European Union, 2009). Um die eingesetzte Menge an Enzym zu minimieren, stellt sich die Frage, mit welchen Mediatoren die Aktivität von MsP1 erhöht werden kann. Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung des Enzymverbrauchs und Entfernung des Enzyms nach dem Verarbeitungsprozess stellt die Immobilisierung dar. Hierfür soll MsP1 auf einem festen Träger, hier Kieselgel, immobilisiert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Firma
(+)-Catechin		Fluka (Neu-Ulm)
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS)		Sigma (Taufkirchen)
3,4-Dimethoxybenzylalkohol (Veratrylalkohol)		Sigma
4-Ethylphenol	99 %	Aldrich
Aceton	p.a.	Roth (Karlsruhe)
Acetonitril	HPLC	Roth
Adenosintriphosphat-Natriumsalz		Sigma
Agar Agar Kobe I	reinst	Roth
Albumin Fraktion V	98 %	Roth
Aluminiumsulfat Monohydrat		Roth
Ammoniumnitrat	p.a.	Applichem (Darmstadt)
Ammoniumsulfat	min. 99,5 %	Roth
Annatto (ERKA Typ 140)		Ringe und Kuhlmann (Hamburg)
β,β -Carotin		Sigma
Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (Bis-Tris)	$\geq 98,0$ %	Sigma
Bromphenolblau		Roth
Catalase		Serva
Cellulase GC 220	GC 220	DSM Food Specialties (Delft, NL)
Citronensäure		Roth
Coniferylalkohol	98 %	Sigma
Coomassie Brilliant Blau G250	reinst	Applichem
Coumarsäure	$\geq 98,0$ %	Sigma
D-(+)-Glucose Monohydrat		Roth
Dichlormethan	reinst	Roth
Dinitrosalicylsäure		Sigma
Dithiothreitol (DTT)		Applichem
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	$>99,5$ %	Roth

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Firma
Eisen(III)chlorid Hexahydrat	>99,5 %	Applichem
Essigsäure 100 % (Eisessig)	p.a.	Roth
Ethanol	99,5 % reinst	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)		Sigma
Ethyl-4-hydroxy-3-methoxycinnamat (Ferulasäureethylester)	98 %	Aldrich
Eosin Y Dinatriumsalz	≥ 85 %	Sigma-Aldrich
Folin-Ciocalteu Phenolreagenz		Merck (Darmstadt)
Gallussäure	99 %	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase		Fluka
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>		Sigma-Aldrich
Glutardialdehyd	50 %	Roth
Glycerol	98 %	Roth
Glycin	>99 % p.a.	Roth
Glucoseoxidase		DSM Food Specialties
Gradienten PAGE-Gel (SERVA Gel™ 8-16 %)		Serva
Hefeextrakt		Roth
Hexokinase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Sigma-Aldrich
Hydroxyethylcellulose		Sigma
Kaliumchlorid	p.a.	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	p.a.	Roth
Kaliumhydroxid	>85 %	Roth
Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat (Rochelle Salz)	p.a.	Roth
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	p.a.	Applichem
Laccase aus <i>Trametes versicolor</i>		Sigma
Acid Lactase		DSM Food Specialties
L-Asparagin Monohydrat	reinst	Applichem
Lignin, organosolv		Sigma
Magnesiumsulfat getrocknet	p.a.	Applichem
Mangan(II)sulfat Hydrat	p.a.	Applichem
Methanol		Roth
MsP1		DSM Food Specialties
Natriumacetat Tetrahydrat	p.a.	Applichem
Natriumborhydrid	≥ 96 %	Sigma
Natriumchlorid	99,5 % p.a.	Roth
Natriumcitrat	>99 % p.a.	Roth
Natriumdodecylsulfat		Merck

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Reinheit	Firma
Natriumhydrogencarbonat	p.a.	Roth
Natriumhydroxid	99 %	Roth
Natriumtartrat Dihydrat	p.a.	Applichem
Natronlauge 1 N	Maßlösung	Roth
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat Dinatriumsalz	Biochemica	Roth
<i>o</i> -Phosphorsäure	>85 % p.a.	Roth
PageRuler Unstained Protein Ladder		Fermentas (St. Leon- Rot)
Pectinase aus <i>Aspergillus niger</i>		Sigma-Aldrich
<i>p</i> -Nitrophenylacetat		Sigma
<i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid	≥ 98 %	Sigma-Aldrich
Poly(ethylenglycol) 1000	Mr 950- 1050	Sigma
Roti-Quant		Roth
Salzsäure	37 % reinst	Roth
Schwefelsäure	96 %, p.a.	Roth
Syringol (2,6-Dimethoxyphenol)		Sigma
Trimethoxy[3-(methylamino)propyl]silan	97 %	Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan- hydrochlorid (Tris)		Roth
Wasserstoffperoxid	30 % p.a.	Roth
L-Weinsäure	99,8 %	Roth
Xylan aus Birkenholz		Sigma
Xylose	99 %	Roth
Zinksulfat Heptahydrat	p.a.	Applichem
Für die Methoden wurde, wenn nicht anders angegeben, Reinstwasser (vollentsalzt, spezifischer Widerstand $\rho > 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) eingesetzt.		
<i>Mycetinis scorodonius</i> (<i>Marasmius scorodonius</i>)	137.83	CBS (Utrecht, NL)

Tabelle 2.2: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	LABOKLAV 25 Basic	SHP-Steriltechnik (Magdeburg)
Autoklav	LABOKLAV 160 MSL	SHP-Steriltechnik

Tabelle 2.2: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	INE 500	Memmert (Schwabach)
Eismaschine	AF 80 Scotsman	Frimont (Mailand, I)
Entsalzungssäulen	PD-10 Desalting Columns	GE Healthcare Europe GmbH (Frankfurt)
Fluoreszenzspektrometer	Perkin Elmer LS 55	PerkinElmer Inc. (Waltham, USA)
Fluoreszenzspektrometer	K2-Fluorimeter	ISS Inc. (Champaign, USA)
FPLC-Fraktionssammler	BioLogic BioFrac fraction collector Modell 2128	BioRad (München)
FPLC-System	Biologic-Duo-Flow	BioRad
FT-IR Spektrometer	Nicolet MAGNA 550	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gefriertrocknungsanlage	VaCo 2	Zirbus Technology (Bad Grund)
Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Twin S und M	Peqlab (Erlangen)
Gelfiltrationssäule	Superdex 200 16/600	GE Healthcare Europe GmbH
HPLC- Pumpe (quarternär)	L-7100	Merck-Hitachi (Darmstadt)
HPLC-Anlage	LaChrom	Merck-Hitachi
HPLC-Autosampler	L-7200	Merck-Hitachi
HPLC-Interface	D-7000	Merck-Hitachi
HPSEC-Säule	HEMA-Bio-Säule	Polymer Standard Service (Mainz)
Inkubationsschrank	Multitron 2	Infors HAT (Einsbach)
Kalorimeter	VP DSC Kalorimeter	MicroCal (Northampton, USA)
Kühlblock Thermostat	TK13 und TK 23	HLC Biotech (Bovenden)
Laborbrenner	Fuego SCS basic	WLD-TEC (Arenshausen)
Metallgewebefilter	BMT 22	Haver und Boecker (Oelde)
Mühle	Polymix PX-MFC90D	Kinematica AG (Luzerne, CH)
Partikelmessgerät	Mastersizer S	Malvern Instrument Ltd (Worcestershire, UK)

Tabelle 2.2: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
pH-Meter	SevenEasy S20	Mettler Toledo (Gießen)
Photometer	SPECORD® 50	Analytik Jena (Jena)
Plattenreader	Synergy 2	BioTek (Winooski, USA)
Rasterelektronenmikroskop	EVO LS10	Zeiss (Jena)
Reflektionsspektrometer	Avaspec2048, Reflektionssonde FCR-7xx200-2-ME	Avantes (Landsberg am Lech)
Reinstwassersystem	arium 611VF	Sartorius (Göttingen)
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-210	Büchi (Essen)
Spannungsquelle	EV262	Peqlab
Spektralphotometer	PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS	PerkinElmer Inc
Spektrometer	Nicolet 5700 FT-IR	Thermo Fisher Scientific
Sterile Werkbank	HERAsafe	Heraeus (Osterode)
Ultraschallbad	Transsonic T 710 DH	ELMA (Singen)
Ultra-Turrax	T25 Digital	IKA (Staufen)
Umwälzkühler	Minichiller	Huber (Offenburg)
Vortexer	Reagenzglasschüttler	VWR (Darmstadt)
Waage	ATL6202i	Sartorius
Waage	BD211D	Sartorius
Wasserbad	Aqualine AL 18 Liter	Lauda (Lauda-Königshofen)
Zentrifuge	Allegra X-15R	Beckmann-Coulter (Krefeld)
Zentrifuge	Allegra SX4750A	Beckmann-Coulter

2.2 Kulturführung

2.2.1 Stammhaltung

Der *Mycetinis scorodonius* Stamm (CBS 137.83) wurde in Petrischalen auf Standard-Nähr-Agar (SNL-Agar) (Tab. 2.3) bei 24 °C bis zum vollständigen Bewachsen der Platte kultiviert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Vorkultur

Ein etwa 1 cm² großes, mit *Mycetinis scorodonius* bewachsenes Agarstückchen wurde in einen 250 mL Kulturkolben, welcher 100 mL Standard-Nähr-Medium (SNL) (Tab. 2.5) enthielt, überführt und mittels Ultra-Turrax homogenisiert. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht für 6 Tage.

Tabelle 2.3: SNL-Agar

Hefeextrakt	3 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
Spurenelementlsg. (Tab. 2.4)	1 mL L ⁻¹
D(+)-Glucose Monohydrat	30 g L ⁻¹
L-Asparagin Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Agar-Agar	15 g L ⁻¹
pH	6,0
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

Tabelle 2.4: Spurenelementlösung

FeCl ₃ × 6 H ₂ O ₂	0,08 g L ⁻¹
ZnSO ₄ × 6 H ₂ O ₂	0,09 g L ⁻¹
MnSO ₄ × 6 H ₂ O ₂	0,03 g L ⁻¹
CuSO ₄ × 6 H ₂ O ₂	0,005 g L ⁻¹
EDTA	0,04 g L ⁻¹
vor Gebrauch steril filtriert	

Tabelle 2.5: SNL-Medium

Hefeextrakt	3 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
Spurenelementlsg. (Tab. 2.4)	1 mL L ⁻¹
D(+)-Glucose Monohydrat	30 g L ⁻¹
L-Asparagin Monohydrat	4,5 L ⁻¹
pH	6,0
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.2.3 Submerskultur I

Für die Hauptkultur wurden 225 mL Strohmedium (Tab. 2.6) in einem 500 mL Kulturkolben mit Vorkultur (25 mL) angeimpft. Es wurden hierfür zwei Kulturen mit gewaschenem Stroh (40 g 2x mit 2 L VE-Wasser gewaschen und über 2 Tage im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet) angesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht für 18 Tage. Jeden zweiten Tag wurde 1 mL Probe steril entnommen und die Aktivität (Kapitel 2.3) von Cellulasen, Xylanasen, Laccasen und β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen sowie die Proteinkonzentration gemessen.

Tabelle 2.6: Strohmedium

Hefeextrakt	3 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
Spurenelementlsg.	1 mL L ⁻¹
Stroh	10 g L ⁻¹
pH	6,0
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.2.4 Submerskultur II

Für die Hauptkultur wurden 225 mL Strohmedium (Tab. 2.6) in einem 500 mL Kulturkolben mit homogenisierter Vorkultur (25 mL) angeimpft. Dieses enthielt je eine Strohart: gewaschenes Stroh (g), ungewaschenes Stroh (u) und den Rückständen aus einer Biogasanlage (m). Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte einmal mit mittels Ultraturrax homogenisierter Vorkultur (Proben g0 und u0) und einmal direkt mit unbehandelter Vorkultur (Proben g1 und g2, u1 und u2, m1 und m2). Es wurden je Versuch zwei Kolben angesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 rpm unter Ausschluss von Licht für 18 Tage. In der Kulturdauer von 1 bis 14 Tagen wurden jeden Tag und von Tag 14 bis 18 jeden zweiten Tag Proben entnommen und die Aktivität (Kapitel 2.3) von Laccasen, Peroxidasen, β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen, Mn-Peroxidasen und Esterasen sowie die Phenol-, Protein- und Glucosekonzentration gemessen.

2.3 Enzymaktivitäten

Die Messungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, in Mikrotiterplatten in 50 mmol L⁻¹ Natriumacetatpuffer pH 3,5 bei 30 °C. Der Lichtweg in einer 96er Platte betrug bei 250 μ L Gesamtvolumen 0,8 cm. Die Versuchsansätze wurden im vorgeheizten Plattenreader (Synergy2) für 3 s geschüttelt, dann folgte die Messung für 5 min. Alternativ wurden die Messungen in einem Gesamtvolumen von 1 mL in einer Küvette (Lichtweg 1 cm) im Spektralphotometer (Specord 50), mit Thermostatisierung über ein externes Wasserbad, durchgeführt. Die Enzymprobe wurde so verdünnt, dass die Messung der Kinetik für mindestens 2 min im Fließgleichgewicht erfolgte. Bei den Messungen der Xylanase- und Cellulase-Aktivität wurde mit mehreren Überständen der Pilzkulturen eine Kinetik mit der Extinktion über die Inkubationszeit (5 Messpunkte) aufgezeichnet, um zu bestimmen, bis zu welcher Extinktion und somit Konzentration an reduzierenden Zuckern die Kinetik im Fließgleichgewicht blieb. Für die Messung der Aktivität wurden innerhalb dieser Grenze zwei Inkubationszeiten gewählt. Bei zu hohen Aktivitäten wurde die Inkubationszeit verringert oder die Enzymprobe entsprechend verdünnt. Die Aktivitäten wurden über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Lottspeich, 2012, S. 49) berechnet. 1 U ist die Enzymmenge, die 1 μ mol Substrat pro Minute umsetzt.

$$\text{Aktivität} = \frac{\frac{\Delta E}{t} \cdot V_G \cdot F}{V_P \cdot \epsilon \cdot d} \quad (2.1)$$

V_G	Gesamtvolumen
V_P	Volumen der eingesetzten Probe
d	Lichtweg
ϵ	Extinktionskoeffizient
F	Verdünnungsfaktor
$\frac{\Delta E}{t}$	Steigung

Alle Enzymaktivitäten sowie die Glucose-, Protein-, und Phenolkonzentration wurden in Dreifachbestimmung gemessen.

2.3.1 Cellulaseaktivitäten

Die Cellulaseaktivität wurde über den Nachweis von reduzierenden Zuckern nach Abbau von Hydroxyethylcellulose gemessen (Bailey, 1988). Hydroxyethylcelluloselösung (HEC): 1,0 % Hydroxyethylcellulose wurden in $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ 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.

Dinitrosalicylsäure(DNS)-Stopplösung: 80 g Natriumhydroxid (4 mol L^{-1}) und 112 g Kaliumhydroxid (4 mol L^{-1}) wurden in Reinstwasser gelöst und auf 500 mL aufgefüllt. 5,0 g Dinitrosalicylsäure wurden in 300 mL Reinstwasser bei 50°C gelöst und tropfenweise 50 mL Natrium/Kalium-Hydroxid-Lösung hinzugefügt. Dann 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 drei Monate haltbar.

300 μL Hydroxyethylcelluloselösung wurden mit 100 μL Enzymprobe bei 40°C für 15 min und 30 min inkubiert, anschließend wurden 600 μL DNS-Stopplösung zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 5 min gekocht und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Bei der Enzymnegativkontrolle wurden anstelle der Hydroxyethylcelluloselösung 300 μL Wasser verwendet. Hier wurde die DNS-Stopplösung direkt nach der Enzymzugabe ohne Inkubation zugegeben. Bei der Substratnegativkontrolle wurden anstelle der Enzymprobe 100 μL VE-Wasser verwendet. Die Koch- und Abkühlzeiten müssen exakt eingehalten werden, da die Farbe nicht stabil ist. Die Extinktion der Lösung wurde im Spektralphotometer bei $\lambda = 540 \text{ nm}$ gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit D-Glucose (Standardlösung: 100 mmol L^{-1} D-Glucose in $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ Natriumcitratpuffer, pH 4,8) in einem Konzentrationsbereich von 0 bis $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

2.3.2 Xylanaseaktivität

Die Xylanaseaktivität wurde über den Nachweis von reduzierenden Zuckern nach Abbau von Xylan gemessen (Bailey, 1988). Xylanlösung: 1,0 % Xylan wurden in $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ Natriumcitratpuffer pH 4,8 bei 60°C gelöst und anschließend bis zum Siedepunkt erhitzt. Die Lösung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, aliquotiert und bei -20°C

gelagert. 340 μL Xylan-Lösung wurden mit 60 μL Enzymprobe bei 40 °C für 15 min und 30 min inkubiert, anschließend wurden 600 μL DNS-Stopplösung zugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 5 min gekocht und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Bei der Enzymnegativkontrolle wurden anstelle der Xylanlösung 340 μL Wasser verwendet. Hier wurde die DNS-Lösung direkt nach der Enzymzugabe ohne Inkubation zugegeben. Bei der Substratnegativkontrolle wurden anstelle der Enzymprobe 60 μL Wasser verwendet. Die Koch- und Abkühlzeiten müssen exakt eingehalten werden, da die Farbe nicht stabil ist. Die Extinktion der Lösung wurde im Spektralphotometer bei 540 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit D-Xylose (Standardlösung: 100 mmol L^{-1} D-Xylose in 0,01 mol L^{-1} Natriumcitratpuffer, pH 4,8) in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 2,5 mmol L^{-1} .

2.3.3 Laccaseaktivität

Das Reaktionsgemisch enthielt 10 % (v/v) Enzymprobe und 0,5 mmol L^{-1} 2,2'-Azinodi-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) ($\epsilon = 43,2 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ander und Messner, 1998)) in NaAc-Puffer (50 mmol L^{-1} , pH 3,5). Die ABTS-Lösung wurde kurz vor der Messung zugegeben und die Extinktion bei 420 nm und 30 °C gemessen.

2.3.4 Peroxidaseaktivitäten

Die Peroxidaseaktivitäten wurden über vier verschiedene Substrate nachgewiesen:

ABTS

Das Reaktionsgemisch enthielt 10 % (v/v) Enzymprobe, 0,5 mmol L^{-1} ABTS (Childs und Bardsley, 1975) ($\epsilon = 43,2 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ander und Messner, 1998)) und 0,1 mmol L^{-1} H_2O_2 in NaAc-Puffer (50 mmol L^{-1} , pH 3,5). Die ABTS-Lösung und das H_2O_2 wurden kurz vor der Messung zugegeben und die Extinktion bei 420 nm und 30 °C gemessen. Zur Berechnung der Aktivität wurde die Steigung der Reaktion ohne H_2O_2 (Kapitel 2.3.3) von der Steigung der Reaktion mit H_2O_2 subtrahiert und in Formel 2.1 eingesetzt.

Syringol

Das Reaktionsgemisch enthielt 10 % (v/v) Enzymprobe, 0,1 mmol L^{-1} Syringol ($\epsilon = 27,5 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heinfling et al., 1998)) und 0,1 mmol L^{-1} H_2O_2 in NaAc-Puffer (50 mmol L^{-1} , pH 3,5). Die Syringol-Lösung und das H_2O_2 wurden kurz vor der Messung zugegeben und die Extinktion bei 469 nm und 30 °C gemessen.

Mangan

Das Reaktionsgemisch enthielt 10 % (v/v) Enzymprobe, 0,1 mmol L^{-1} Syringol ($\epsilon = 27,5 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heinfling et al., 1998)), 0,1 mmol L^{-1} MnSO_4 und 0,1 mmol L^{-1} H_2O_2 in NaAc-Puffer (50 mmol L^{-1} , pH 3,5). Die Syringol-Lösung und das H_2O_2 wurden kurz vor der Messung zugegeben und die Extinktion bei 469 nm und 30 °C gemessen. Zur Berechnung der Aktivität wurde die Steigung der Reaktion ohne MnSO_4 (Syringol) von der Steigung der Reaktion mit MnSO_4 subtrahiert und in Formel 2.1 eingesetzt.

β,β -Carotin

β,β -Carotin-Lösung (Ben Aziz et al., 1971): 500 mg Tween 80 mg und 5 mg β,β -Carotin wurden in 15 mL Dichlormethan gelöst und 4 min bei 800 mbar, 40 °C und 150 rpm einrotiert. Anschließend wurden 30 mL Reinstwasser zugefügt; das restliche Dichlormethan wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C, 150 rpm in folgenden 4-Minuten-Schritten entfernt: 800 mbar, 600 mbar, 400 mbar und 200 mbar. Die Lösung wurde filtriert, mit Reinstwasser auf 50 mL aufgefüllt und aliquotiert. Die Lösung war bei 4 °C und unter Lichtausschluss eine Woche haltbar.

Das Reaktionsgemisch enthielt 10 % (v/v) Enzymprobe, 10 % (v/v) β,β -Carotin-Lösung ($\epsilon = 95 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Zorn et al., 2003)) und $0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ in NaAc-Puffer (50 mmol L^{-1} , pH 3,5). Das H_2O_2 wurde kurz vor der Messung zugegeben und die Extinktion bei 450 nm und 30 °C gemessen.

2.3.5 Esteraseaktivität

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

Die Substratstammlösung (35 mmol L^{-1} *p*-Nitrophenylacetat in Ethanol) ist instabil und wurde kurz vor dem Einsatz 1:30 in 80 mmol L^{-1} Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5 verdünnt. Das Reaktionsgemisch enthielt $100 \mu\text{L}$ Enzymprobe und $150 \mu\text{L}$ der *p*-Nitrophenylacetatverdünnung. Die *p*-Nitrophenylacetatverdünnung wurde kurz vor der Messung zugegeben und die Extinktion bei 405 nm (*p*-Nitrophenol: $\epsilon = 18,3 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und 30 °C gemessen.

2.4 Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (Bradford, 1976) mit dem Reagenz Roti-Quant™ der Firma Roth durchgeführt. 90 % (v/v) Bradford-Reagenz wurden mit 10 % (v/v) Probe versetzt. Die Negativkontrolle beinhaltete statt Probe Wasser. Das Proben-gemisch wurde 7 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 450 nm und 590 nm gemessen. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve mit $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ bis 120 mg L^{-1} BSA gegen den Quotienten E_{590}/E_{450} aufgenommen.

2.5 Glucosekonzentration

Substratlösung (20x): $12,7 \text{ mmol L}^{-1}$ NADPH, $12,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ATP, 30 mmol L^{-1} MgSO_4 in 1 mol L^{-1} Trispuffer pH 7,6

Enzymlösung (20x): Hexokinase 50 U mL^{-1} , G-6-P-Dehydrogenase 50 U mL^{-1} in $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ Trispuffer pH 7,6

$500 \mu\text{L}$ der zu messenden Probe wurden gekocht. Es wurde ein Volumen an Probe benutzt, welches bei vollständigem Umsatz eine Extinktion von 0,2 bis 1 entsprach. Es wurden $50 \mu\text{L}$ Substrat-Lösung zugegeben und auf $950 \mu\text{L}$ mit Wasser aufgefüllt. Die Extinktion wurde bei 340 nm gemessen, dann wurden $50 \mu\text{L}$ Enzym-Lösung zugegeben. Nach vollständigem Ablauf der Reaktion (15 min) wurde die Extinktion nochmals

bei 340 nm gemessen. Aus der Differenz der beiden Extinktionen wurde die Glucosekonzentration als NADPH-Äquivalente ($\epsilon = 6,3 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nach Lambert-Beer (Lottspeich, 2012, S. 49) berechnet.

2.6 Phenolkonzentration

50 μL Probe wurden mit 50 μL 80 mmol L^{-1} Kalium-Phosphat-Puffer, pH 6,5 und anschließend mit 65 μL Folin-Ciocalteu-Reagenz (1:4 verdünnt) versetzt und für 3 min inkubiert. Dann wurden 90 μL einer Na_2CO_3 -Lösung (3:4 Verdünnung der gesättigten Lösung) zugegeben. Nach 1 h Inkubation wurde die Extinktion bei 725 nm und 30 °C gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit Gallussäure (1 $\mu\text{g L}^{-1}$ bis 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Gutfinger, 1981).

2.7 Lignin- und Strohabbau

2.7.1 Inkubation von organosolv Lignin mit MsP1

2 g organosolv Lignin wurden in 250 mL Erlenmeyer-Kolben in 100 mL Ligninpuffer (30 % Ethanol, 70 % 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer pH 3,5) suspendiert. Die eingesetzte MsP1-Lösung hatte eine Aktivität von 500 U_{ABTS} mL⁻¹. MsP1 wurde in aktiver bzw. inaktiver Form (bei 99 °C, 24 h inaktiviert) zugesetzt (Tab. 2.7) und im Schüttler (30 °C, 110 rpm) inkubiert. Zum Start der Inkubation wurde in allen Proben die H₂O₂ Konzentration auf 1 mmol L⁻¹ gesetzt. Der Verbrauch wurde fortwährend mit Peroxidnachweisstäbchen (Merck) kontrolliert. Nach vollständigem Verbrauch wurde die Konzentration von H₂O₂ wieder auf 1 mmol L⁻¹ gesetzt. Innerhalb der Inkubation wurden jeweils 7 Proben a 2 mL (0 h, 7 h, 23 h, 29 h, 46 h, 6,5 d, 10 d) entnommen. In diesen wurde die Reaktion durch die Zugabe von 100 µL 0,5 mmol L⁻¹ EDTA gestoppt.

Tabelle 2.7: Probenbezeichnung und eingesetzte MsP1-Aktivität

Probennummer	Aktivität / U _{ABTS}
1	0 (keine Zugabe von MsP1)
2	0 (inaktiv)
3	1000
4	250
5	62,5

2.7.2 Partikelgrößenbestimmung von mit MsP1 behandeltem Lignin

Die Partikelgrößen in den Proben (Tab. 2.7) wurden mit dem *Mastersizer S* bestimmt. Die Proben wurden in destilliertem Wasser dispergiert und durch eine Strömungszelle geleitet. Jede Probe wurde dreifach gemessen. Als mathematisches Modell für die Berechnung der Partikelgröße wurde die Mie-Theorie (Mie, 1908) herangezogen. Die erhaltenen Daten gaben die Partikelgrößenverteilung als prozentualen Anteil am Gesamtvolumen an.

2.7.3 Analytik der Molekulargewichte der entstandenen gelösten Ligninmoleküle mittels HPSEC

Es wurde eine lineare HEMA-Bio-Säule verwendet. Die Ligninabbauprodukte wurden über die Extinktion bei 280 nm photometrisch verfolgt. Das Injektionsvolumen betrug 10 µL. Als mobile Phase wurde unter isokratischen Bedingungen 80 % Acetonitril / 20 % Reinstwasser benutzt. Die Flussrate betrug 1 mL min⁻¹. Die Säule wurde mit Natriumpolystyrolsulfonaten (1.100 g mol⁻¹–66.600 g mol⁻¹), (+)-Catechin (290,27 g mol⁻¹), Ferulasäureethylester (222,24 g mol⁻¹), Veratrylalkohol (168,19 g mol⁻¹) und Coniferylalkohol (180,2 g mol⁻¹) als Molekulargewichtsstandards kalibriert. Eine Linearität

bestand im Bereich zwischen $63.900 \text{ g mol}^{-1}$ und $242,3 \text{ g mol}^{-1}$. Nach der Auftragung des dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte in g mol^{-1} gegen die Retentionszeit in Minuten ergab sich folgende Kalibrationsgerade:

$$y = (-2,908 \pm 0,081)x + (21,885 \pm 0,515) \quad (2.2)$$

2.7.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung von mit MsP1 behandeltem Lignin

Organosolv Lignin (Tab. 2.8) wurde in vier 250 mL Erlenmeyer-Kolben in 100 mL Ligninpuffer (30 % Ethanol, 70 % 50 mmol L^{-1} NaAc-Puffer pH 3,5) suspendiert. 1 mL MsP1-Lösung je zwei Mal aktiv ($500 \text{ U}_{ABTS} \text{ ml}^{-1}$) und inaktiv (bei 99°C , 24 h inaktiviert) wurden zugesetzt und für 4 Tage im Schüttler (24°C , 150 rpm) inkubiert. Zum Start der Inkubation wurde in allen Proben die H_2O_2 -Konzentration auf $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ gesetzt. Der Verbrauch wurde fortwährend mit Peroxidnachweisstäbchen kontrolliert. Nach vollständigem Verbrauch wurde die Konzentration von H_2O_2 wieder auf $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ mit einer H_2O_2 -Stammlösung ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$) gesetzt. Die Menge an verbrauchtem bzw. zugegebenem H_2O_2 betrug bei den inaktiven Proben $250 \mu\text{mol}$ und bei den aktiven Proben $1,15 \text{ mmol}$. Nach der Inkubation wurden die Suspensionen jeweils über ein Metallgewebefilter BMT 22, mit einer absoluten Filterfeinheit von $20 \mu\text{m}$ bis $22 \mu\text{m}$, filtriert. Bilder der Ligninpartikel wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop (EVO LS10) aufgenommen. Im Hochvakuum wurden die Proben mit Gold beschichtet. Die Bilder wurden im Flüssigmodus und im Niedrigvakuum aufgenommen.

Tabelle 2.8: Lignineinwaagen für die Inkubation mit MsP1 zur Aufnahme von SEM-Bildern

Probe	Einwaage / g
1_{inaktiv}	1,0172
2_{inaktiv}	0,9723
1_{aktiv}	0,9756
2_{aktiv}	0,9817

2.7.5 Inhibierung der Cellulase GC220

Inhibierung durch Glucose

Maisstroh wurde in $1,6 \text{ mL } 50 \text{ mmol L}^{-1}$ NaAc-Puffer pH 3,5 suspendiert und mit $50 \mu\text{L}$ Cellulase GC220 ($0,7 \text{ U L}^{-1}$) versetzt. In den Ansätzen 1a und 1b wurde zusätzlich eine Konzentration von $2,085 \text{ g L}^{-1}$ Glucose eingestellt. Das so behandelte Stroh wurde über Nacht bei 40°C und 1400 rpm im Thermomixer inkubiert. Dann wurde das Stroh bei 21.920 g für 30 min abzentrifugiert und die Glucosekonzentration (Kapitel 2.5) im Überstand bestimmt. Es wurde eine Doppelbestimmung (a,b) durchgeführt.

Tabelle 2.9: Stroheinwaagen für die Reaktion mit Cellulase mit und ohne zusätzliche Glucose

Probe	Einwaage / mg
1a	12,04
1b	12,77
2a	12,11
2b	12,63

Inhibierung durch H₂O₂

Die Aktivität der Cellulase GC 220 wurde in 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5 bei 50 °C mittels Cellulaseassay (Kapitel 2.3.1) bestimmt. In einem von zwei Ansätzen wurde eine Konzentration von 0,8 mmol L⁻¹ H₂O₂ eingestellt. Eingesetzt wurden 40 µL einer verdünnten (1:2.400) GC 220 Lösung. Bei Inkubationszeiten von 4 min, 9 min, 14 min und 20 min wurde die Konzentration reduzierender Zucker (Kapitel 2.3.1) bestimmt.

2.7.6 Strohverdau

Optimierung der Strohkonzentration

25 bis 1.000 mg trockenes Stroh wurden in 15 mL Reaktionsgefäßen eingewogen. Zu allen Ansätzen wurden 10 mL 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5 zugegeben. Dann wurden 100 µL GC220 mit 0,7 U L⁻¹ zugefügt und bei 30 °C inkubiert. Nach 22 h wurden 4 mL entnommen. 7 mL frischer Puffer und 40 µL GC 220 wurden wieder zugegeben. Zum Zeitpunkt 0 h, 3,5 h, 22 h, 48 h und 5 d wurden Proben entnommen und die Konzentration an Glucose (Kapitel 2.5) ermittelt.

Kinetik von MsP1 mit Maisstroh/H₂O₂ als Substrat

24,02 mg, 45,81 mg und 78,92 mg Stroh wurden in einem 15 mL Reaktionsgefäß eingewogen und mit 5 mL 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5 überschichtet. Eine Konzentration von 2 mmol L⁻¹ H₂O₂ wurde eingestellt und 7 U MsP1 wurden zugegeben. Zum Zeitpunkt vor der Zugabe von MsP1 sowie nach 3,5 min, 40 min und 155 min, wurde die Konzentration von H₂O₂ gemessen. Hierzu wurden 50 µL der Proben entnommen und gegebenenfalls verdünnt.

Messung der H₂O₂-Konzentration 100 µL Probe wurden mit 100 µL ABTS (5 mmol L⁻¹) und 1 U MsP1 versetzt und auf 1 mL mit 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5 aufgefüllt. Die Extinktion von ABTS ($\epsilon = 43,2 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) nach vollständigem Verbrauch von H₂O₂, wurde bei 420 nm gemessen. Die Konzentration von H₂O₂ wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Lottspeich, 2012, S. 49) berechnet.

Saccharifizierung

Cellulase/Pectinase 1,5 g Maisstroh wurden 1 h in 250 mL Wasser gequollen und 2 min bei 700 W in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Anschließend wurde mit 250 ml Wasser gewaschen. Die Saccharifizierung des Maisstrohs wurde in 1 mL 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5 durchgeführt. Die jeweilige Einwaage vom Maisstroh ist Tab. 2.10 zu entnehmen. Als Enzym zum Ligninabbau wurden 60 µL MsP1 (314 U mL⁻¹) eingesetzt. In den aktiven Proben (A) wurde eine Konzentration von 2 mmol L⁻¹ H₂O₂ eingestellt und 3 Mal nachjustiert. In den Negativkontrollen (B) befand sich kein H₂O₂. Inkubiert wurde bei 40 °C für 17 h. Danach wurden nochmals 100 µL MsP1 zugegeben, die Konzentration von H₂O₂ auf 2 mmol L⁻¹ eingestellt und für weitere 24 h inkubiert. Nach der Inkubation mit MsP1 wurde in jede Probe 2 µL Catalase zugegeben, um noch restliches H₂O₂ zu verbrauchen. Das Stroh wurde mit 2 mL des Inkubationspuffers 2 Mal gewaschen. Zu dem Stroh in 1 mL 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5 wurden zum Verdau der Kohlenhydrate 40 µL (6 U mL⁻¹) Cellulase GC220 und 20 µL (609 U mL⁻¹) Pectinase zugegeben. Inkubiert wurde bei 50 °C für weitere 16 h. Das Stroh wurde bei 21.920 g für 30 min abzentrifugiert und die Glucosekonzentration (Kapitel 2.5) im Überstand gemessen.

Tabelle 2.10: Stroheinwaagen für den Strohabbau mittels MsP1/Cellulase/Pectinase

Probe	Einwaage / mg
A ₁	57,77
A ₂	57,56
B ₁	57,89
B ₂	57,58

Cellulase/Xylanase Da die Cellulase durch Glucose gehemmt wird, wurde der Strohabbau in zwei Schritten durchgeführt. Nach jedem Schritt wurde das Stroh gewaschen. Die eingesetzte Menge Stroh ist in Tabelle 2.11 aufgelistet.

Tabelle 2.11: Stroheinwaagen für den Strohabbau mittels MsP1/Cellulase/Xylanase

Probe	Einwaage / mg
A ₁	13,2 mg
A ₂	12,8 mg
B ₁	11,9 mg
B ₂	13,42 mg

Das Stroh wurde mit 1,5 mL Wasser gewaschen, 30 min bei 21.000 g zentrifugiert, 1 mL des Überstandes wurden entnommen und das Stroh nochmals mit 700 µL Wasser gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden 700 µL entnommen. Anschließend wurden 1 mL 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5 und 20 µL MsP1 (314 U mL⁻¹)

zugegeben und für 17 h mit einem Verbrauch von 560 nmol H_2O_2 (A) inkubiert. Zu den Negativkontrollen (B) wurde kein H_2O_2 zugesetzt. Nach der Inkubation wurde das Stroh abzentrifugiert (30 min, 21.920 g). 1 mL vom Überstand wurde entnommen und das Stroh wurde mit 1 mL Wasser gewaschen. Zu dem gewaschenen Stroh wurden 1 mL 50 mmol L^{-1} NaAc-Puffer, pH 3,5 und 50 μL Cellulase GC220 (700 U mL^{-1}) zugegeben. Nach 16 h Inkubation wurde die Glucosekonzentration (Kapitel 2.5) bestimmt. Der Ansatz wurde wie oben beschrieben zentrifugiert und gewaschen. Dann erfolgte eine Zugabe von 20 μL Xylanase (2.500 U mL^{-1}) und 20 μL Cellulase GC 220 (700 U mL^{-1}). Nach 40 h Inkubation wurde das Stroh bei 21.920 g für 30 min abzentrifugiert und die Glucosekonzentration (Kapitel 2.5) im Überstand bestimmt. Die Experimente wurden in Doppelbestimmung (1, 2) durchgeführt.

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Temperatur- und Druckabhängigkeiten von MsP1

FT-IR-Messungen

Das rekombinante MsP1 wurde für die temperatur- und druckabhängigen Messungen gereinigt (Scheibner et al., 2008). 1 mL der gereinigten MsP1-Lösung (für die temperaturabhängigen Messungen in 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 und für die druckabhängigen Messungen in 30 mmol L⁻¹ Bis-Tris-Puffer, pH 5,8) wurde über Nacht lyophilisiert und anschließend in 200 μ L D₂O resuspendiert. Die resultierende Proteinkonzentration betrug 2.1 % (w/v) bzw. 4 % (w/v). Die Proteinkonzentration wurde über UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt.

Die temperaturabhängige Messung von 10 °C bis 80 °C bei Normaldruck im Nicolet 5700 FT-IR Spektrometer wurde in einer temperierbaren Zelle mit CaF₂-Fenstern und 50 μ m dicken Mylar-Abstandhaltern durchgeführt, wobei das Probenvolumen 20 μ L betrug. Die Detektion erfolgte über einen integrierten, mit Flüssigstickstoff gekühlten MCT Detektor (HgCdTe). Thermostatisierung wurde über ein externes Wasserbad erreicht ($\Delta T = \pm 0,2$ °C). Es wurde in Temperaturintervallen von 5 °C mit einer Temperaturvorhaltezeit von je 15 min gemessen. Während der Messung wurde die Messzelle fortwährend mit trockener Luft gespült. Die Aufnahme der Spektren erfolgte zwischen 4.000 cm⁻¹ und 1.100 cm⁻¹, für jeden Punkt (Auflösung: 2 cm⁻²) wurde die Apodisation über die Happ-Genzel-Funktion realisiert. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden 256 Spektren pro Messung aufsummiert.

Die druckabhängigen Messungen wurden bei 30 °C und 60 °C in dem Nicolet MAGNA 550 FT-IR Spektrometer durchgeführt. Beide Hochdruckmessungen erfolgten in einer Diamantstempelzelle (*High Pressure Diamond Optics P-Serie*) mit Typ IIa-Diamanten, wobei ein 50 μ m durchmessender Stahlabstandhalter mit einer 0,45 mm Bohrung zwischen den Diamanten platziert wurde. Das Endvolumen in der geschlossenen Zelle betrug ca. 10 nL. Zur Druckbestimmung wurde kristallines BaSO₄ coappliziert und der Druck anhand der linearen Verschiebung der Sulfat-Streckschwingung bei ca. 983 cm⁻¹ (Genauigkeit: ± 300 bar (Wong und Moffat, 1989)) bestimmt. Die Thermostatisierung wurde mit einem externen Wasserbad ($\Delta T = \pm 0,5$ °C) durchgeführt. Die übrigen Parameter entsprachen denen der temperaturabhängigen Messung. Zur Registrierung aller Spektren und zur Dekonvolution der Amid-I'-Bande wurde GRAMS 8.0 Software genutzt. Die Signaldekonvolution der Amid-I'-Bande erfolgte nach vorheriger Subtraktion des temperaturkorrespondierenden D₂O-Spektrums, spektrales Rauschen und ggf. Glättung wurden mit Hilfe des Programms GRAMS 8.0 bearbeitet. Zur Dekonvolution wurde eine Voigt-Funktion verwendet und die Signalpositionen mittels der 2. Ableitung des Spektrums eingegrenzt. Alle Spektren wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf eine Gesamtfläche von 1 im Amid-I'-Bereich normiert. Die Zuordnung der Banden zu Sekundärstrukturelementen erfolgte auf Basis der Literatur (Barth, 2007).

Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Messung der dynamischen Differenzkalorimetrie wurde in Doppelbestimmungen mit einer 0,19 %igen (w/v) MsP1-Lösung in 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 im VP DSC Kalorimeter durchgeführt. Für die Messung wurden 0,5 mL MsP1-Lösung eingesetzt, als Referenz diente eine proteinfreie Pufferlösung. Der Differentialwärmefluss wurde zwischen 10 °C und 100 °C mit einer Aufheizrate von 40 °C h⁻¹ aufgenommen. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm ORIGIN 7.

Fluoreszenzspektroskopie

Für die temperaturabhängige Fluoreszenzspektroskopie wurde das Fluoreszenzspektrometer LS 55 und für die druckabhängige Fluoreszenzspektroskopie das K2-Fluorimeter genutzt. Für die temperaturabhängigen Messungen wurde eine 3 mm Quarzküvette eingesetzt und mit 300 µL MsP1-Lösung in 50 mmol L⁻¹ Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 gefüllt. Die Thermostatisierung wurde mittels eines externen Wasserbades ($\Delta T = \pm 0,5\text{ °C}$) durchgeführt. Die MsP1-Lösung wurde vor jeder Messung bei der jeweiligen Messtemperatur für 5 min äquilibriert, die Spektren wurden alle 5 °C aufgenommen.

Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm, die Intensität der Emission wurde zwischen 307 nm und 400 nm gemessen. Für die druckabhängigen Messungen bei 30 °C wurde eine spezielle Hochdruckzelle aus Kupfer-Beryllium-Legierung mit Ethanol als Druckmedium eingesetzt. 1 mL einer 1,3 mg mL⁻¹ MsP1-Lösung in 30 mmol L⁻¹ Bis-Tris-Puffer, pH 5,8 wurde in ein druckstabiles Quarzfläschchen gefüllt, welches dicht mit einer hitze- und lösemittelbeständigen Laborfolie verschlossen wurde. Der Druck wurde über ein externes Manometer (Genauigkeit: ± 10 bar) generiert. Die MsP1-Lösung wurde vor jeder Messung bei dem jeweiligen Messdruck für 5 min äquilibriert, die Spektren wurden alle 100 bis 2.200 bar aufgenommen. Nach Abzug des Pufferhintergrunds wurden die Änderungen des Spektrums über die Berechnung des spektralen Schwerpunktes bestimmt (Silva et al., 1986).

Temperatur- und Druckabhängigkeit der MsP1-Aktivität

Die temperaturabhängigen Aktivitätsbestimmungen erfolgten im PerkinElmer Lambda 25 UV/VIS Spektralphotometer. Die Thermostatisierung wurde mit einem externen Wasserbad ($\Delta T = \pm 1,5\text{ °C}$) durchgeführt. Die Aktivität wurde mittels ABTS-Assay (Kapitel 2.3.4 ABTS) bestimmt. Die Reaktionslösung beinhaltete 700 µL 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5, 100 µL 5 mmol L⁻¹ ABTS, 100 µL MsP1-Lösung (10 mU_{ABTS}, 30 °C, pH 5,8) und 100 µL 20 mmol L⁻¹ H₂O₂. Die Extinktion wurde bei 420 nm von 30 °C bis 70 °C in 5 °C Schritten aufgenommen. Die Aktivität wurde über 360 s im Fließgleichgewicht gemessen.

Die druckabhängigen Aktivitätsbestimmungen wurden im K2-Fluorimeter, welches Absorptionsspektren aufnahm, durchgeführt (Kapitel 2.8.1 Fluoreszenzspektroskopie). Für den ABTS-Assay wurden 1,06 mL der Reaktionslösung (930 µL 33 mmol L⁻¹ Bis-Tris-Puffer, pH 5,8, 50 µL 5 mmol L⁻¹ ABTS, 30 µL MsP1-Lösung (3 mU_{ABTS}, 30 °C, pH 5,8) und 50 µL 20 mmol L⁻¹ H₂O₂) und für den β,β -Carotin-Assay 1,06 mL der Reaktionslösung (820 µL 33 mmol L⁻¹ Bis-Tris-Puffer, pH 5,8, 150 µL β,β -Carotin-Lösung

(Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin), 50 μL MsP1-Lösung ($0,5 \text{ mU}_{\text{Carotin}}$, 30°C , $\text{pH } 5,8$) und 50 μL $20 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$) in ein druckstabiles, dicht verschlossenes Quarzfläschchen gefüllt. Die Extinktionen wurden bei 30°C und unterschiedlichem Druck in einem Bereich von 1 bis 2.500 bar bei 450 nm für 1.000 s mit β,β -Carotin und bei 420 nm für 600 s mit ABTS gemessen.

2.8.2 pH-Optimum

Die Aktivität wurde mittels β,β -Carotin-Assay (Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin) bei verschiedenen pH-Werten in einem Endvolumen von 1 mL im Spektralphotometer Specord 50 gemessen. Verwendet wurden die beiden Puffer $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ Glycin/HCl mit den pH-Werten von 2,2; 2,6; 2,7; 2,8; 3,0; 3,5 und $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ NaAc-Puffer mit den pH-Werten von 3,5 und 4,5. 100 μL der MsP1-Fraktion F29 aus der Größenausschlusschromatographie (Kapitel 3.3.7 SEC) wurden in einer Verdünnung von 1:20 im Assay verwendet. Die Kinetik wurde über 5 min im Fließgleichgewicht aufgenommen.

2.8.3 Lösungsmitteltoleranz

Zur Messung der Lösungsmitteltoleranz wurde der ABTS-Assay (Kapitel 2.3.4 ABTS) modifiziert. Die Kinetiken wurden im Plattenreader Synergy 2 verfolgt. Als Puffer wurde 50 mmol L^{-1} NaAc-Puffer, $\text{pH } 3,5$ eingesetzt, für eine Versuchsreihe wurden noch 1,2 % Polyethylenglycol (PEG 1000) zugesetzt. Der eingesetzte Puffer enthielt je nach Ansatz 10, 25 oder 50 % organisches Lösungsmittel. Als Lösungsmittel wurden Dioxan, Aceton und Ethanol benutzt. Die Messungen erfolgten jeweils in Dreifachbestimmungen.

2.8.4 Stabilität von MsP1 in Lösungsmitteln

MsP1 wurde in 25 %igem Lösungsmittel in Wasser (Dioxan, Aceton und Ethanol) über 4 Tage bei 40°C inkubiert. Die Aktivität wurde mittels ABTS-Assay (Kapitel 2.3.4 ABTS) jeden Tag gemessen. Die Kinetiken wurden im Plattenreader Synergy 2 verfolgt. Es wurden je zwei Ansätze hergestellt und die Aktivität wurde in Dreifachbestimmung gemessen.

2.8.5 H_2O_2 -Toleranz von MsP1

Einfluss von H_2O_2 auf die MsP1-Aktivität

Die Kinetiken von MsP1 wurden mittels ABTS-Assay (Kapitel 2.3.4 ABTS) mit $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ABTS und verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen ($0,125 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, 1 mmol L^{-1} , 2 mmol L^{-1} , 5 mmol L^{-1}) aufgenommen. Es wurden eine 5 mmol L^{-1} ABTS-Lösung und eine 10 mmol L^{-1} H_2O_2 -Lösung verwendet. Die Kinetiken wurden über 5 min im Fließgleichgewicht im Plattenreader Synergy 2 bei 30°C verfolgt. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmungen.

Einfluss von H_2O_2 auf Michaelis-Menten-Kinetiken

Michaelis-Menten-Kinetiken wurden mit verschiedenen ABTS-Konzentrationen zu verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen ($0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$,

1,2 mmol L⁻¹, 2 mmol L⁻¹) mittels ABTS-Assay (Kapitel 2.3.4 ABTS) gemessen. Die Messungen wurden in einem Konzentrationsbereich für ABTS von 0,05 mmol L⁻¹ bis 0,2 mmol L⁻¹ durchgeführt. Die Kinetiken wurden im Fließgleichgewicht im Plattenreader Synergy 2 bei 30 °C verfolgt. Es wurden Dreifachbestimmungen vorgenommen.

2.8.6 Proteinreinigung von MsP1 zur Bestimmung der kinetischen Konstanten

Ammoniumsulfat-Fällung

In 1 mL MsP1-Lösung wurde eine 45 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung eingestellt. Die Lösung wurde für 10 min bei 20 °C gerührt und anschließend für 30 min bei 10.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen. Das Sediment wurde in 1,5 mL Wasser aufgenommen, konnte jedoch nicht wieder vollständig gelöst werden (Probe 45S). Im Überstand wurde eine 70 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung eingestellt, die Lösung wurde für 10 min bei 20 °C gerührt und anschließend für 30 min bei 10.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen (70Ü). Das Sediment (70S), welches MsP1 enthielt, wurde in 1 mL Wasser aufgenommen und mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Eine SDS-PAGE (Kapitel 2.8.7) auf einem Gradienten-Gel erfolgte für alle in der Fällung entstandenen Proben.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Auf eine HiLoad 16/600 Superdex 200 Säule wurde 1 mL MsP1-Lösung (70S) (Kapitel 2.8.6 Ammoniumsulfat-Fällung) aufgetragen. Mit einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ wurde mit einem 50 mmol L⁻¹ NaAc-Puffer pH 4,5 eluiert. Die Extinktion der aufgefundenen Fraktionen (1,5 mL) wurde bei 280 nm detektiert. Bei den Fraktionen mit einer Extinktion $\geq 0,1$ wurde die Aktivität mittels β,β -Carotin-Assay (Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin) bestimmt. Hierfür wurden die Proben ggf. verdünnt, um im Fließgleichgewicht der Kinetik messen zu können. Die H₂O₂-Konzentration betrug im Assay 1 mmol L⁻¹.

2.8.7 Gradienten SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der „PageRuler“ *Unstained Protein Ladder* verwendet. Als Gel wurde ein Polyacrylamidgel mit einem Acrylamidgradienten von 8 % bis 16 % (SERVAGETM) verwendet. Die Proben wurden mit dem Probenauftragspuffer (Tab. 2.12) versetzt und für 10 min gekocht. Die Elektrophorese wurde in dem SDS-Elektrophoreselaufpuffer (Tab. 2.13) bei einer Konstantspannung von 70 V im Sammelgel und 120 V während der Trennung im Trenngel durchgeführt.

Für die Färbung wurden die Gele zweimal für zehn Minuten in Reinstwasser gewaschen und anschließend für mindestens drei Stunden in Coomassie Brilliant Blau (CBB)-Färbelösung (Tab. 2.14) gefärbt. Anschließend wurden die Gele mehrmals in Reinstwasser gewaschen und in CBB-Entfärbelösung (Tab. 2.15) entfärbt.

Tabelle 2.12: SDS-PAGE-Probenauftragspuffer (5 fach konzentriert)

	Endkonzentration	Menge
TRIS/HCl Puffer pH 6,8; 0,5 mol L ⁻¹	0,25 mol L ⁻¹	5 mL
SDS-Stammlösung	5 % (v/v)	2,5 mL
Glycerol	20 % (v/v)	2 mL
Bromphenolblau	0,5 % (w/v)	50 mg

Der Probenauftragspuffer wurde in 900 μL Aliquots bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und gelagert; vor Gebrauch wurden zu jedem Aliquot 100 μL einer 1 mol L⁻¹ DTT-Lösung zugefügt.

Tabelle 2.13: SDS-Elektrophoreselaufpuffer

	Endkonzentration	Menge
TRIS	250 mmol L ⁻¹	30,2 g
Glycin	1,92 mol L ⁻¹	144,2 g
SDS	1 % (w/v)	10 g
Reinstwasser		ad 1.000 mL

Der SDS-Elektrophoreselaufpuffer wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zum Gebrauch wurden 100 mL der Lösung mit Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt.

Tabelle 2.14: CBB-Färbelösung für Polyacrylamidgele

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

Tabelle 2.15: CBB-Entfärbelösung für Polyacrylamidgele

	Endkonzentration	Menge
Reinstwasser		440 mL
Ethanol (96%)	10 % (v/v)	50 mL
<i>o</i> -Phosphorsäure (100%)	2 % (v/v)	10 mL

2.8.8 Bestimmung der Reinheitszahl

In den Fraktionen der Proteinreinigung (Kapitel 2.8.6) wurden Absorptions-Spektren von 250 nm bis 450 nm aufgenommen und die Reinheitszahl bestimmt (Theorell und Maehly, 1950).

2.8.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Kapitel 2.4) wurde eine Kalibrierreihe mit ausgefälltem (Kapitel 2.8.6 Ammoniumsulfat-Fällung), entsalztem (PD-10 Desalting Column) und gefriergetrocknetem MsP1 durchgeführt. Die Entsalzung wurde nach Herstellerangaben (GE Healthcare) mit dem Schwerkraftprotokoll durchgeführt. Für die Kalibrierreihe wurden zwei Stammlösungen mit einer Konzentration von $5,5 \text{ mg mL}^{-1}$ bzw. $10,9 \text{ mg mL}^{-1}$ hergestellt. Beide Stammlösungen wurden für die Kalibrierreihe so verdünnt, dass die Extinktion im linear abhängigen Bereich der Kalibration gemessen werden konnte.

2.8.10 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die Kinetiken wurden für MsP1 aus Fraktion 28 (Abb. 3.54) im 50 mmol L^{-1} NaAc-Puffer pH 3,5 und bei 30°C durchgeführt. Für die Bestimmung mit β,β -Carotin (Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin) wurde eine 1:20 Verdünnung der Fraktion 28 mit Proteinkonzentrationen von I: $0,039 \mu\text{mol L}^{-1}$ und II: $0,038 \mu\text{mol L}^{-1}$ und für ABTS (Kapitel 2.3.4 ABTS) wurde eine 1:1.000 Verdünnung mit Proteinkonzentrationen von I: $0,78 \text{ nmol L}^{-1}$ und II: $0,75 \text{ nmol L}^{-1}$ genutzt. Die Kinetik wurde für $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ bis $255 \mu\text{mol L}^{-1}$ ABTS und $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ bis $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ β,β -Carotin aufgenommen. Es wurden 2 Verdünnungen hergestellt und die Messungen erfolgten jeweils in Dreifachbestimmungen. Die Kinetiken wurden im Fließgleichgewicht im Spektralphotometer (Specord 50) bei 30°C verfolgt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SciDAVis.

2.9 Mediatoren

Zwei MsP1-Lösungen wurden für die folgenden Messungen genutzt. Eine unbehandelte, nicht gereinigte Lösung und eine zuvor durch Fällung (Kapitel 2.8.6 Ammoniumsulfat-Fällung) gereinigte und entsalzte (PD-10 Desalting Column) MsP1-Lösung. Die Entsalzung wurde nach Herstellerangaben (GE Healthcare) mit dem Schwerkraftprotokoll durchgeführt.

2.9.1 Enzymaktivität von MsP1 mit Ferulasäureethylester als Substrat

Zur Bestimmung der Reaktion von MsP1 (nicht gereinigt) gegenüber Ferulasäureethylester (FSEE) wurden zu 8 Zeiten zwischen 24 s und 1.730 s die UV/VIS-Spektren von 210 nm bis 600 nm mit dem Spektralphotometer Specord 50 bei 30°C aufgenommen. Die Zusammensetzung des Assays ist in Tabelle 2.16 dargestellt.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung des Assay zur Messung der MsP1-Aktivität gegenüber Ferulasäureethylester

Reagenz	Endkonzentration
FSEE	0,0787 mmol L ⁻¹
MsP1	100 U _{ABTS} (1:10.000)
H ₂ O ₂	2 mmol L ⁻¹
in H ₂ O	Endvolumen 1 mL

2.9.2 Enzymaktivität von MsP1 und Laccase mit Coniferylalkohol als Substrat

Coniferylalkohol wurde jeweils mit MsP1 (nicht gereinigt) und Laccase versetzt. Zusätzlich wurde jeweils in einer Probe ABTS zugesetzt (Tab. 2.17). Alle Reaktionen wurden in VE-Wasser durchgeführt. Spektren wurden in einem Gesamtvolumen von 1 mL am Spektralphotometer (Specord 50) in Quarzküvetten in einem Wellenlängenbereich von 190 nm bis 600 nm aufgenommen.

Tabelle 2.17: Probenzusammensetzung für die Umsetzung von Coniferylalkohol mit Laccase und MsP1

Probe	Enzym	Enzymaktivität Unit _{ABTS}	Coniferylalkohol mmol L ⁻¹	ABTS mmol L ⁻¹	H ₂ O ₂ mmol L ⁻¹
1	Laccase _{inaktiv}	-	0,1715	-	-
2	Laccase _{aktiv}	2	0,1715	-	-
3	Laccase _{aktiv}	2	0,1715	0,05	-
4	MsP1 _{inaktiv}	-	0,1715	-	1
5	MsP1 _{aktiv}	2,5	0,1715	-	1
6	MsP1 _{aktiv}	2,5	0,1715	0,05	1

Nach der Reaktion (20 h) wurde die H₂O₂-Konzentration (Kapitel 2.7.6 Messung der H₂O₂-Konzentration) und die Aktivität gegenüber ABTS (Kapitel 2.3.3 und Kapitel 2.3.4 ABTS) bestimmt.

2.9.3 Aktivität von MsP1 in Gegenwart von Coniferylalkohol

Aktivitäten von gereinigtem und ungereinigtem MsP1

Die nicht gereinigte MsP1-Lösung wurde mit einer Aktivität von 19,3 U_{Carotin} L⁻¹ und die gereinigte MsP1-Lösung mit der Aktivität von 4,8 U_{Carotin} L⁻¹ eingesetzt. Die Messung der β,β -Carotin-Aktivität (Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin) wurde mit 100 μ L der Enzymlösung, einer H₂O₂-Konzentration von 1 mmol L⁻¹ und einer Coniferylalkohol-Konzentration von 0,00858 mmol L⁻¹ in einem Gesamtvolumen von 1 mL durchgeführt

und am Spektralphotometer (Specord 50) gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MsP1 gestartet. Coniferylalkohol wurde wahlweise vor oder 155 s nach Start der Messung zugegeben.

Die Messung der ABTS-Aktivität (Kapitel 2.3.4 ABTS) wurde mit 100 μL einer jeweils 1:100 Verdünnung der Enzymlösungen (siehe oben), einer H_2O_2 -Konzentration von 1 mmol L^{-1} und einer Coniferylalkohol-Konzentration von 0 mmol L^{-1} , 0,00858 mmol L^{-1} oder 0,0858 mmol L^{-1} durchgeführt. Coniferylalkohol wurde vor Start der Messung zugegeben.

MsP1-Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration an Coniferylalkohol

Mit gereinigtem MsP1 wurde die Aktivität ohne Coniferylalkohol und unter Zugabe von verschiedenen Coniferylalkohol-Konzentrationen mittels β,β -Carotin-Assay (Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin) in einem Gesamtvolumen von 1 mL am Spektralphotometer (Specord 50) gemessen. Bei den Messungen wurde eine MsP1-Lösung (0,9 $\text{U}_{\text{Carotin}} \text{mL}^{-1}$) 1:500 für die Messungen mit Coniferylalkohol und 1:100 für die Messungen ohne Coniferylalkohol verdünnt, je 100 μL wurden im Assay eingesetzt. Die H_2O_2 -Konzentration betrug 1 mmol L^{-1} . Die Coniferylalkohol-Konzentration wurde mit Stammlösungen von 0,2 mmol L^{-1} und 0,02 mmol L^{-1} auf 0,04 mmol L^{-1} , 0,02 mmol L^{-1} , 0,01 mmol L^{-1} , 0,004 mmol L^{-1} oder 0,002 mmol L^{-1} eingestellt. Coniferylalkohol wurde vor Start der Messung zugegeben.

2.9.4 Vergleich verschiedener Mediatoren zur Steigerung der MsP1-Aktivität gegenüber β,β -Carotin

Die β,β -Carotin-Aktivität von MsP1 (Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin) wurde unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an Coniferylalkohol (0 bis 0,03 mmol L^{-1}), Ferulasäureethylester (0 bis 0,03 mmol L^{-1}), 4-Ethylphenol (0 bis 0,03 mmol L^{-1} und 0 bis 0,06 mmol L^{-1}) und *p*-Coumarsäure (0 bis 0,03 mmol L^{-1} und 0 bis 0,06 mmol L^{-1}) gemessen. Die H_2O_2 -Konzentration betrug 0,5 mmol L^{-1} . Die Aktivitäten wurden in einem Gesamtvolumen von 300 μL mit einer eingesetzten MsP1-Aktivität von 0,09 $\text{U}_{\text{Carotin}} \text{L}^{-1}$ im Ansatz im Plattenreader Synergy 2 gemessen. Die Mediatoren wurden vor Start der Messung zugegeben. Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung.

Optimierung der Mediatorkonzentration

Die β,β -Carotin-Aktivität von MsP1 (Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin) wurde bestimmt. Die Mediatorkonzentration betrug jeweils bei Coniferylalkohol und Ferulasäureethylester 0 bis 0,03 mmol L^{-1} . Für 4-Ethylphenol und *p*-Coumarsäure wurde der Konzentrationsbereich von 0 bis 0,16 mmol L^{-1} erweitert. Die H_2O_2 -Konzentration betrug 0,5 mmol L^{-1} . Die Aktivitäten wurden in einem Gesamtvolumen von 300 μL mit einer MsP1-Aktivität von 0,13 $\text{U}_{\text{Carotin}} \text{L}^{-1}$ im Ansatz im Plattenreader Synergy 2 gemessen. Die Mediatoren wurden vor Beginn der Messung zugegeben. Die Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.9.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten in Gegenwart verschiedener Mediatoren

Die Kinetiken mit β,β -Carotin als Substrat (Kapitel 2.3.4 β,β -Carotin) wurden in einem Gesamtvolumen von $300\ \mu\text{L}$ mit $50\ \mu\text{L}$ einer MsP1-Verdünnung gemessen. Die MsP1-Aktivität im Ansatz betrug $0,13\ \text{U}_{\text{Carotin}}\ \text{L}^{-1}$. 2 Verdünnungslösungen wurden hergestellt und gemessen. Die Kinetik wurde mit 5 bis $19\ \mu\text{mol L}^{-1}$ β,β -Carotin und den Mediatoren Coniferylalkohol ($0,003\ \text{mol L}^{-1}$) und Ferulasäureethylester ($0,003\ \text{mol L}^{-1}$) jeweils in Dreifachbestimmung aufgenommen. Die Kinetiken wurden im Fließgleichgewicht im Plattenreader Synergy 2 bei $30\ ^\circ\text{C}$ verfolgt.

2.10 Immobilisierung

2.10.1 Immobilisierung von MsP1 auf Kieselgel

Mesoporöse Kieselgel-Monolithen wurden nach dem Nakanishi-Prozess (Nakanishi und Soga, 1991) hergestellt. Die Funktionalisierung erfolgte mit 50 mmol L^{-1} 3-Methylaminopropyl-trimethoxysilan (MAPTMS) in Dichlormethan für 6 h bei Raumtemperatur. Die Beladung des Kieselgels wurde über die Bindung des Farbstoffs Eosin Y berechnet. 14,6 mg Kieselgel-Monolithen wurden mit einer Lösung aus 0,017 mg Eosin Y in 10 mL Wasser überschichtet und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze erfolgten in Dreifachbestimmung. Die Absorptionsspektren der reinen Eosinlösung als Blindwert und der Überstände der Inkubation mit den Kieselgel-Monolithen wurden zwischen 500 nm und 530 nm aufgenommen. Die Beladung des funktionalisierten Kieselgels betrug $1,63 \cdot 10^{-7} \text{ mol H}_2\text{N-Gruppen pro g SiO}_2$.

Fünf Proben mit je 10 mg zermörsertem Kieselgel (Probe 1) bzw. mit H_2N funktionalisiertem Kieselgel (Probe 2 bis 5) wurden in einem 15 mL Reaktionsröhrchen mit 3 mL 5%iger Glutardialdehydlösung überschichtet, für 2 h bei 24 h inkubiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Das Kieselgel wurde bei 5.000 g für 2 min zentrifugiert, der Überstand entnommen und das Kieselgel mit 10 mL Wasser gewaschen. Das Wasser wurde abgenommen und das Kieselgel mit je $300 \mu\text{L}$ MsP1-Lösung ($0,295 \text{ U}_{\text{ABTS}}$) überschichtet und für 2 h bei 24°C inkubiert. Anschließend wurden je 3 mL Wasser zugegeben und nochmals für 1 h inkubiert. Das Kieselgel wurde zentrifugiert (2 min, 5.000 g), der Überstand abgenommen (Ü1) und bei 4°C gelagert. Die Proben 1 bis 3 wurden mit 2,5 mL Wasser überschichtet und die Proben 4 und 5 wurden mit $2,5 \text{ mL } 2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ NaBH}_4$ überschichtet und für 30 min bei 24°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz wieder zentrifugiert (2 min, 5.000 g) und der Überstand entnommen (Ü2). Das Kieselgel wurde mit 5 mL Wasser gewaschen (Ü3). Anschließend wurden die Proben 3 und 5 mit 1 mL $0,075 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ -Lösung pH 1 für 20 min inkubiert, zentrifugiert (2 min, 5.000 g) und der Überstand abgenommen (Ü4). Alle Proben wurden in 6 mL Wasser über Nacht bei 4°C gelagert (Ü5). In allen Überständen sowie der MsP1-Ausgangslösung wurden die Proteinkonzentration nach Bradford (Kapitel 2.4) und die Peroxidase-Aktivität mittels ABTS-Assay (Kapitel 2.3.4 ABTS) bestimmt. Bei den Überständen Ü2 und Ü3 der Proben 4 und 5 und bei dem Überstand Ü4 der Proben 3 und 5 wurden die pH-Werte auf 3 eingestellt.

2.10.2 Messung der Enzymaktivität von immobilisiertem MsP1

Für die Messung der Aktivität des immobilisierten MsP1 wurden je Probe ca. 2,5 mg noch feuchtes Kieselgel (das effektive Trockengewicht wurde über die Gesamtgewichtszunahme nach Immobilisierung berechnet (Tab. 2.18)) in je ein Schnappdeckelglas abgewogen und mit 25 mL $50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaAc}$ -Puffer pH 3,5, 2,5 mL $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ ABTS}$ -Lösung und zum Starten der Reaktion mit $250 \mu\text{L } 200 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ versetzt. Während 90 min wurde die Extinktion 5 mal bei 420 nm gemessen. Hierzu wurde 1 mL des Reaktionsgemisches für die Zeit der Messung ($\sim 1 \text{ min}$) abgenommen und nach der Messung wieder zugeführt. Die Enzymaktivitäten wurden über Formel 2.1 berechnet.

Tabelle 2.18: Einwaage des Kieselgels für die Messung der Enzymaktivität

Probe	1	2	3	4	5
Trockengewicht / mg	0,43	0,47	0,48	0,59	0,53

2.10.3 Messung der Enzymaktivität von immobilisiertem MsP1 in mehreren Zyklen

4 mg bis 5 mg Kieselgel mit immobilisiertem MsP1 (Probe 2 und Probe 4 aus Kapitel 2.10.1) wurden abgewogen (Doppelbestimmung) und zu einer Assay-Lösung mit $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ABTS und 2 mmol L^{-1} H_2O_2 in $22,5 \text{ mL}$ 50 mmol L^{-1} NaAc-Puffer pH 3,5 zugegeben. Die Reaktion wurde über die Aufnahme der Extinktion bei 420 nm alle 5 min verfolgt. Hierzu wurden 1 mL des Reaktionsgemisches abgenommen und nach der Messung wieder zugeführt. Dann wurde das Kieselgel abzentrifugiert (2 min , 5.000 g) und der Überstand entnommen. Das Kieselgel wurde mit 15 mL Reinstwasser nochmals kurz gewaschen, wieder zentrifugiert (2 min , 5.000 g) und der Überstand entnommen. Dann wurde das Kieselgel mit neuer Assay-Lösung versetzt und die Extinktion erneut bei 420 nm alle 5 min gemessen. Insgesamt wurde das Kieselgel 3 Mal eingesetzt. Die Enzymaktivitäten wurden über die Formel 2.1 berechnet.

2.11 Carotinoidbleichung in Molke und Milch

2.11.1 MsP1-Reinigung über Ammoniumsulfat-Fällung

Für den ersten Fällungsschritt bei 0 °C wurde die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sättigung auf 45 % erhöht. Die Lösung wurde für 20 Minuten auf Eis gerührt und danach bei 30.000 g, 4 °C, 30 Minuten zentrifugiert. Im Überstand, welcher MsP1 enthielt, wurde die Sättigung auf 65 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erhöht, für 20 Minuten auf Eis gerührt und danach bei 30.000 g, 4 °C, 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 mL Wasser gelöst. Nur eine geringe MsP1-Aktivität wurde im Überstand nachgewiesen, die höchste MsP1-Aktivität wurde im Pellet gefunden. Nach der Fällung mit Ammoniumsulfat wurde MsP1 nach Herstellerangaben (GE Healthcare) mit dem Schwerkraftprotokoll über eine Gelfiltrationssäule (PD-10 Desalting Column) entsalzt.

2.11.2 Enzym-Assays

Enzymaktivitäten wurden im Spektralphotometer (Specord 50) mit Thermostatisierung über ein externes Wasserbad bei 25 °C gemessen.

MsP1-Aktivität

Die Aktivität von MsP1 wurde mittels β,β -Carotin-Assay (Kapitel 2.3.4) mit einer H_2O_2 -Konzentration von $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ und einer $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ β,β -Carotinlösung gemessen. Die Aktivität der zu Bleichung eingesetzten gereinigten MsP1-Lösung betrug $110 \pm 5 \% \text{ mU mL}^{-1}$.

Glucoseoxidaseaktivität

Glucoseoxidase(GOX)-Aktivität wurde indirekt mittels ABTS-Assay (Kapitel 2.3.4) gemessen. Der Reaktionsansatz beinhaltete $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ABTS, $0,25 \text{ U MsP1}$, $0,55 \text{ mmol L}^{-1}$ D-Glucose in 50 mmol L^{-1} NaAc-Puffer (ad 1 mL), pH 6,5.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von GOX gestartet und im Fließgleichgewicht für 2 min bei 420 nm gemessen, wobei die Reaktion von GOX der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war. Die Aktivität der zur Bleichung eingesetzten GOX-Lösung betrug $115 \pm 2,5 \% \text{ U mL}^{-1}$.

Lactaseaktivität

Die Lactaseaktivität wurde in 50 mmol L^{-1} NaAc-Puffer, pH 6,5, mit $8,1 \text{ mmol L}^{-1}$ *p*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid als Substrat gemessen. Die Zunahme des Produktes *p*-Nitrophenol ($\epsilon = 18,3 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) im Fließgleichgewicht der Reaktion wurde über die Extinktion bei 405 nm über 2 min aufgenommen. Die Aktivität der zu Bleichung eingesetzten sauren Lactase betrug $10,1 \pm 2,2 \% \text{ U mL}^{-1}$.

2.11.3 Bleichung

Die Glucosekonzentration wurde nach Kapitel 2.5 bestimmt. Zur Färbung wurde eine β,β -Carotin-Lösung (Kapitel 2.3.4: β,β -Carotin) eingesetzt.

Die Ergebnisse wurden im internationalen, colometrischen System als CIELab (Commission Internationale de l'Éclairage, 1988) dargestellt. Der b-Wert wurde mit dem Reflektionsspektrometer (Avaspec2048) zeitabhängig gemessen.

Alle Bleichungsreaktionen wurden in einem Endvolumen von 5 mL durchgeführt. Als Weißstandard mit dem L-Wert von 100 wurden nichtgefärbte Molke bzw. Milch genutzt. Negativkontrollen wurden mit hitzeinaktiviertem (100 °C, 2 h) MsP1 und 2,3 mU mL⁻¹ GOX für die Generierung von H₂O₂ durchgeführt. Die Reaktion wurde über 21 h aufgenommen.

Bleichung von β,β -Carotin gefärbter Molke bei verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen

Für die Bleichung von Molke wurden 0,023 mmol L⁻¹ β,β -Carotin und 3,6 mU MsP1 eingesetzt. Die H₂O₂ Konzentration betrug 0,1 mmol L⁻¹ bis 2 mmol L⁻¹. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von H₂O₂ gestartet.

Bleichung von β,β -Carotin gefärbter Molke mit durch GOX *in situ* generiertem H₂O₂

Für die Bleichung von Sauermolke (pH 4,5) wurden 0.023 mmol L⁻¹ β,β -Carotin und für Süßmolke (pH 6,5) 0.026 mmol L⁻¹ β,β -Carotin und jeweils ein Enzymmix von 5 mU mL⁻¹ MsP1 und 2,3 mU mL⁻¹ GOX eingesetzt.

Bleichung von Annatto gefärbter Molke mit durch GOX *in situ* generiertem H₂O₂

Sauermolke wurde mit 25 μ L Annatto (2,1 mmol L⁻¹) gefärbt. Für die Bleichung wurde ein Enzymmix mit Ansatz 1: 18 mU mL⁻¹ MsP1, 2,3 mU mL⁻¹ GOX und Ansatz 2: 3,6 mU mL⁻¹ MsP1, 2,3 mU mL⁻¹ GOX eingesetzt.

Bleichung von β,β -Carotin gefärbter Milch mit durch GOX *in situ* generiertem H₂O₂

Die Milch wurde mit 0,04 mmol L⁻¹ β,β -Carotin gefärbt, um einen b-Wert von 50 zu erreichen. Für die Bleichung wurde ein Drei-Enzym-System verwendet. Der Enzymmix beinhaltete 5 mU mL⁻¹ MsP1, 2,3 mU mL⁻¹ GOX, und 1 mU mL⁻¹ saure Lactase.

2.12 Entsorgung

2.12.1 Sterilisation von S1-Abfällen

Sowohl feste als auch flüssige S1-Abfälle wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert. Autoklavierte Kulturen wurden anschließend filtriert. Flüssigkeiten wurden dem Abwasser zugeführt und feste Bestandteile wurden mit dem Laborabfall entsorgt.

2.12.2 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien

Nicht wieder verwendbare Lösungsmittel wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt: nicht halogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel; nicht halogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel; halogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel; halogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel. Die Lösungsmittel wurden ebenso wie die Chemikalienreste der zentralen Entsorgungseinrichtung der JLU Gießen zugeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Submerskulturen von *Mycetinis scorodonius*

3.1.1 Messung der Aktivitäten von Cellulase, Xylanase, Laccase und Peroxidase

Die Cellulase-, Xylanase-, Laccase- und Peroxidaseaktivitäten sowie die Proteinkonzentrationen zweier Kulturen von *Mycetinis scorodonius* (Kapitel 2.2.3) wurden über 18 Tage verfolgt. Die Proteinkonzentration (Abb. 3.1) stieg ab dem ersten Tag (20 mg L^{-1}) stetig bis zum 13. Tag. An Tag 15 erreichten beide Kulturen Höchstwerte mit Proteinkonzentrationen von 71 bzw. 97 mg L^{-1} .

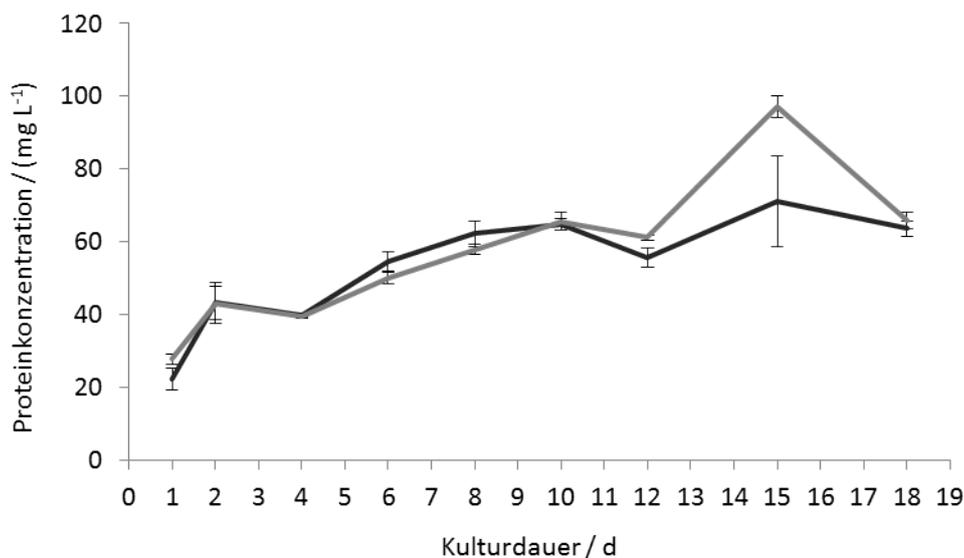


Abbildung 3.1: Proteinkonzentration in Kulturüberständen der Hauptkulturen.
Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B

Bei der Bestimmung der Aktivitäten von Cellulasen und Xylanasen wurde erst an Tag 4 mit der Auswertung begonnen, da dann keine Glucose mehr nachgewiesen wurde. Eine zu hohe Glucosekonzentration verursachte einen starken Hintergrund beim Nachweis reduzierender Zucker. Sowohl Cellulasen (Abb. 3.2) als auch Xylanasen (Abb. 3.3) wurden ab an Tag 4 detektiert. Für beide Enzyme zeigten sich bei diesen Kulturen an Tag 6 und an Tag 15 zwei lokale Maxima. Insgesamt variierten die Aktivitäten der Cellulasen je nach Tag zwischen 20 U L^{-1} und 120 U L^{-1} und der Xylanasen zwischen 175 U L^{-1} und 1.054 U L^{-1} .

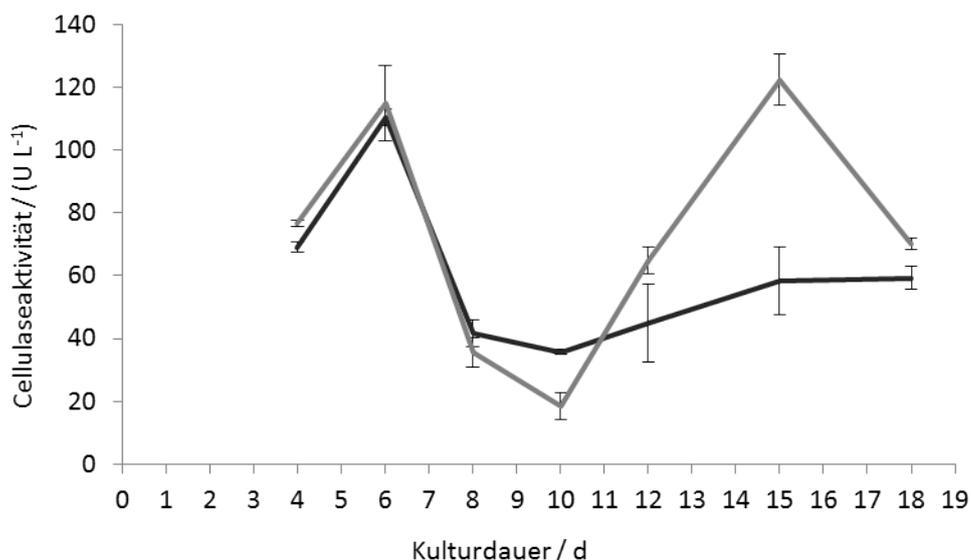


Abbildung 3.2: Cellulaseaktivitäten in Kulturüberständen der Hauptkulturen.
Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B

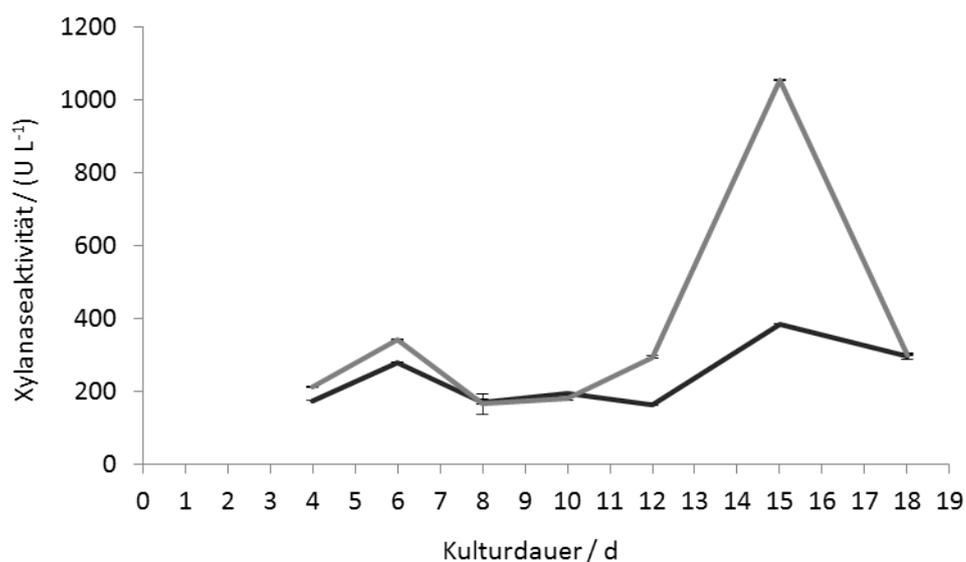


Abbildung 3.3: Xylanaseaktivitäten in Kulturüberständen der Hauptkulturen.
Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B

Die Laccaseaktivität (Abb. 3.4) zeigte Maxima an Tag 6 und Tag 15, wobei das zweite Maximum in der Kultur A ausgeprägter war. Minima wurden zu Beginn der Kultivierung an Tag 1 und an den Tagen 8 bis 10 und Tag 22 detektiert.

Die Aktivitätsmaxima der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen (Abb. 3.5) waren an Tag 2, Tag 8 und Tag 12 zu sehen.

Bei allen vier gemessenen Enzymen zeigte sich ein wellenförmiges Expressionsmuster.

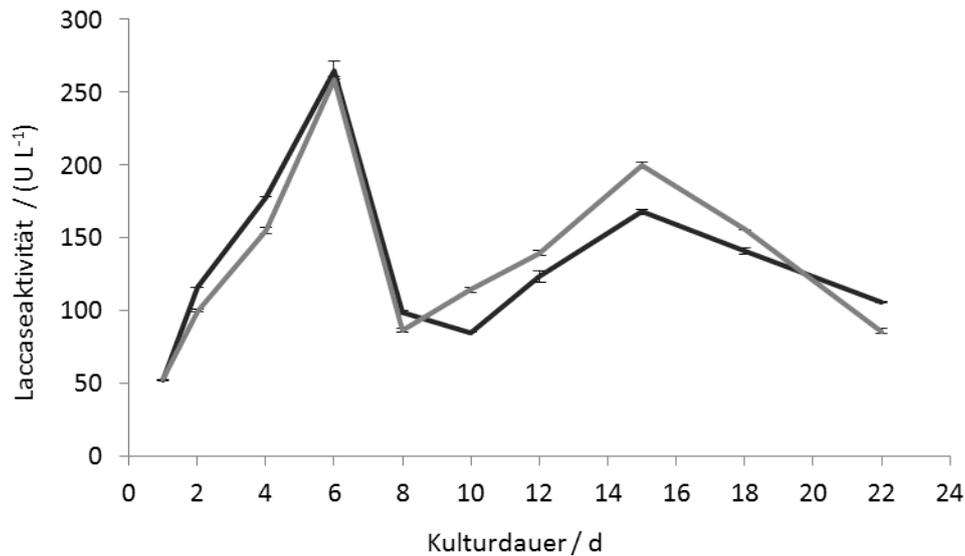


Abbildung 3.4: Laccaseaktivität in Kulturüberständen der Hauptkulturen.
Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B

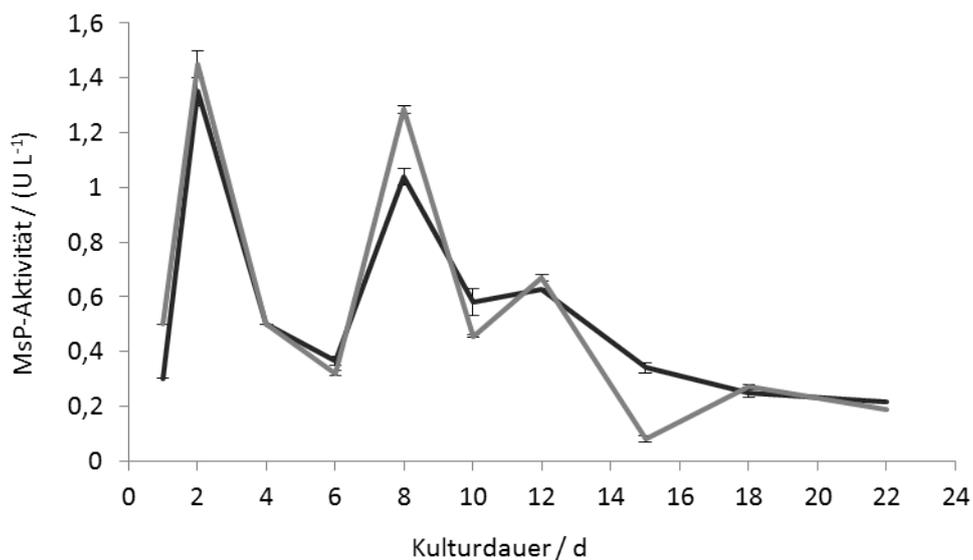


Abbildung 3.5: Peroxidaseaktivität (gemessen mit β,β -Carotin/ H_2O_2) in Kulturüberständen der Hauptkulturen.
Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B

Die Expression von β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen (Abb. 3.5) und die Expression von Laccasen (Abb. 3.4) verlief gegenläufig. An den Tagen, an denen ein Laccaseaktivitätsmaximum zu finden war, war die Aktivität der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen minimal und *vice versa*.

3.1.2 Messung der lignolytischen Enzyme auf verschiedenen lignocellulosehaltigen Substraten

Da sich in den vorangegangenen Untersuchungen der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen- und der Laccasenexpression gezeigt hat, dass diese in zeitlichem Zusammenhang stehen, wurden in weiteren Kulturen von *M. scorodonius* die Aktivitäten verschiedener Peroxidasen und Laccasen gemessen. Zusätzlich wurde die Phenolkonzentration in den Kulturen bestimmt, um einen Hinweis auf den Abbau von Lignin zu liefern.

Aus sechs Tage alten Vorkulturen (Kapitel 2.2.2) wurden Hauptkulturen in Doppelbestimmung im Strohmedium (Kapitel 2.2.4) angeimpft. Für das Strohmedium wurde verschieden behandeltes Stroh benutzt. Ungewaschenes Stroh wurde in den Kulturen u, gewaschenes in den Kulturen g und Rückstände aus einer Biogasanlage in den Kulturen m eingesetzt. Das Animpfen der Hauptkultur erfolgte mit homogenisierter Vorkultur (Proben g0 und u0) und direkt mit unbehandelter Vorkultur (Proben g1 und g2, u1 und u2, m1 und m2). Die Enzymaktivitäten (Kapitel 2.3) sowie die Protein- (Kapitel 2.4), Phenol- (Kapitel 2.6) und Glucosekonzentration (Kapitel 2.5) wurden über 18 Tage verfolgt.

Die Proteinkonzentration (Abb. 3.6) stieg die ersten beiden Tage schnell von ca. 50 mg L^{-1} an und pendelte sich dann zwischen 110 mg L^{-1} und 160 mg L^{-1} ein.

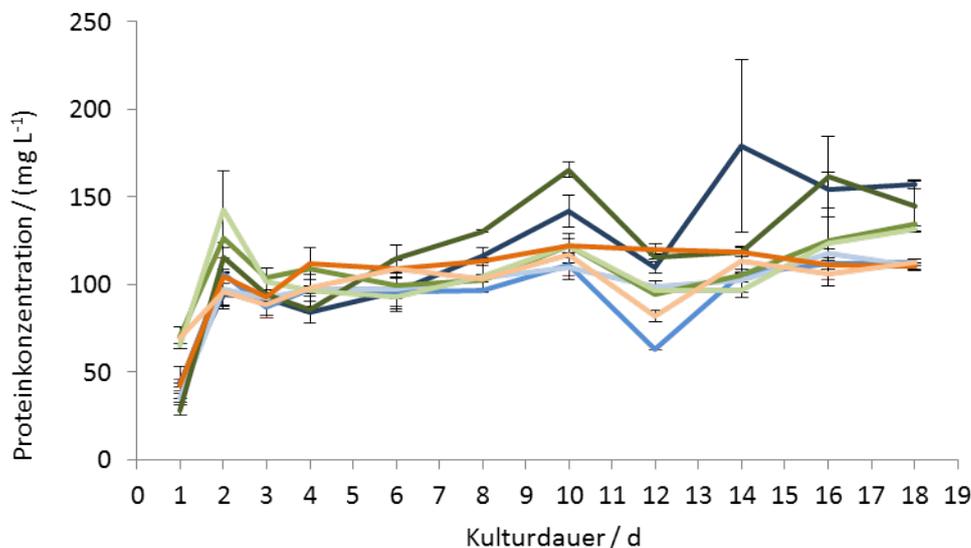


Abbildung 3.6: Proteinkonzentration gemessen nach Bradford.

Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2, dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2, dunkelorange: m1, hellorange: m2

Der Phenolgehalt (Abb. 3.7) lag am Animpftag bei $\sim 55 \mu\text{g L}^{-1}$ (g), $\sim 70 \mu\text{g L}^{-1}$ (u) und $\sim 80 \mu\text{g L}^{-1}$ (m). Insgesamt wurden im Kulturverlauf bei den beiden homogenisierten Kulturen (g0 und u0) die höchsten Phenolgehalte nachgewiesen.

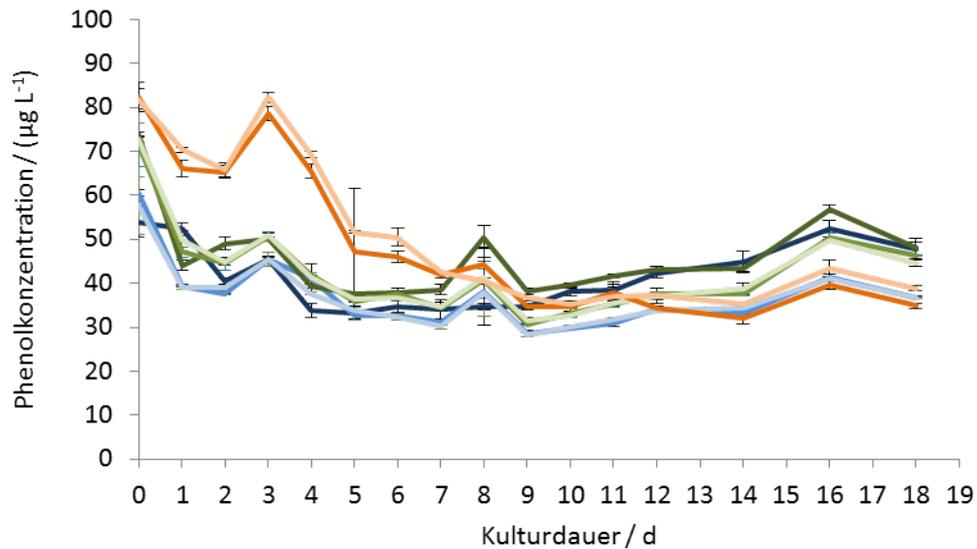


Abbildung 3.7: Phenolgehalt des Kulturmediums.

Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2, dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2, dunkelorange: m1, hellorange: m2

Die Glucosekonzentration (Abb. 3.8) wurde gemessen, um zu beurteilen, ab wann dem Pilz keine andere C-Quelle als das Stroh zur Verfügung stand. An Tag 5 war in den Kulturen (g) und (u) und an Tag 6 in den Kulturen (m) keine Glucose mehr detektierbar.

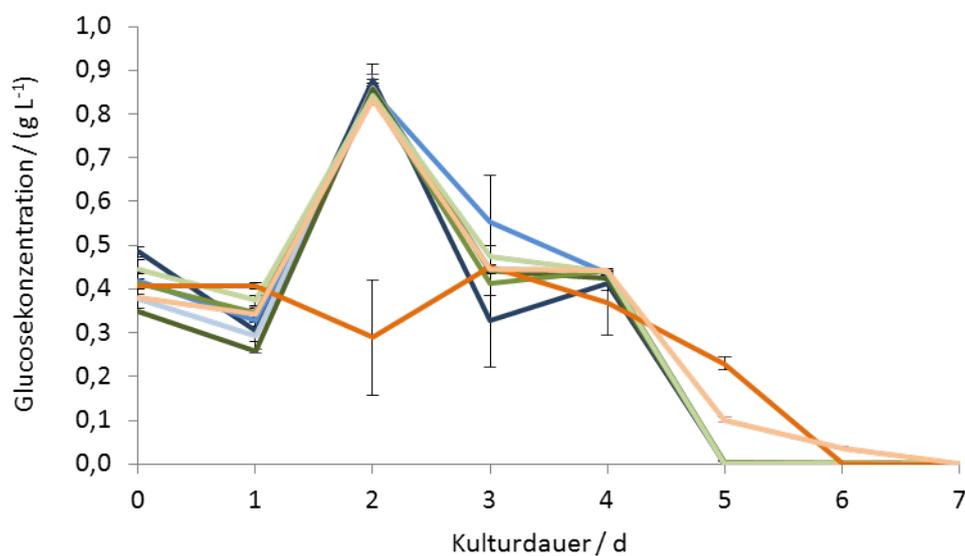


Abbildung 3.8: Glucosekonzentration in den Kulturmedien.

Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2, dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2, dunkelorange: m1, hellorange: m2

Die Laccaseaktivität wies in den beiden Kulturen mit gewaschenem Stroh (g) (Abb. 3.9) und ungewaschenem Stroh (u) (Abb. 3.10) mit lokalen Minima an den Tagen 2, 8, 10

(11) und an Tag 16 und Maxima an den Tagen 4 bis 6, 9 und 14 einen ähnlichen Verlauf auf. Insgesamt waren die Laccaseaktivitäten im Überstand der Kulturen mit ungewaschenem Stroh (Abb. 3.10) höher als mit gewaschenem Stroh (Abb. 3.9).

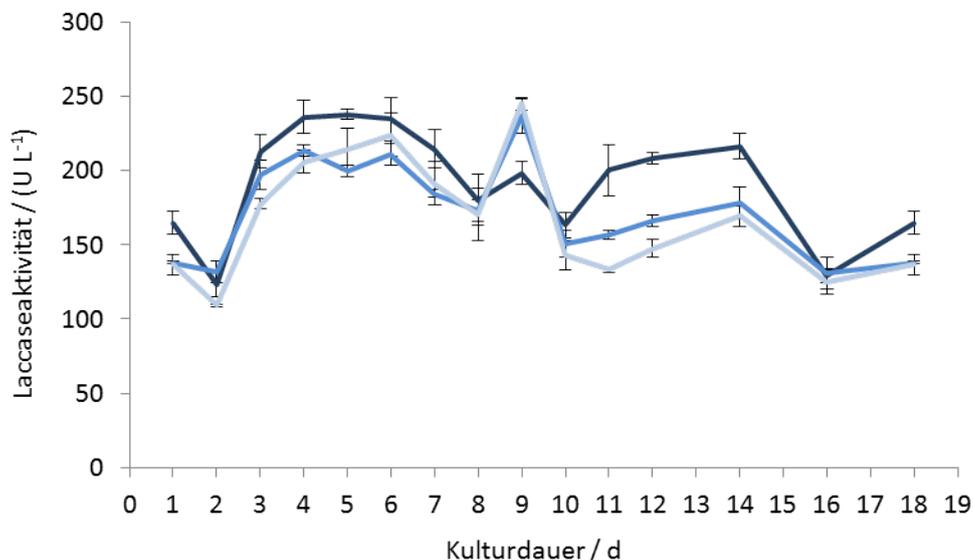


Abbildung 3.9: Laccaseaktivität (gemessen mit ABTS) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh.

Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2

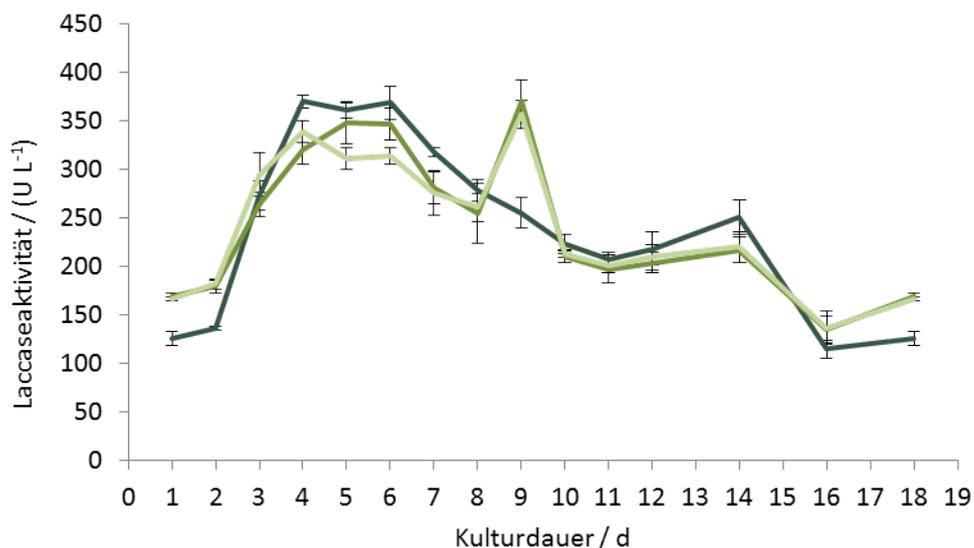


Abbildung 3.10: Laccaseaktivität (gemessen mit ABTS) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh.

Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2

Die Laccaseaktivität in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage (m) (Abb. 3.11) war um den Faktor 7 bis 10 höher als bei den beiden auf Stroh gewachsenen

Kulturen (Abb. 3.9, Abb. 3.10). Die Zu- und Abnahmen der Laccaseaktivität im Kulturverlauf waren ähnlich wie bei den Kulturen mit Stroh, wobei die Aktivität an Tag 10 in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage deutlicher zunahm.

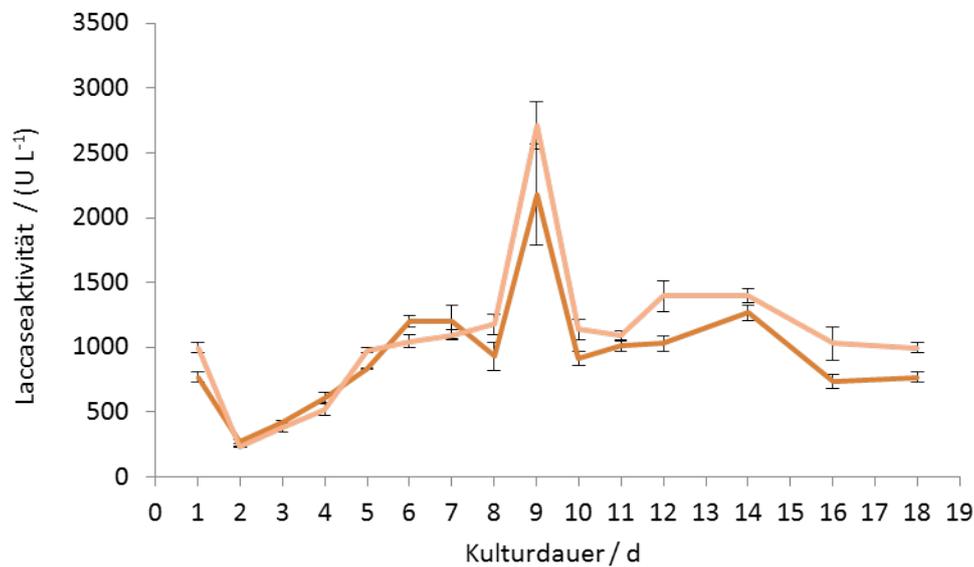


Abbildung 3.11: Laccaseaktivität (gemessen mit ABTS) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage.

Dunkelorange: m1, hellorange: m2

Die Peroxidaseaktivität in den Kulturen mit gewaschenem Stroh (g) (Abb. 3.12) zeigte den gleichen Verlauf mit Aktivitätsminima an den Tagen 3, 5, 11 und 16 und Aktivitätsmaxima an den Tagen 1, 4, 9, 12 und 19 wie die Kulturen mit ungewaschenem Stroh (u) (Abb. 3.13). Das Maximum an Tag 4 war bei der Kultur g0 sehr schwach ausgebildet.

Die Peroxidaseaktivität in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage (m) (Abbildung 3.14) zeigte einen ähnlichen Aktivitätsverlauf wie in den Kulturen mit Stroh (Abb. 3.12, Abb. 3.13). Die Aktivitäten waren in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage um den Faktor 4 höher als in den Kulturen mit Stroh.

Die Expression der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen (Abb. 3.15 und Abb. 3.16) war in gewaschenem und ungewaschenem Stroh gleich, ein Unterschied war in den homogenisierten und nicht vorbehandelten Kulturen zu sehen. In allen Kulturen wurde eine Aktivität von 5 U L^{-1} am ersten Tag gemessen.

In den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage war der Expressionsverlauf der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen (Abb. 3.17) anders als auf Stroh (Abb. 3.15 und Abb. 3.16). Insgesamt lag die Aktivität zwischen 3 U L^{-1} und 140 U L^{-1} und somit um den Faktor 10 höher als bei den Kulturen auf Stroh.

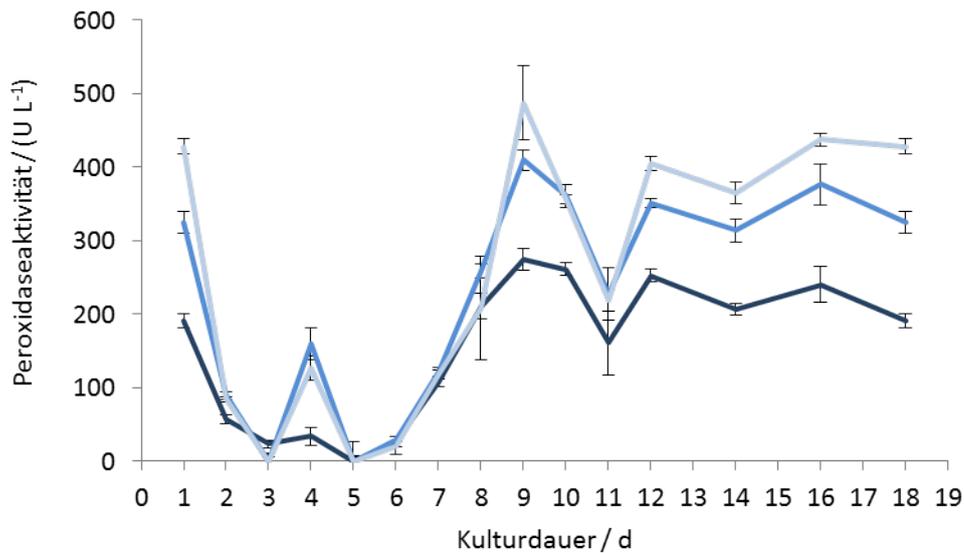


Abbildung 3.12: Peroxidaseaktivität (gemessen mit ABTS/H₂O₂) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh.

Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2

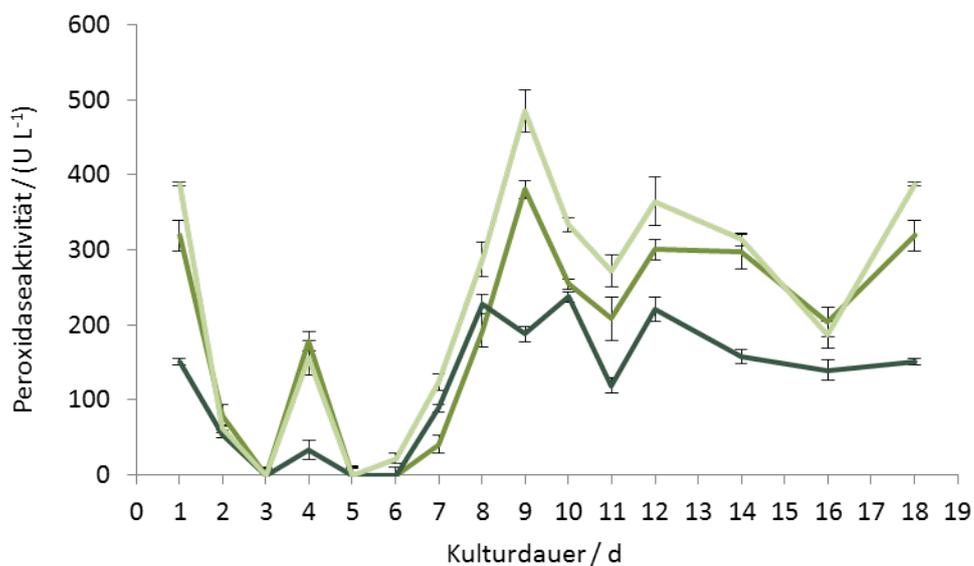


Abbildung 3.13: Peroxidaseaktivität (gemessen mit ABTS/H₂O₂) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh.

Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2

Eine zuverlässige Aussage über die Mn-Peroxidaseaktivität (Abb. 3.18 und Abb. 3.19) konnte erst ab einer Aktivität von 5 U L⁻¹ gemacht werden. *M. scorodoni* exprimierte in den Kulturen (g) und (u) Mn-Peroxidasen erst ab Tag 8 und Tag 9 mit signifikanten Aktivitäten (10 bis 15 U L⁻¹).

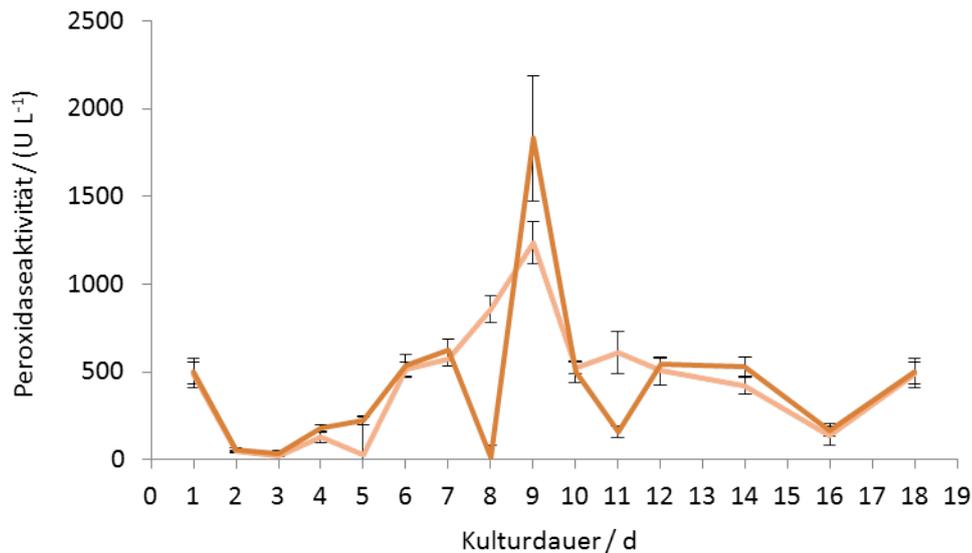


Abbildung 3.14: Peroxidaseaktivität (gemessen mit ABTS/H₂O₂) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage.
Dunkelorange: m1, hellorange: m2

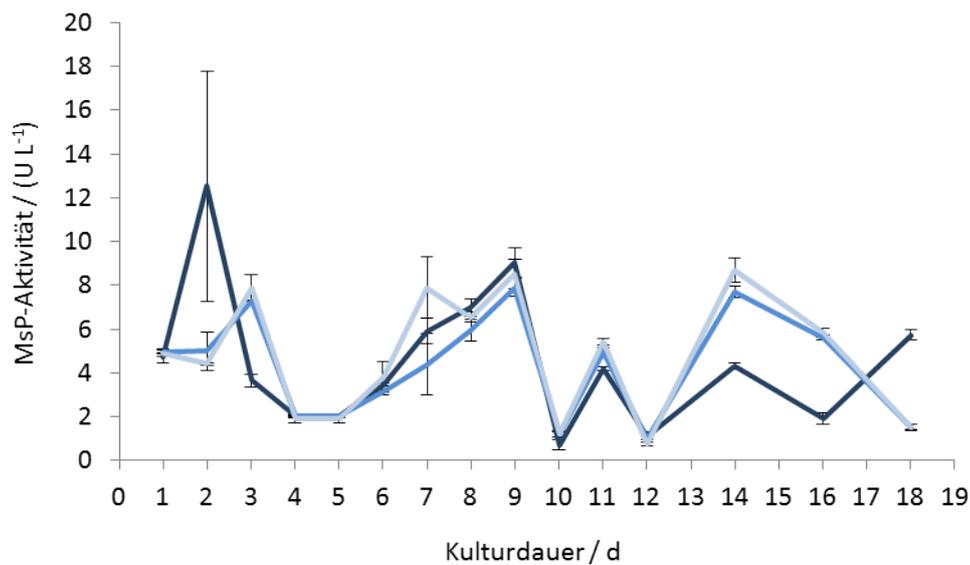


Abbildung 3.15: Peroxidaseaktivität (gemessen mit β,β-Carotin/H₂O₂) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh.
Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2

In den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage (m) (Abb. 3.20) stieg die Mn-Peroxidaseaktivität von Tag 1 bis Tag 7 und wies am Aktivitätsmaximum (Tag 9) eine 10fach höhere Aktivität als in den Kulturen mit Stroh (Abb. 3.18 und Abb. 3.19) auf. Bei allen drei Substraten veränderte sich die Mn-Peroxidaseaktivität wellenförmig im Kulturverlauf.

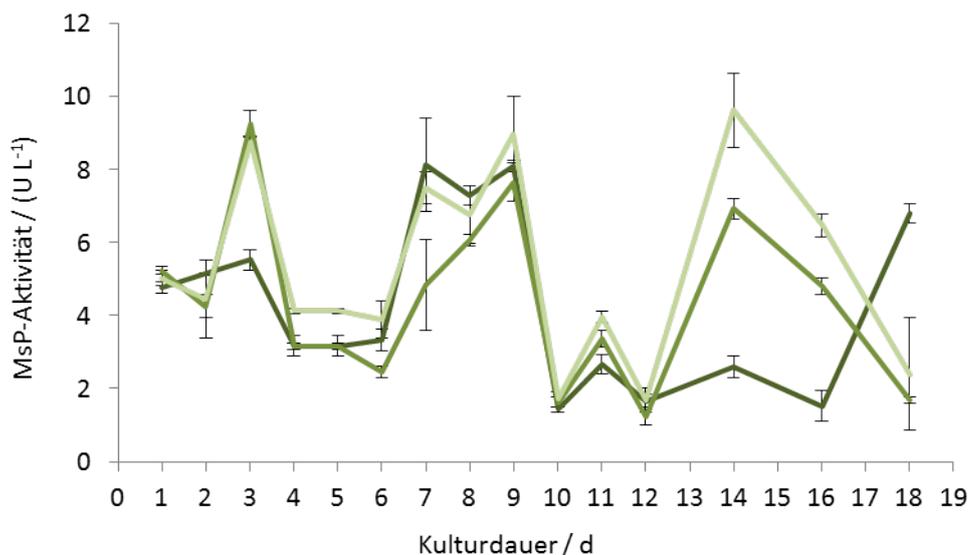


Abbildung 3.16: Peroxidaseaktivität (gemessen mit β,β -Carotin/ H_2O_2) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh.
Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2

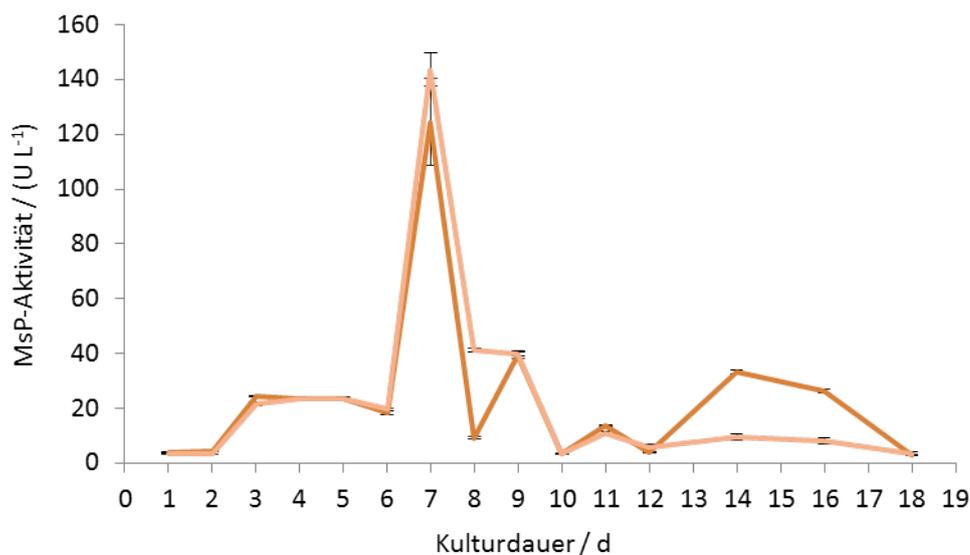


Abbildung 3.17: Peroxidaseaktivität (gemessen mit β,β -Carotin/ H_2O_2) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage.
Dunkelorange: m1, hellorange: m2

Der Unterschied der Esteraseaktivität (Abb. 3.21 und Abb. 3.22) war zwischen gewaschenem und ungewaschenem Stroh sehr gering. Die Esteraseaktivität war bei beiden Substraten bei den homogenisierten Kulturen (g0 und u0) höher.

In den Kulturen mit den Rückständen aus einer Biogasanlage (m) (Abb. 3.23) lag die Esteraseaktivität kontinuierlich bei $\sim 5 \text{ U L}^{-1}$. In der Kultur (m1) wurde zwischen den

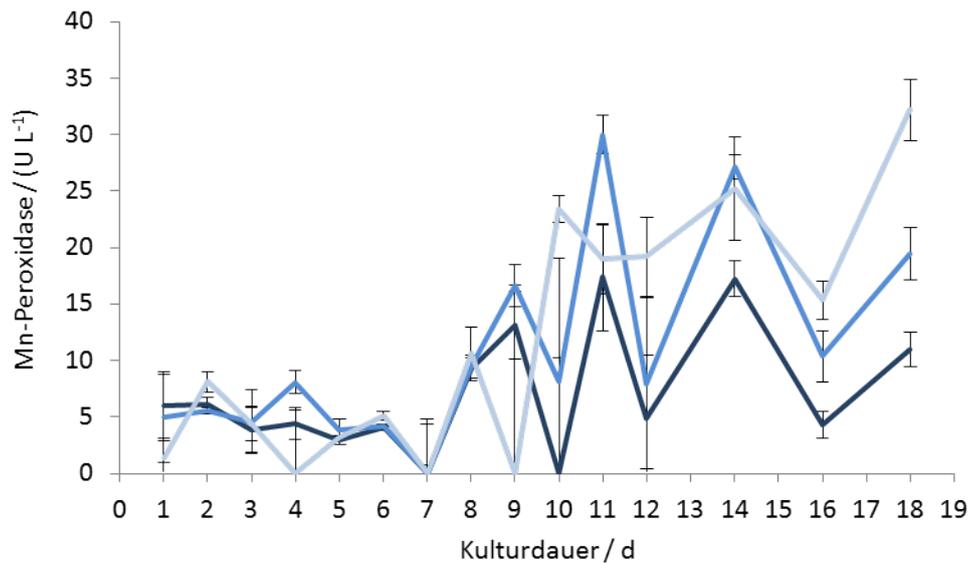


Abbildung 3.18: Mn-Peroxidaseaktivität (gemessen mit Syringol/H₂O₂/Mn) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh.
 Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2

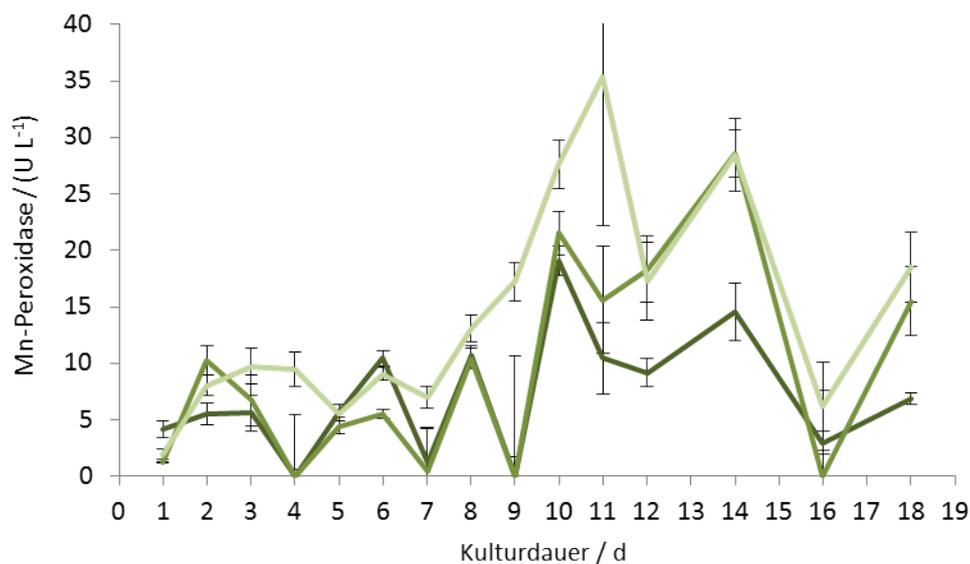


Abbildung 3.19: Mn-Peroxidaseaktivität (gemessen mit Syringol/H₂O₂/Mn) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh.
 Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2

Tagen 8 und 12 ein größerer Anstieg der Aktivität gemessen als bei der Kultur (m2). Der Aktivitätsverlauf ähnelte dem in den Kulturen mit Stroh und nicht homogenisierter Vorkultur (Abb. 3.22 und Abb. 3.22).

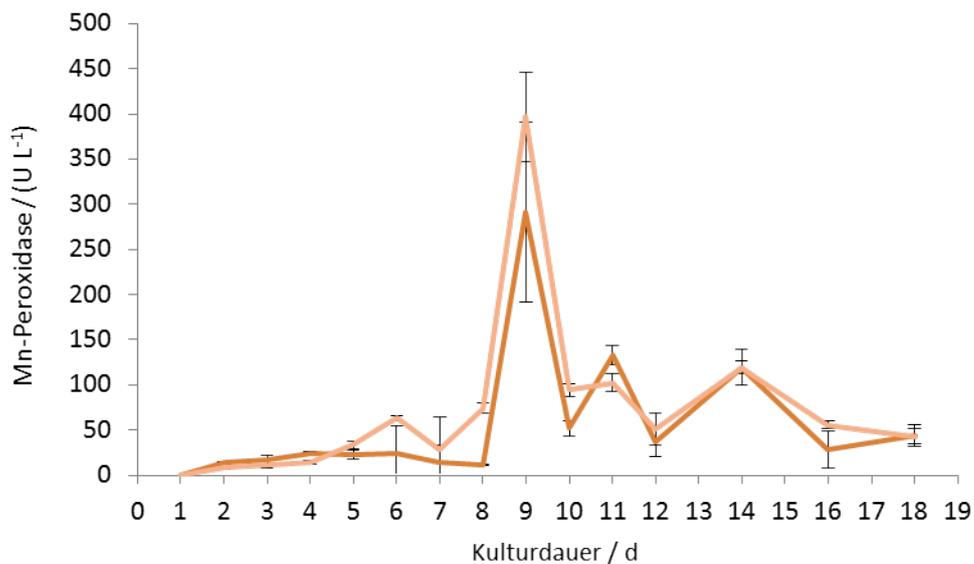


Abbildung 3.20: Mn-Peroxidaseaktivität (gemessen mit Syringol/H₂O₂/Mn) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage.
Dunkelorange: m1, hellorange: m2

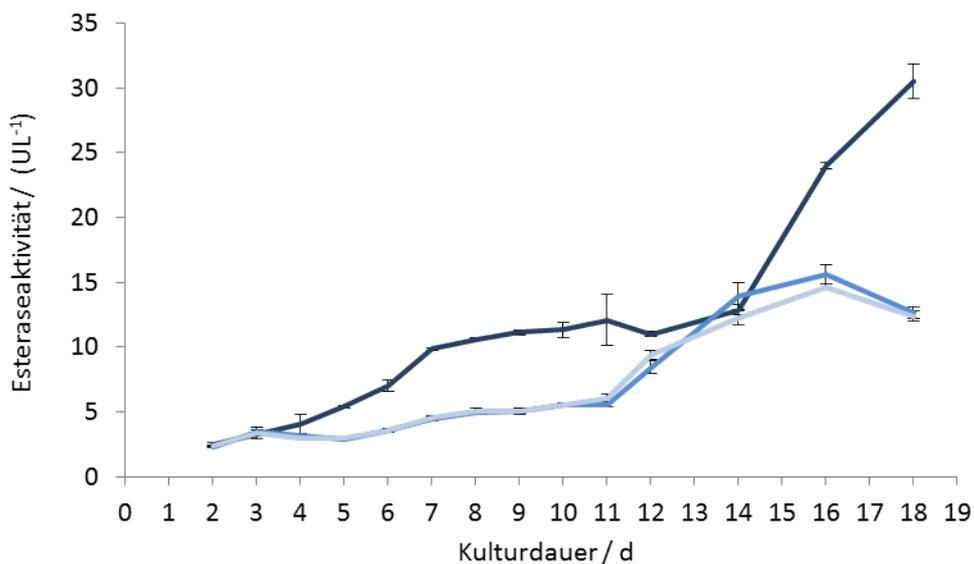


Abbildung 3.21: Esteraseaktivität (gemessen mit *p*-Nitrophenylacetat) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh.
Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2

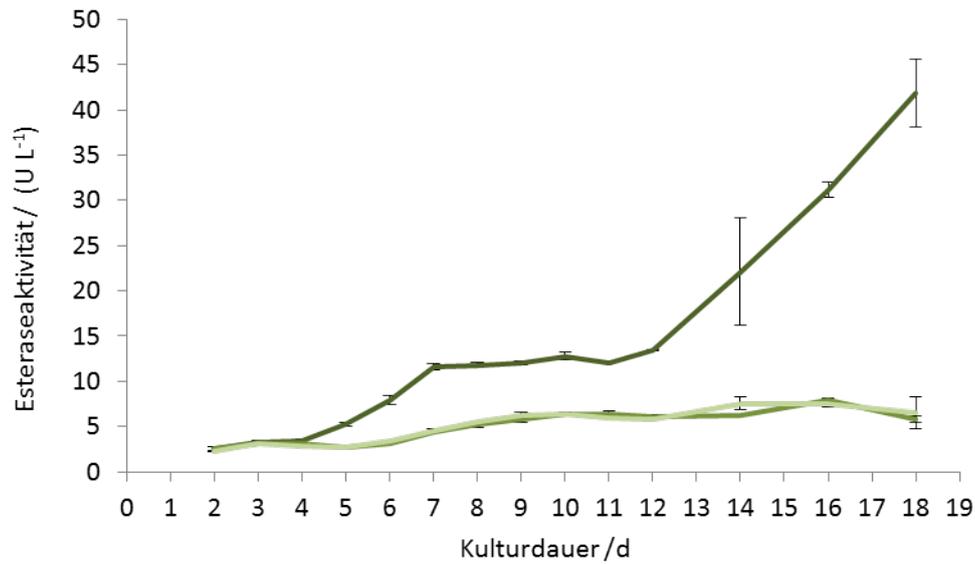


Abbildung 3.22: Esteraseaktivität (gemessen mit *p*-Nitrophenylacetat) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh.
Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2

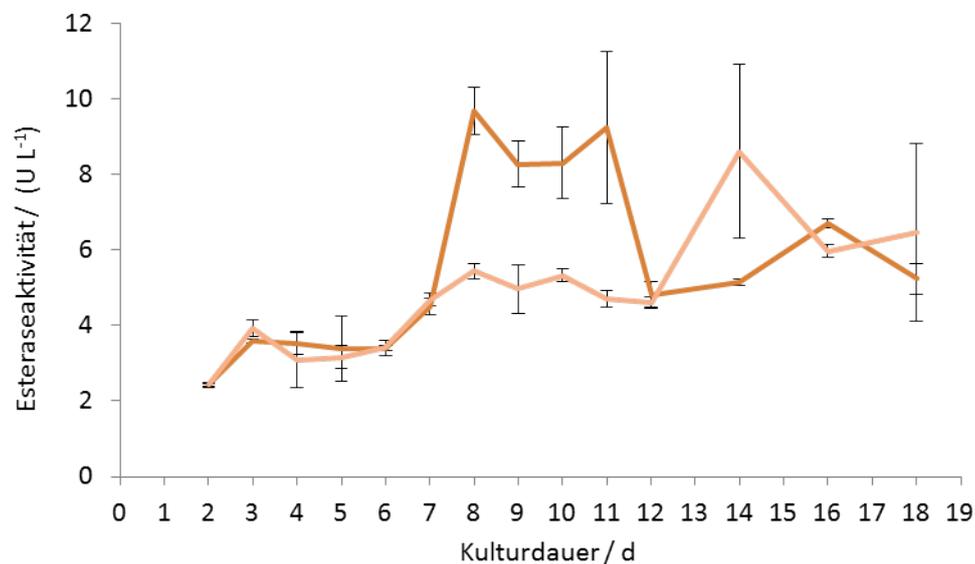


Abbildung 3.23: Esteraseaktivität (gemessen mit *p*-Nitrophenylacetat) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage.
Dunkelorange: m1, hellorange: m2

3.2 Lignin- und Strohabbau

3.2.1 Abbau von organosolv Lignin

Partikelgrößenverteilung in einer mit MsP1 behandelten Suspension von organosolv Lignin

Organosolv Lignin wurde mit dem Enzym MsP1 aus *M. scorodoni* und H_2O_2 für einen Zeitraum von 10 Tagen inkubiert (Kapitel 2.7.1). Um Veränderungen am Lignin zu beobachten, wurde die Partikelgröße der Teilchen in der Suspension zu verschiedenen Zeiten der Inkubation gemessen. Die Partikelgrößenverteilung wurde mit dem *Malven Mastersizer* gemessen (Kapitel 2.7.2). Die Suspension wurde mit MsP1 versetzt und je nach Verbrauch wurde Wasserstoffperoxid zugesetzt. Der Verbrauch an H_2O_2 war höher, je mehr MsP1-Aktivität in der Probe eingesetzt wurde (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: H_2O_2 -Verbrauch in mmol in den Proben 1 bis 5 nach angegebener Zeit bei dem Abbau von organosolv Lignin durch MsP1

Zeit	Probennummer und eingesetzte Aktivität				
	1 -MsP1	2 $0 U_{ABTS}$	3 $1000 U_{ABTS}$	4 $250 U_{ABTS}$	5 $62,5 U_{ABTS}$
7 h	0,2	0,2	1,1	0,8	0,5
23 h	0,3	0,3	1,9	1,3	0,6
29 h	0,3	0,3	2,5	1,5	0,6
46 h	0,3	0,3	3,0	1,5	0,7
6,5 d	0,3	0,3	3,6	1,6	0,7
10 d	0,3	0,3	3,8	1,7	0,7

Die Größe der Partikel, die in der reinen Suspension (Nullprobe 1, Abb. 3.24 A) vorhanden waren, lag zu Anfang der Inkubation bei $60 \mu m$ bis $500 \mu m$. Im Laufe der Inkubation entstanden zusätzlich größere Partikel im Bereich bis $800 \mu m$. Durch die Zugabe von MsP1 (Abb. 3.24 C), auch im inaktiven Zustand (Abb. 3.24 B), wurde das Lignin besser suspendiert und es entstanden kleinere Partikel. Die Partikelgrößen veränderten sich von $60 \mu m$ bis $800 \mu m$ zu $3 \mu m$ bis $300 \mu m$. Die Partikeldurchmesser der Negativkontrolle 2 (Abb. 3.24 B) betragen zu allen gemessenen Zeiten $3 \mu m$ bis $300 \mu m$ mit einem Maximum bei $50 \mu m$.

Mit aktivem MsP1 entstanden im Verlauf der Inkubation neue Partikel mit kleineren Durchmessern (Abb. 3.24 C). Die neu entstandenen Partikel wurden in zwei Größenbereichen gemessen, einmal mit dem Durchmesser im Bereich von $0,06 \mu m$ bis $1 \mu m$ und im Bereich von $1 \mu m$ bis $15 \mu m$.

In den beiden Negativkontrollen (Abb. 3.24 A und B) entstanden keine kleineren Partikel. Bei der Probe 3 (Abb. 3.24 C) entstand zwischen der Partikelgrößengruppe mit $0,06 \mu m$ bis $1 \mu m$ und der zweiten im Bereich von $1 \mu m$ bis $15 \mu m$ eine Größenlücke. Deutlich war dies am Anfang der Inkubation zu sehen. Bei Probe 3 nach 7 h Inkubation

lagen die kleinsten Partikeldurchmesser bei $0,2\ \mu\text{m}$ bis $0,7\ \mu\text{m}$ und die nächstgrößeren Partikel hatten einen Durchmesser von $2\ \mu\text{m}$ bis $10\ \mu\text{m}$. Der prozentuale Anteil der kleinsten Partikel nahm im Laufe der Inkubation (Abb. 3.24 C) zu.

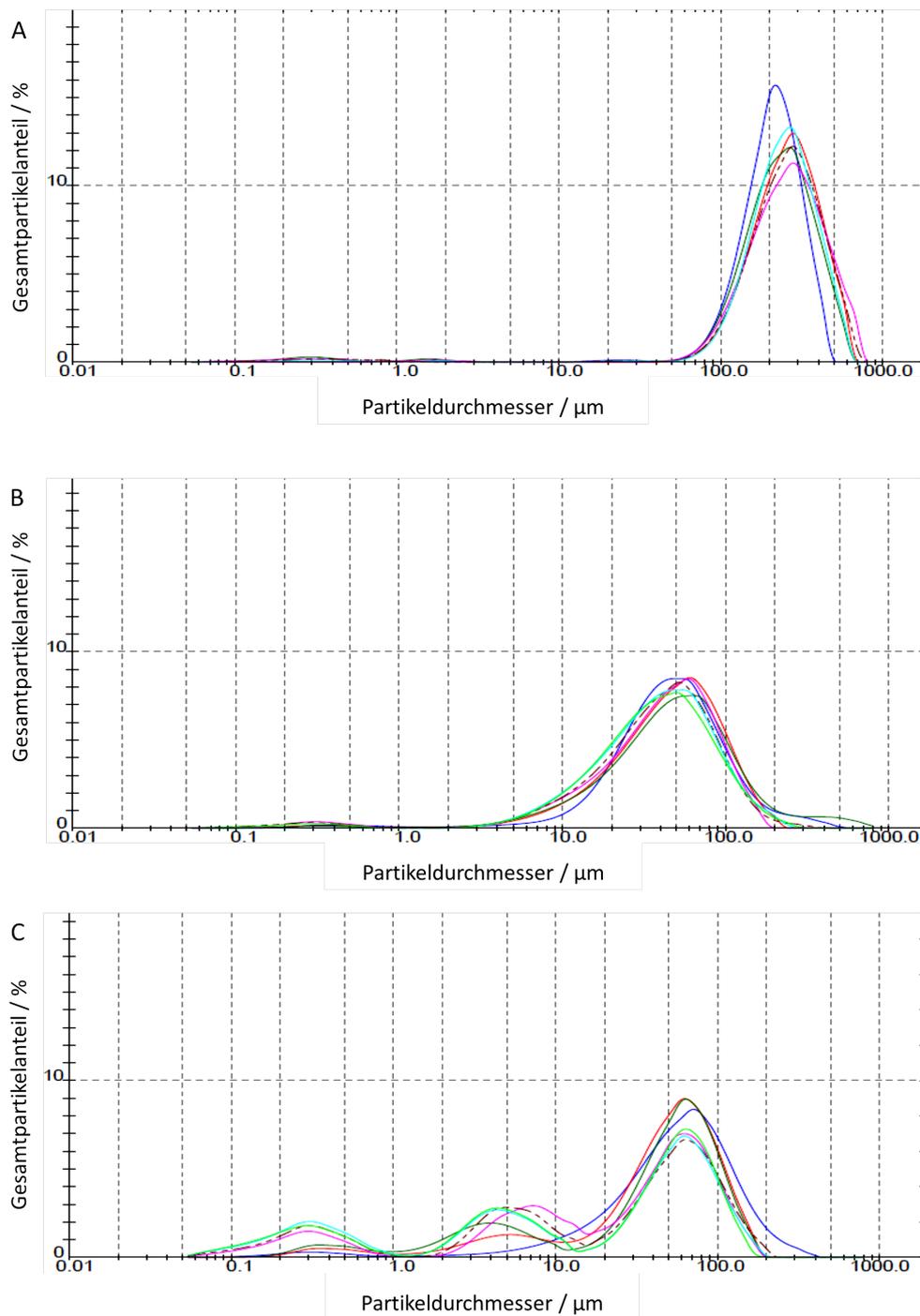


Abbildung 3.24: Änderung der Partikeldurchmesser in Abhängigkeit der Inkubationszeit in den Nullproben 1 (A) und 2 (B) und der Probe 3 (C).
Blau: 0 h; orange: 7 h; olivgrün: 23 h; pink: 29 h;
braun (Strichpunktlinie): 46 h; hellblau: 6,5 d; hellgrün: 10 d

Bestimmung der Molekülgrößen des gelösten Lignins

Um zu erfassen, wie sich die gelösten Moleküle während der Inkubation von organosolv Lignin mit MsP1 verändern, wurde eine HPSEC mit den abzentrifugierten Überständen der Ansätze (Tab. 3.1) durchgeführt.

Im Chromatogramm des Lignins, welches nur mit H_2O_2 (Abb. 3.25) inkubiert wurde, wurden 2 große Peaks bei 7,52 min und 9,25 min detektiert, was Molekülen um 240 g mol^{-1} bis 200 g mol^{-1} entsprach. Wurde das Lignin mit inaktivem MsP1 mit Zugabe von $0,3 \text{ g mol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ über 10 d inkubiert (Abb. 3.26), stieg die Extinktion im Bereich zwischen 7,52 min und 9,25 min. Gleichzeitig stieg der relative Anteil des Peaks bei 8,43 min von 7,8 % auf 32,6 %. Außerdem konnten mehr Moleküle im Bereich von 6,1 min bis 6,9 min mit Molekulargewichten von $13.459 \text{ g mol}^{-1}$ bis $\sim 240 \text{ g mol}^{-1}$ nachgewiesen werden. Die Änderung könnte dadurch hervorgerufen worden sein, dass aufgrund der hohen Temperaturstabilität (Kapitel 3.3.1) von MsP1 keine vollständige Inaktivierung erfolgte.

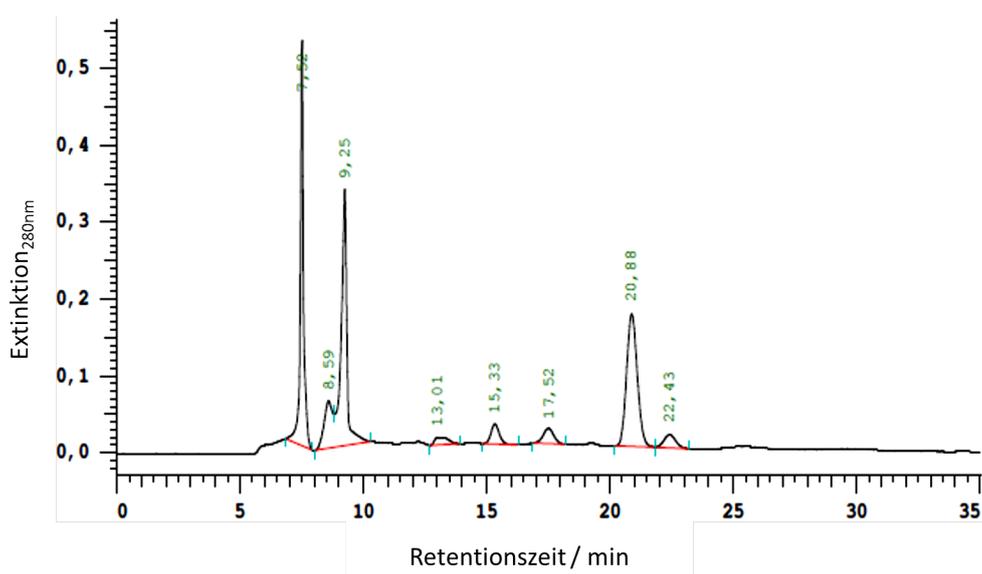


Abbildung 3.25: Nullprobe 1 ohne MsP1 nach 10 Tagen Inkubation und Zugabe von $0,3 \text{ mmol H}_2\text{O}_2$

Organosolv Lignin wurde mit aktivem MsP1 (250 U) und fortlaufender Zugabe an H_2O_2 inkubiert. Nach 7 h mit einem Verbrauch von $0,8 \text{ mmol H}_2\text{O}_2$ (Abb. 3.27) waren größere Moleküle nachweisbar als bei den Nullproben (Abb. 3.25, Abb. 3.26). Ein breiter Peak mit einem Maximum bei 6,29 min, entsprechend einem resultierenden Molekulargewicht von 3.768 g mol^{-1} , entstand neu. Die Peakfläche hatte einen relativen Anteil von 20,7 %. Gleichzeitig verringerte sich die Peakfläche bei 8,72 min auf einen relativen Anteil von 14,2 %.

Nach 6 Tagen (Abb. 3.28) und einem Verbrauch an H_2O_2 von $1,6 \text{ mmol}$ verschob sich das Peakmaximum des Peaks bei 6,29 min (Abb. 3.27) zu 6,05 min, was dem Molekulargewicht von $18.815 \text{ g mol}^{-1}$ entspricht. Die Peakfläche verringerte sich auf einen relativen Anteil von 6,5 %. Gleichzeitig nahm die Peakfläche und -höhe bei 17,49 min

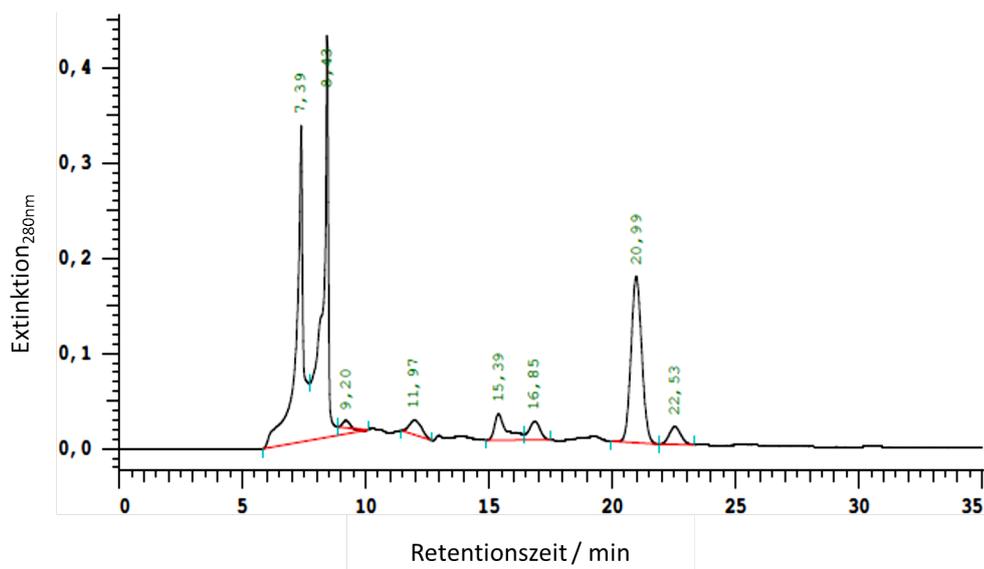


Abbildung 3.26: Nullprobe 2 mit inaktivem MsP1 nach 10 Tagen Inkubation und Zugabe von 0,3 mmol H_2O_2

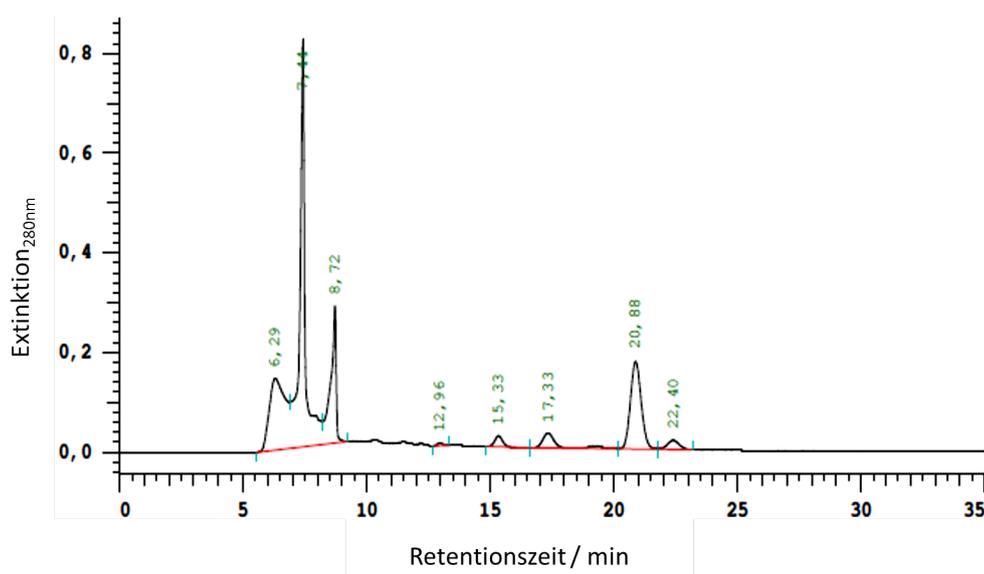


Abbildung 3.27: Probe 4 mit 250 U_{ABTS} MsP1 nach 7 Stunden Inkubation und Zugabe von 0,8 mmol H_2O_2

zu. Dies entsprach einer Retentionszeit nahe der von Coniferylalkohol ($180,2 \text{ g mol}^{-1}$).

Bei der Inkubation mit 1000 U MsP1, einer Inkubationszeit von 23 h und einem Verbrauch von 1,9 mmol (Abb. 3.29) wurde die Fläche des Peaks bei 7,41 min ($\sim 200 \text{ g mol}^{-1}$) kleiner und die Fläche der Peaks bei 15,36 min (2,6 % \rightarrow 4,9 %) und 17,17 min (7,6 % \rightarrow 10,4 %) minimal größer. Die Retentionszeit von 17,17 min entsprach $\sim 180 \text{ g mol}^{-1}$.

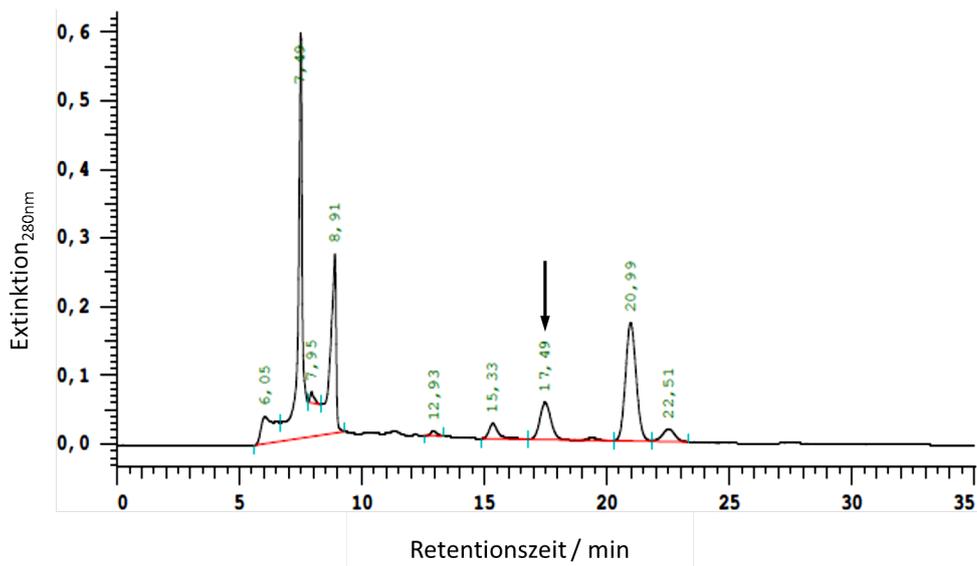


Abbildung 3.28: Probe 4 mit 250 U_{ABTS} MsP1 nach 6 Tage Inkubation und Zugabe von 1,6 mmol H_2O_2

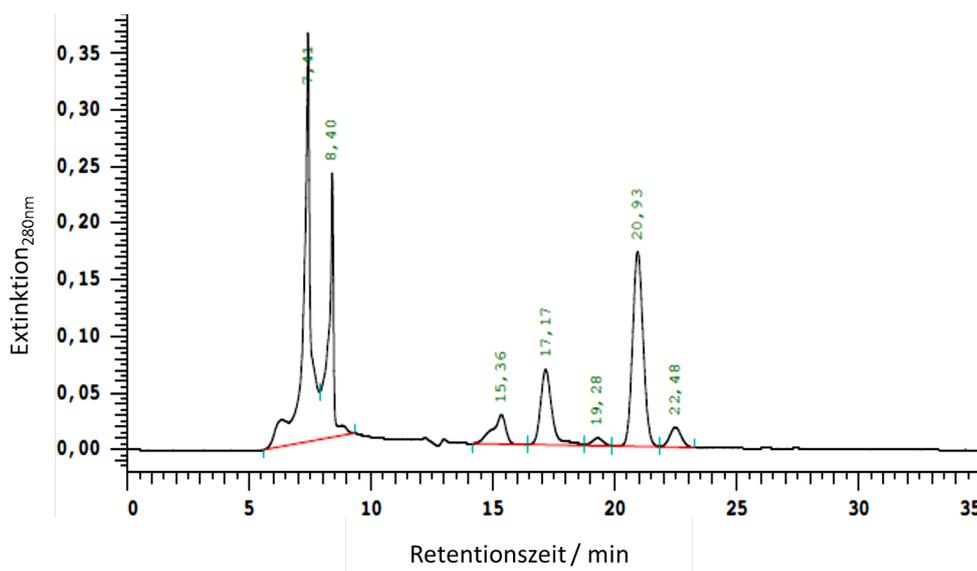


Abbildung 3.29: Probe 3 mit 1000 U_{ABTS} MsP1 nach 23 Stunden Inkubation und Zugabe von 1,9 mmol H_2O_2

Nach Verbrauch von 3,8 mmol H_2O_2 in 10 Tagen (Abb. 3.30) verringerte sich die Peakhöhe bei 8,67 min deutlich. Der Peak bei 7,49 min ($\sim 240 \text{ g mol}^{-1}$) zeigte sich als Hauptpeak, die Peakfläche hatte einen relativen Anteil von 42%.

Im Größenbereich zwischen $0,06 \mu\text{m}$ bis $1 \mu\text{m}$ wurden neue Partikel nachgewiesen. Aufgrund der Größenlücke zu dem zweiten Größenbereich zwischen $1 \mu\text{m}$ bis $15 \mu\text{m}$

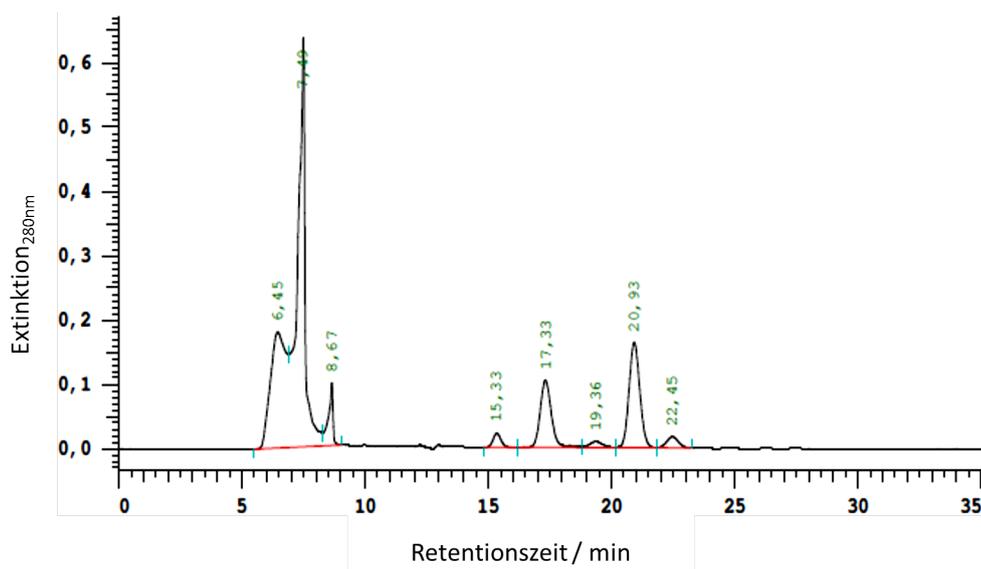


Abbildung 3.30: Probe 3 mit 1000 U_{ABTS} MsP1 nach 10 Tagen Inkubation und Zugabe von 3,8 mmol H₂O₂

könnten die Partikel im Größenbereich zwischen 0,06 μm bis 1 μm eine Polymerisation der gelösten Monomere und nicht eine Depolymerisation des suspendierten Lignins als Ursprung haben. Unterhalb von 240 g mol⁻¹ veränderte MsP1 die Monomere, sodass diese ein verändertes Retentionsverhalten in der HPSEC aufwiesen. Die genauen Molekulargewichte konnten jedoch mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da die Retentionszeiten der Moleküle unter 240 g mol⁻¹ außerhalb der Kalibrationsgerade lagen.

Elektronenmikroskopie

Organosolv Lignin wurde mit aktivem und inaktivem MsP1 und H₂O₂ inkubiert (Kapitel 2.7.4). Die Menge an verbrauchtem bzw. zugegebenem H₂O₂ betrug bei den inaktiven Proben 250 μmol und bei den aktiven Proben 1,15 mmol. Nach der Inkubation wurden die Suspensionen jeweils über ein Metallgewebefilter filtriert (Abbildung 3.31). Sowohl die Farbe als auch die Beschaffenheit des Pulvers haben sich nach der Reaktion mit MsP1 verändert. Das unbehandelte Lignin ist ein dunkelbraunes Pulver. Das behandelte Lignin wies eine sehr viel feinere Konsistenz auf. Die Farbe änderte sich ins Hellbraune mit rötlich-orangen Nuancen.

Um die Veränderungen genauer zu analysieren, wurden von den Filtrerrückständen elektronenmikroskopische Bilder aufgenommen. Die Proben wurden mit Gold beschichtet, um eine leitende Schicht zur Signalverstärkung zu erhalten. Die unbehandelten Ligninpartikel auf dem Bild (Abb. 3.32 A, B links) waren größer als 50 μm (Größenskala im Bild). Vereinzelt waren auch Ligninpartikel mit einem Durchmesser von ca. 10 μm zu sehen. Die Oberfläche der unbehandelten Ligninpartikel war scharfkantig. Im Vergleich dazu waren die mit MsP1 behandelten Ligninpartikel (Abb. 3.32 A, B, rechts) kleiner. Viele Partikel wiesen eine Größe in einem Bereich von 10 μm bis 20 μm auf. Zu sehen waren ebenfalls kleinere Ligninpartikel in einem Größenbereich von 0,5 μm bis 1 μm .

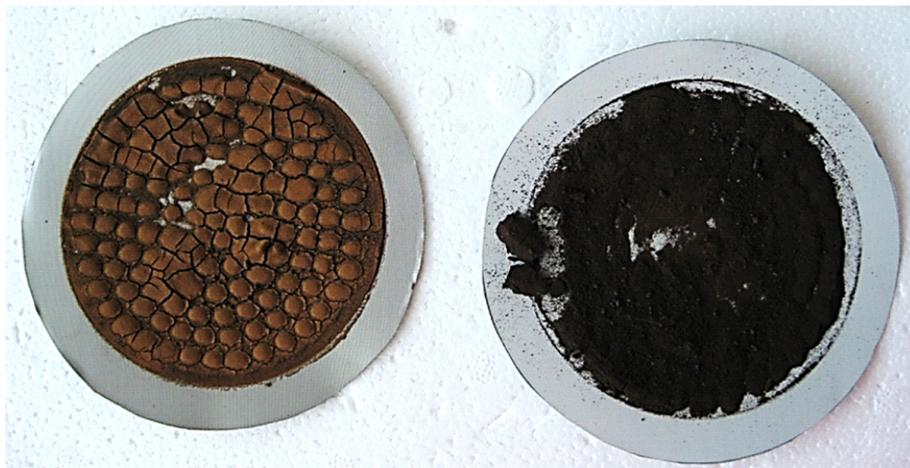


Abbildung 3.31: Filtrerrückstand der Filtration von organosolv Lignin nach Inkubation mit MsP1 und H_2O_2 . Links Probe mit aktivem MsP1, rechts Probe mit inaktivem MsP1

Diese Größenordnungen bestätigten die Ergebnisse aus der Partikelgrößenbestimmung (Abb. 3.24 C). Zusätzlich sahen die mit MsP1 behandelten Partikel rundlicher und glatter aus. Das Innere der Ligninpartikel sah bei den behandelten (Abb. 3.32 rechts) genau so porös wie bei den unbehandelten Ligninpartikeln (Abb. 3.32 links) aus.

3.2.2 Strohabbau

Es wurde untersucht, ob MsP1 auch Lignin in nativen Proben, hier Maisstroh, abbauen und dadurch den Kohlenhydratabbau durch Cellulasen unterstützen und die Ausbeute an Kohlenhydraten erhöhen kann. Hierfür wurde Maisstroh mit MsP1 und H_2O_2 vorbehandelt und dann mit Hydrolasen inkubiert.

Inhibierung der Cellulase GC220 durch Glucose und H_2O_2

Maisstroh wurde in Puffer und in glucosehaltigem Puffer mit Cellulase versetzt (Kapitel 2.7.5). In Abbildung 3.33 ist die neu entstandene Glucosemenge in den beiden Proben mit und ohne Glucosezugabe dargestellt. Bei der Hydrolyse der Cellulose mit Zugabe von Glucose betrug die entstandene Glucosemenge nur 60 % des Wertes der Probe ohne Zugabe von Glucose.

In Abbildung 3.34 sind die Kinetiken der Cellulase GC220 ohne H_2O_2 und mit $0,8 \text{ mmol L}^{-1} H_2O_2$ abgebildet. Die Aktivität der Cellulase sank unter Einfluss von H_2O_2 . Die resultierende Aktivitätsabnahme betrug 32 %.

Optimierung der Strohkonzentration bei der Hydrolyse durch Cellulase

Um herauszufinden, bei welcher Konzentration an Stroh in Puffer die höchste Verzuckerung erreicht wird, wurde der Celluloseverdau in Maisstroh durch Cellulase bei verschiedenen Strohkonzentrationen durchgeführt (Kapitel 2.7.6 Optimierung der Strohkonzentration). Konzentrationen von 0,25 bis 0,5 % (w/w) an Stroh in Puffer (Abb. 3.35)

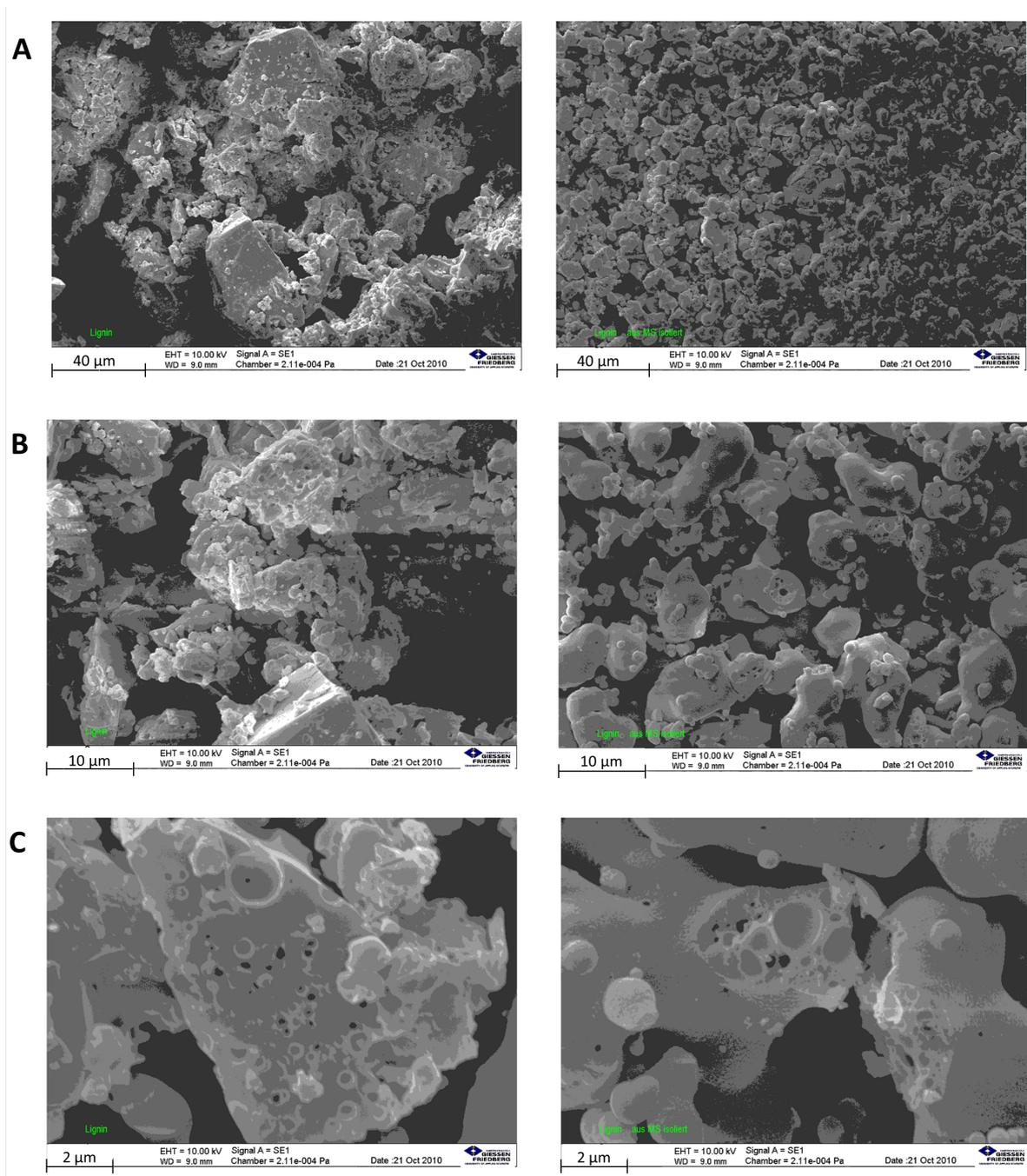


Abbildung 3.32: Elektromikroskopische Aufnahmen von organosolv Lignin bei verschiedenen Vergrößerungen.

Links: inaktives MsP1, rechts: aktives MsP1

ergaben die höchsten Ausbeuten bezogen auf die eingesetzte Strohmenge. Trotz einer zweiten Zugabe an Cellulase und einer Inkubation von 5 Tagen, betrug die Menge an Glucose nur ca. 16 %.

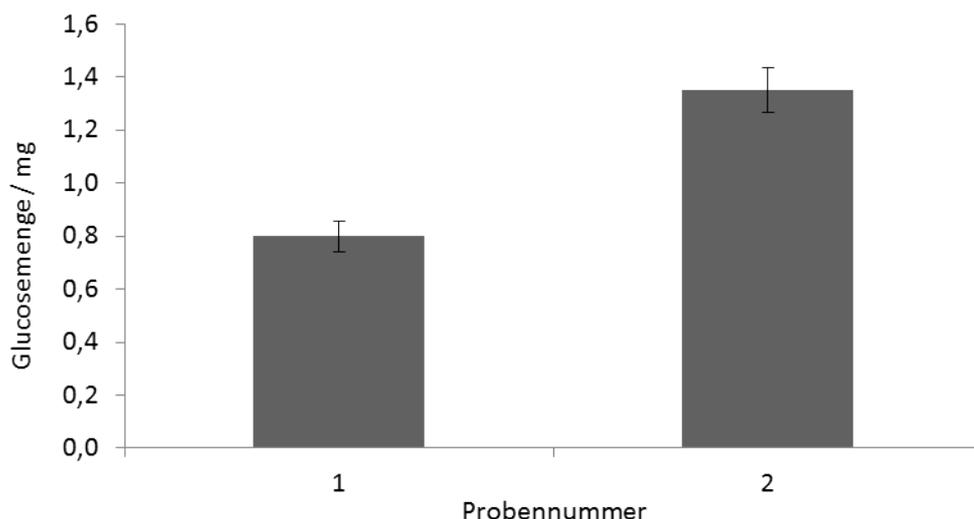


Abbildung 3.33: Vergleich der entstandenen Glucosemenge aus dem Strohabbau mittels Cellulase (nach rechnerischem Abzug der zugegebenen Glucosemenge).
1: Probe mit vorheriger Glucosezugabe, 2. ohne Glucosezugabe

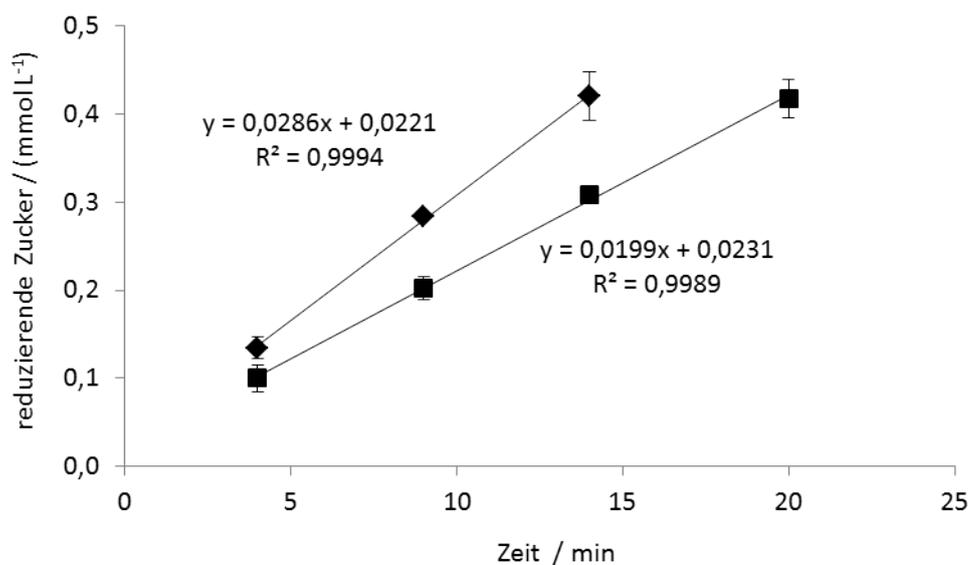


Abbildung 3.34: Kinetik der Cellulase GC220 in Abhängigkeit der H_2O_2 -Konzentration.
Raute: ohne H_2O_2 ; Viereck: mit $0,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$

MsP1-Kinetik mit Stroh als Substrat

Die Reaktion von MsP1 mit Maisstroh wurde über den Verbrauch an H_2O_2 nachgewiesen. Je mehr Stroh eingesetzt wurde, desto schneller wurde H_2O_2 verbraucht (Abbildung 3.36). Nach 3,5 min war in der Probe mit der geringsten Strohkonzentration noch keine Abnahme zu beobachten, bei den anderen beiden waren bereits ca. 40 % des H_2O_2 verbraucht. Beim Einsatz von $7 \text{ U}_{\text{ABTS}}$ MsP1 wurden in allen Proben $10 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ in 155 min fast vollständig verbraucht.

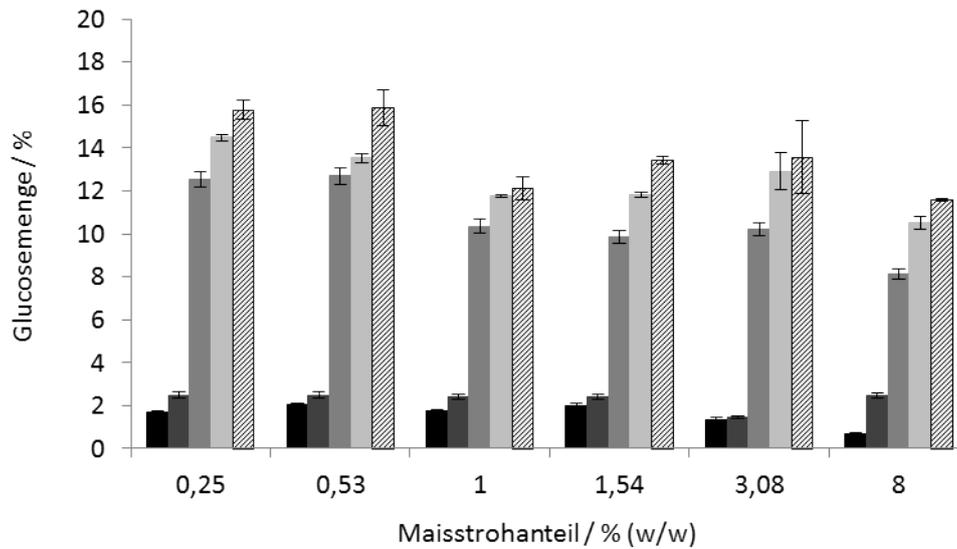


Abbildung 3.35: Entstandene Glucose als Gewichtsprozent bezogen auf die Stroheingewichte.
Schwarz: 0 h; dunkelgrau: 3,5 h; mittelgrau: 22 h; hellgrau: 48 h; schraffiert: 5 d

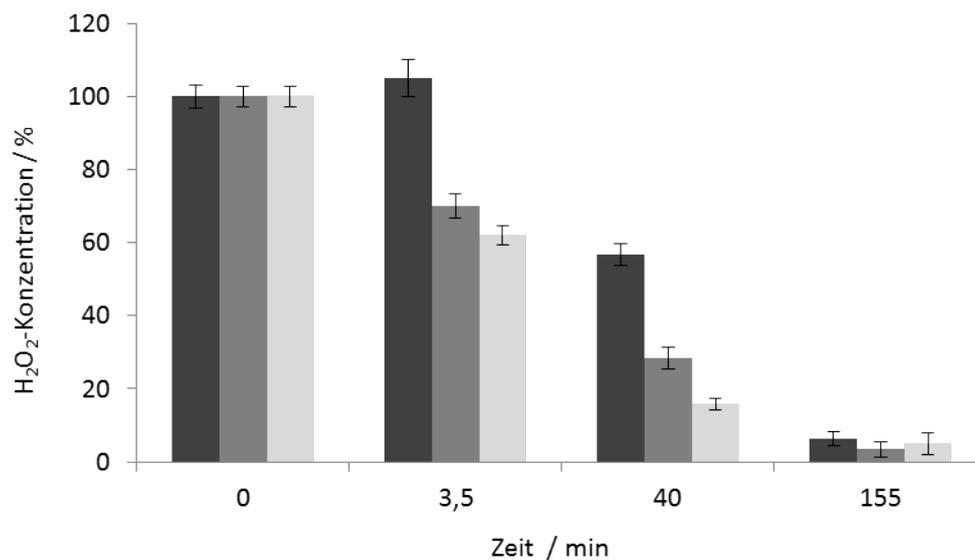


Abbildung 3.36: Prozentuale Abnahme der H₂O₂-Konzentration bei Stroh als Substrat von MsP1.
Dunkelgrau: 24,02 mg Stroh; mittelgrau: 45,81 mg Stroh; hellgrau: 78,92 mg Stroh

Saccharifizierung von mit MsP1 behandeltem Maisstroh

Mit MsP1 und H₂O₂ vorbehandeltes Stroh wurde mittels Cellulase, Pectinase und Xylanase hydrolysiert (Kapitel 2.7.6 Saccharifizierung). Die Experimente wurden durchgeführt, um grundsätzlich zu klären, ob der Zusatz von MsP1 als Vorbehandlungsmethode

für Stroh zur Erhöhung der Glucoseausbeute geeignet ist.

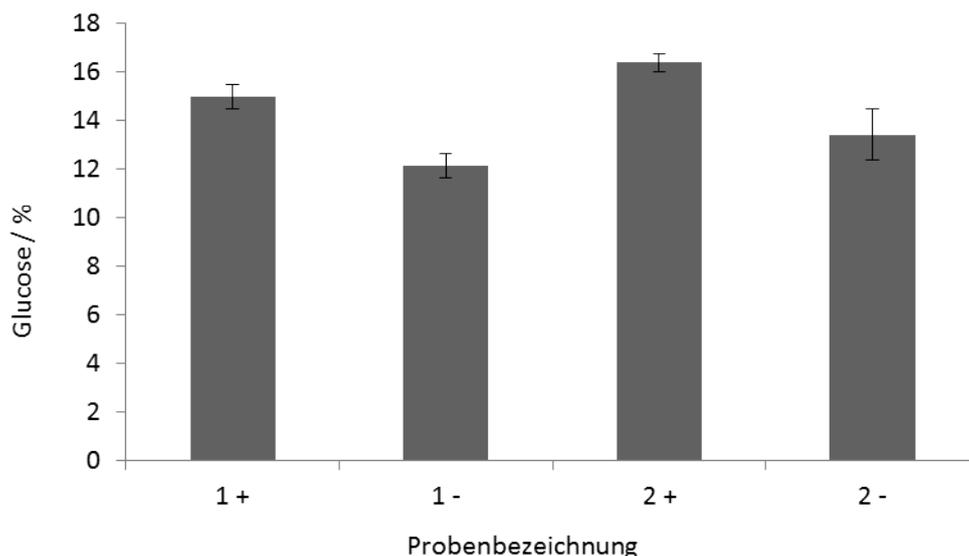


Abbildung 3.37: Entstandene Glucose aus Maisstroh als Gewichtsprozent des eingesetzten trockenen Strohs.

(+): mit MsP1/H₂O₂ vorbehandeltes Stroh; (-): mit MsP1 ohne H₂O₂ vorbehandeltes Stroh. 1: Hydrolyse des behandelten Strohs mit Cellulase. 2: Hydrolyse des behandelten Strohs mit Cellulase/Pectinase

Die Glucoseausbeute wurde bei den Hydrolysen mit Cellulase sowie Cellulase und Pectinase (Abb. 3.37) bei Einsatz von MsP1/H₂O₂ erhöht. Bei der Hydrolyse mit Cellulase konnte die Ausbeute um 18 % erhöht werden. Bei dem Einsatz von Pectinase und Cellulase als hydrolytische Enzyme konnte die Glucoseausbeute um 23 % gesteigert werden.

Bei den folgenden Experimenten wurde für die Hydrolyse von Stroh zusätzlich zur Cellulase eine Xylanase als Hilfsenzym eingesetzt. Da die Cellulase durch Glucose gehemmt wird, wurde die Cellulose- und Hemicellulosehydrolyse in zwei Schritten durchgeführt, nach jedem Schritt wurde das Stroh gewaschen (Kapitel 2.7.6 Saccharifizierung). Der Ligninabbau wurde durch MsP1/H₂O₂ realisiert. In beiden Hydrolyseschritten wurde jeweils ~10 % Glucose hergestellt.

In Abbildung 3.38 sind die prozentualen Anteile der Glucose bezogen auf die Stroheingabe aufgetragen. Bei dem Ansatz, welcher MsP1 mit H₂O₂ enthielt (A), konnte eine Steigerung der Glucoseausbeute von ~10 % gegenüber dem unbehandelten Stroh (B) erzielt werden.

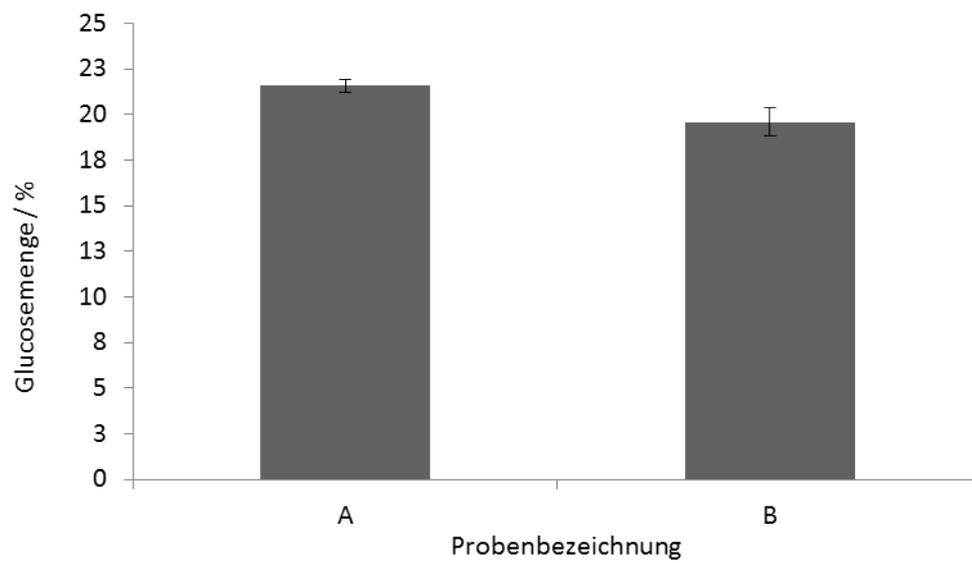


Abbildung 3.38: Aufgetragen sind die Glucosemengen nach Hydrolyse von Maisstroh mit Cellulase und Xylanase in Prozent bezogen auf die Einwaage von trockenem Stroh.

A: Stroh vorbehandelt mit MsP1/H₂O₂, B: Stroh vorbehandelt mit MsP1 ohne H₂O₂

3.3 Biochemische Charakterisierung von MsP1

3.3.1 Temperatur- und Druckoptimum

FT-IR-Messungen

Um die Änderung der Konformation von MsP1 in Abhängigkeit von Druck und Temperatur zu beobachten, wurde die Amid-I'-Bande bei Wellenzahlen von 1.700 cm^{-1} bis 1.600 cm^{-1} analysiert (Kapitel 2.8.1). Ein Beispiel für eine der entfalteten und gefitteten Amid-I'-Banden ist in Abbildung 3.39 (a) gezeigt. Die vier wichtigsten Unterbanden, die bei Wellenzahlen von 1.672 cm^{-1} , 1.657 cm^{-1} , 1.642 cm^{-1} , und 1.630 cm^{-1} zu messen sind, wurden über die zweite Ableitung der Spektren erhalten.

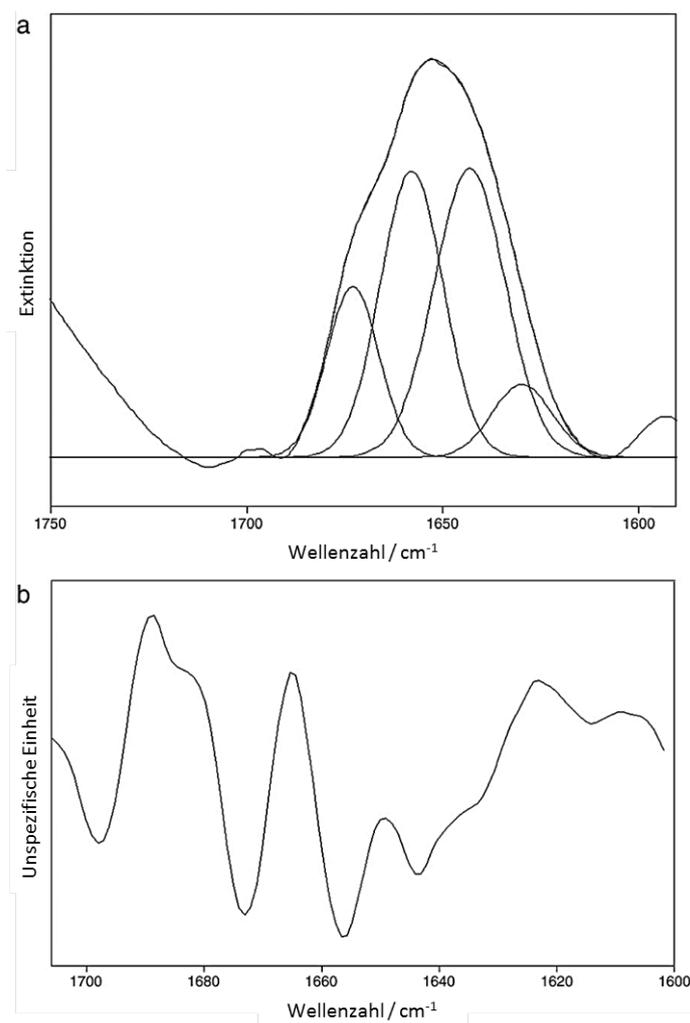


Abbildung 3.39: (a) Entfaltetes und gefittetes Amid-I'-FT-IR-Spektrum von MsP1 bei $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.
(b) Zweite Ableitung des Amid-I'-FT-IR-Spektrums von MsP1 bei $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Unterbanden können jeweils einer der Sekundärstrukturen wie Schleifen und

Turns, α -Helices, Zufallsknäuel und intramolekulare β -Faltblättern zugeordnet werden. Die Position der Unterbanden ändert sich nicht signifikant mit steigender Temperatur.

Die Sekundärstruktur von MsP1 (Abb. 3.40) ist größtenteils α -helikal mit Anteilen an Zufallsknäuel. Auch Schleifenstrukturen sowie intramolekulare β -Faltblätter sind vorhanden. Der relative Anteil dieser Strukturelemente liegt jedoch deutlich unter denen der α -Helices und der Zufallsknäuels. Mit steigender Temperatur sind keine offensichtlichen Änderungen der Bandenintegrale bis 65 °C zu sehen. Ab 65 °C nimmt der Anteil der α -helicalen Strukturen ab, während der Anteil an ungeordneten Strukturen zunimmt (Abb. 3.40). Gleichzeitig erscheint bei 70 °C ein neuer β -Faltblattanteil bei 1.617 cm^{-1} , welcher als eine intermolekulare β -Faltblattstruktur, die mit Proteinaggregatbildung einhergeht, interpretiert werden kann.

Die FT-IR-Messungen mit steigendem hydrostatischen Druck bei 60 °C (Abb. 3.41) zeigten, dass es keine Änderung der Sekundärstruktur gab. Gleiche Ergebnisse wurden mit den Hochdruckexperimenten bei 30 °C erhalten. Ein kleiner Anteil an Proteinaggregaten ist bereits bei Normaldruck zu sehen. Dies kann als Ergebnis der hohen Enzymkonzentration, die nötig für die spektroskopischen FT-IR-Messungen in der Diamantzelle ist, erklärt werden.

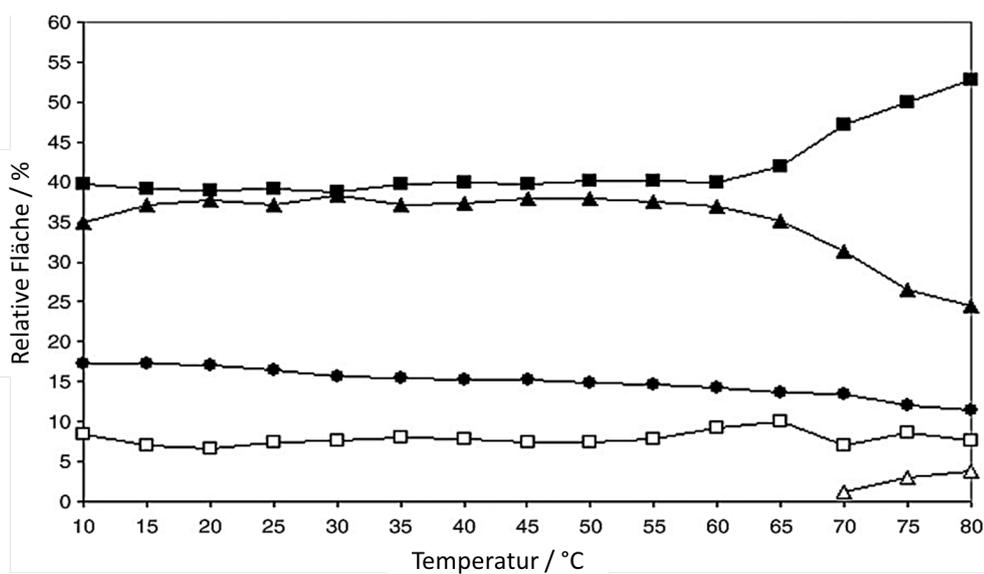


Abbildung 3.40: Temperaturabhängigkeit der relativen IR-Flächenanteile der Amid-I'-Teilbanden von MsP1.

Quadrat: Zufallsknäuel; Dreieck: α -Helices; Punkt: Schleifen; leeres Quadrat: intramolekulare β -Faltblätter; offenes Dreieck: intermolekulare β -Faltblätter.

Dynamische Differenzkalorimetrie

Bis 60 °C stieg die Wärmekapazität (Abb. 3.42) fast linear mit steigender Temperatur (im Vergleich zu dem proteinfreien Puffer). Ein Maximum der Wärmekapazität trat bei 63 °C auf, ab 78 °C nahm die Wärmekapazität abrupt ab.

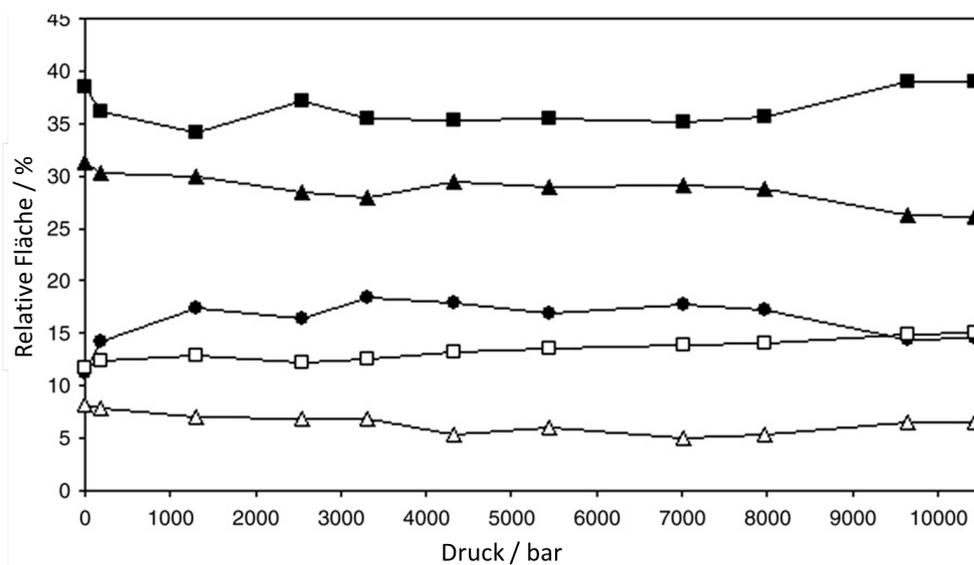


Abbildung 3.41: Druckabhängigkeit der Sekundärstrukturelemente von MsP1 bei 60 °C. Quadrat: Zufallsknäuel; Dreieck: α -Helices; Punkt: Schleifen; leeres Quadrat: intramolekulare β -Faltblätter; offenes Dreieck: intermolekulare β -Faltblätter.

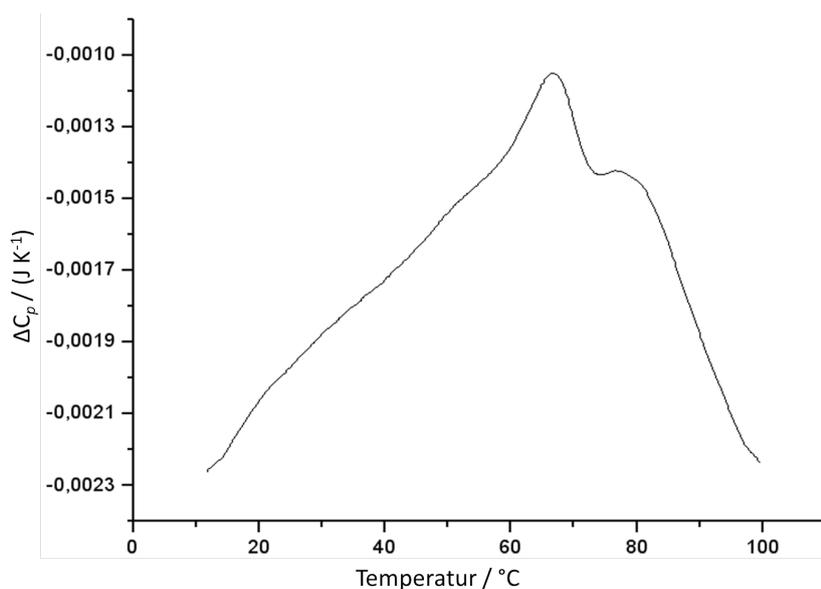


Abbildung 3.42: Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität einer MsP1-Lösung

Fluoreszenzspektroskopie

Das MsP1-Dimer beinhaltet acht Tryptophanreste, wobei in jedem Monomer jeweils vier vorkommen (UniProt, 2008). Diese sind an verschiedenen Stellen in der dreidimensionalen Struktur lokalisiert. Das Fluoreszenzspektrum des Proteins wurde als ein durchschnittliches Signal aller intrinsischen Fluorophore gemessen (Kapitel 2.8.1). Von 15 °C bis 50 °C wurde eine lineare Blauverschiebung des spektralen Schwerpunktes (CSM)

der Trp-Emission gemessen (Abb. 3.43). Ab 50 °C war eine deutliche Rotverschiebung zu beobachten, wobei bei 70 °C die Steigung in Abhängigkeit der Emissionswellenlänge von der Temperatur abnahm. Bei 63 °C wurde der Übergang zur Hälfte erreicht. Ein CSM-Wert von 357 nm bei 85 °C weist darauf hin, dass die Trp-Reste zwar zum Großteil, aber doch nicht vollständig frei lagen. Der CSM-Wert des komplett hydratisierten Tryptophans liegt bei 362 nm (Kato et al., 2003). Die Änderung der Steigung in der Rotverschiebung bei 68 °C kann als Ende der Dimerdissoziation interpretiert werden. Nach dieser begann die Proteinfaltung.

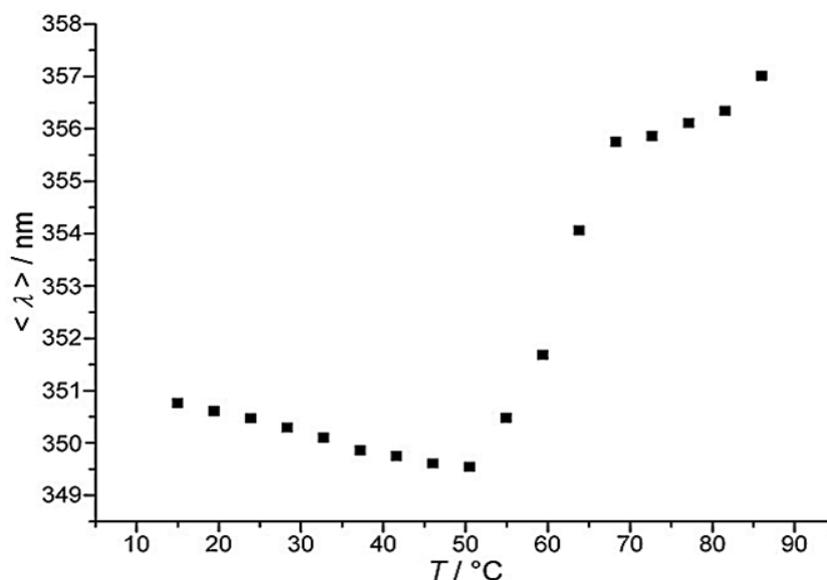


Abbildung 3.43: Temperaturabhängigkeit des spektralen Schwerpunktes der Trp-Fluoreszenz.

Die Messungen bei 30 °C und mit steigendem hydrostatischen Druck zeigten eine geringe, druckabhängige lineare Rotverschiebung des CSM-Wertes (Abb.3.44). Eine Abweichung der Linearität mit einer Änderung der Steigung trat zwischen 500 und 600 bar auf. Bei dieser Temperatur und einem Druck von 500 bar wurde ebenfalls ein Aktivitätsmaximum gemessen (Kapitel 3.3.2).

3.3.2 Temperatur- und Druckabhängigkeit der MsP1-Aktivität

Die MsP1-Aktivität gegenüber ABTS und β,β -Carotin wurde in Abhängigkeit von Temperatur und Druck gemessen (Kapitel 2.8.1). Die höchste Aktivität von MsP1 gegenüber ABTS (Abb. 3.45) war zwischen 55 °C und 60 °C zu beobachten. Die Abnahme der Aktivität über 60 °C ist mit den in der FT-IR-Spektroskopie gemessenen Konformationsänderungen jenseits 65 °C zu erklären. Bei 70 °C wurde noch eine Aktivität von ca. 3 % gemessen.

Für die Ermittlung der Druckstabilität von MsP1 wurden für die Aktivitätsbestimmung die Substrate ABTS und β,β -Carotin eingesetzt (Abb. 3.46).

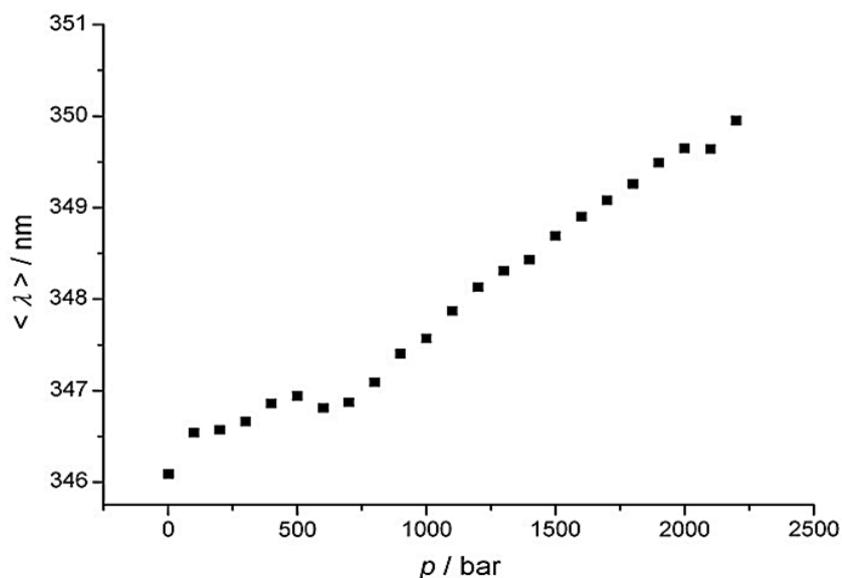


Abbildung 3.44: Druckabhängigkeit des spektralen Schwerpunktes der Trp-Fluoreszenz bei 30 °C.

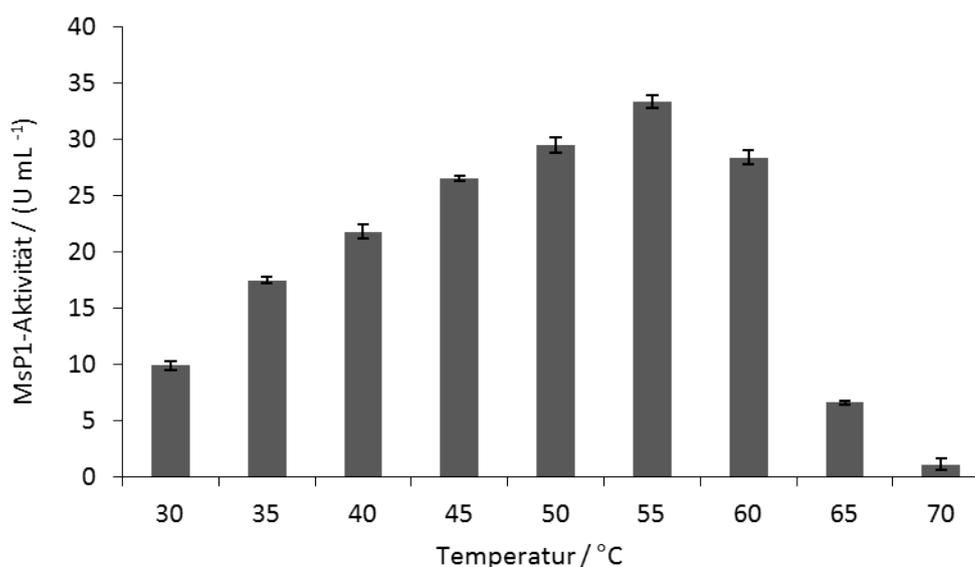


Abbildung 3.45: Temperaturabhängigkeit der MsP1-Aktivität bei der Oxidation von ABTS

Für beide Substrate wurde ein Aktivitätsmaximum bei 500 bar gefunden (Abb. 3.46). Hier wurde eine Verdoppelung der Aktivität im Vergleich zur Aktivität bei atmosphärischem Druck gemessen. Ab 800 bar nahm die Aktivität wieder ab, um für β,β -Carotin bei 2.300 bar und für ABTS bei 1.100 bar wieder die Aktivität, die bei Normaldruck zu messen war, zu erreichen. Bei 2.500 bar wurde nur ein sehr kleiner Aktivitätsverlust im Vergleich zur Aktivität bei Normaldruck gemessen.

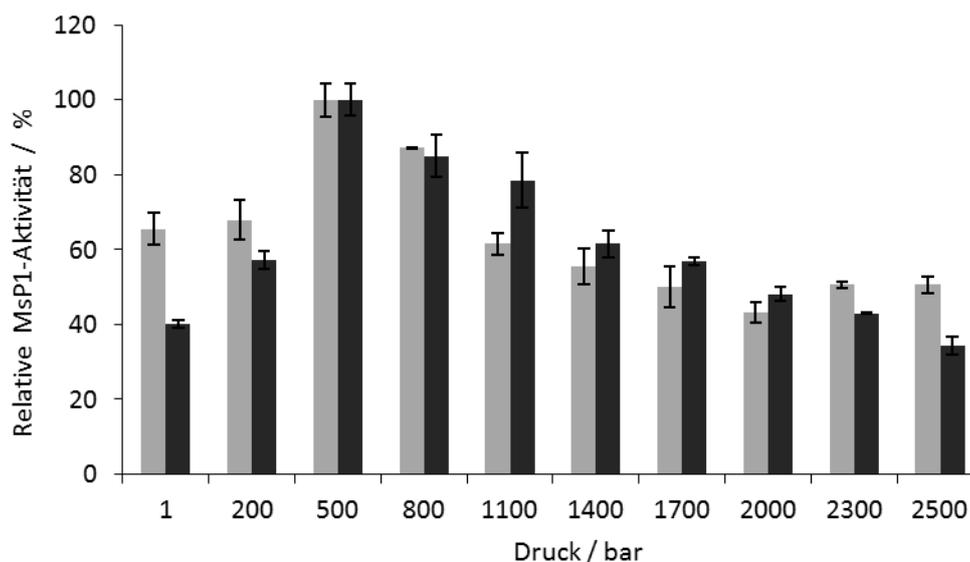


Abbildung 3.46: Druckabhängigkeit der MsP1-Aktivität bei der Oxidation von ABTS (hellgrau) und β,β -Carotin (dunkelgrau)

3.3.3 pH-Optimum der Reaktion von MsP1 mit β,β -Carotin

Die Aktivität gegenüber β,β -Carotin wurde in Abhängigkeit des pH-Wertes gemessen (Kapitel 2.8.2).

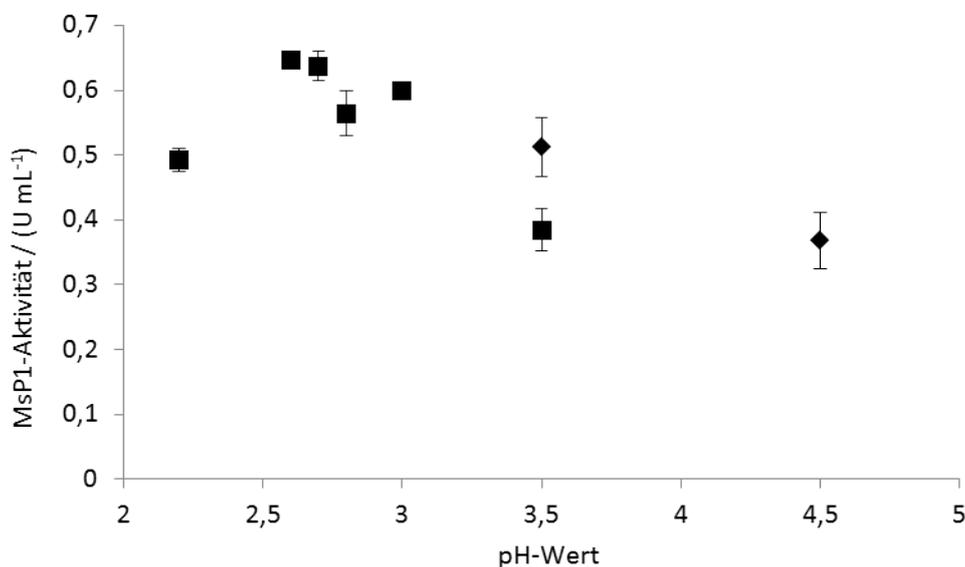


Abbildung 3.47: MsP1-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes und des verwendeten Puffers. Viereck: Glycinepuffer; Raute: Acetatpuffer

Die höchste Aktivität zeigte sich zwischen pH 2,6 und 2,7 (Abb. 3.47). Es wurden zwei verschiedene Puffersysteme benutzt. Glycine/HCL puffert in einem Bereich zwischen 2,2 und 3,6 und der Acetatpuffer zwischen 3,5 und 5,6. Vergleicht man die beiden

Aktivitäten bei pH 3,5 in den verschiedenen Puffern, zeigt sich, dass die Aktivität im Acetatpuffer um 30 % höher lag.

3.3.4 Lösemitteltoleranz von MsP1

Organosolv Lignin ist nicht wasserlöslich. Um Reaktionen mit in organischen Lösungsmitteln lösbarem Lignin (organosolv Lignin) durchführen zu können, wurde die Aktivität von MsP1 in verschiedenen organischen Lösungsmitteln untersucht (Kapitel 2.8.3). Der ABTS-Assay wurde so modifiziert, dass der Ansatz 10 %, 25 % oder 30 % Lösungsmittel und ein Teil der Proben 1,2 % PEG enthielt (Abb. 3.48).

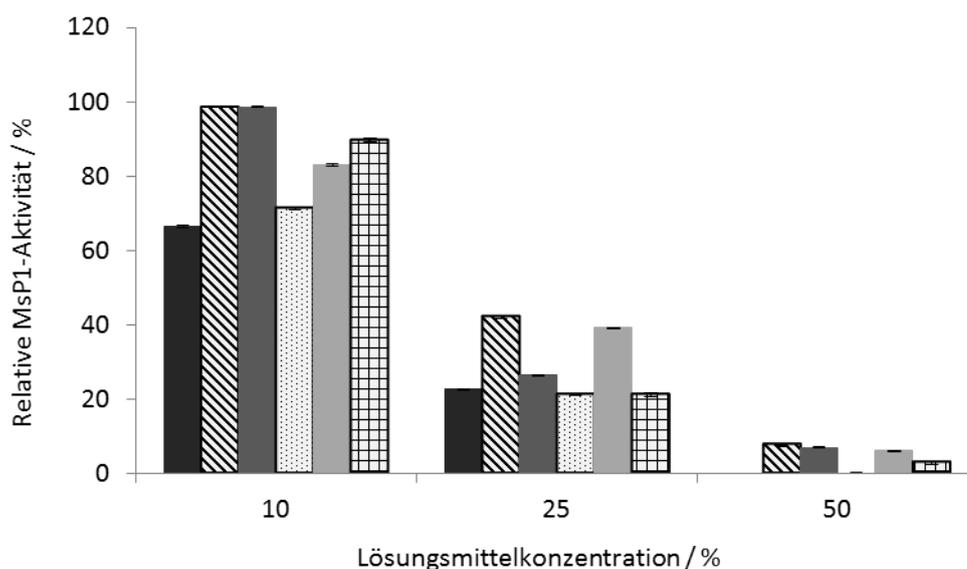


Abbildung 3.48: Vergleich der Aktivitäten im ABTS/H₂O₂-Assay von MsP1 in den verschiedenen Lösungsmitteln.

Dunkelgrau: Dioxan/1,2 % PEG; schraffiert: Aceton/1,2 % PEG; grau: Ethanol/1,2 % PEG; gepunktet: Dioxan; hellgrau: Aceton; kariert: Ethanol (100 %: Aktivität in 0,05 mol L⁻¹ NaAc-Puffer, pH 3,5).

MsP1 wurde in geringem Maße von PEG in organischen Lösungsmitteln stabilisiert. In Ethanol und Aceton behielt MsP1 seine Aktivität bei 10 % Lösungsmittel fast vollständig. In allen Lösungsmitteln war die Aktivität bei 50 % Lösungsmittelanteil sehr gering. Je nach Lösungsmittel blieb bei 25 % Lösungsmittelanteil eine Restaktivität von 40 bis 20 %.

3.3.5 Stabilität von MsP1 in Lösungsmitteln

MsP1 wurde in einem Ansatz, der 25 % organisches Lösungsmittel enthielt, über 4 Tage bei 40 °C inkubiert. Die Aktivität wurde jeden Tag gemessen (Abb. 3.49). Eine Inkubation über einen Tag in 25 % Aceton und 25 % Ethanol führte zu einem Aktivitätsverlust von 15 % bzw. 25 %. In diesen Lösungsmitteln war eine Aktivität von 20 bis 30 % noch nach 4 Tagen zu messen. Somit können Verdauexperimente mit MsP1 sowohl in Aceton als auch in Ethanol über mehr als 24 h durchgeführt werden.

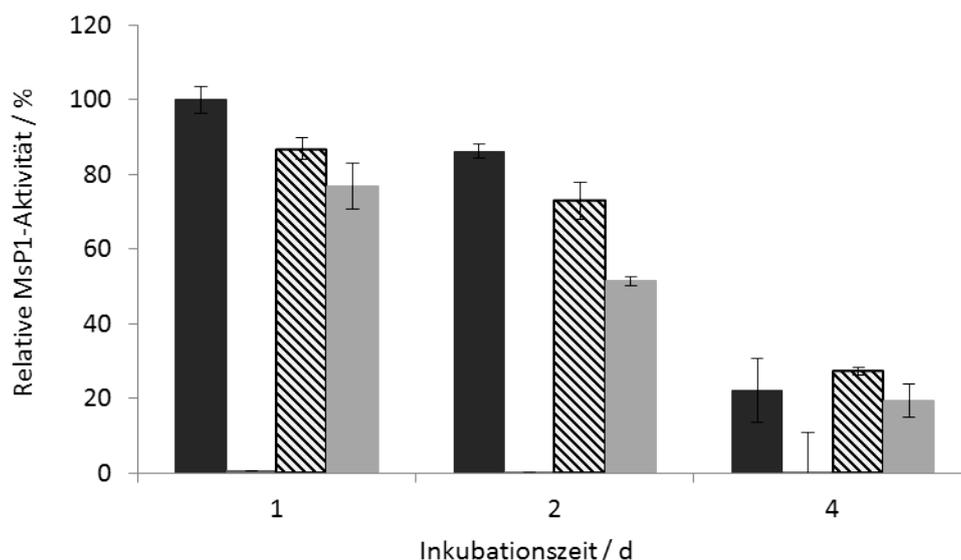


Abbildung 3.49: Lagerungsstabilität von MsP1 in verschiedenen Lösungsmitteln (25%ig in Wasser).

Dunkelgrau: Wasser; mittelgrau: Dioxan; schraffiert: Aceton; hellgrau: Ethanol. Die prozentuale Aktivität ist bezogen auf die Startaktivität der MsP1-Lösungen (100%).

3.3.6 H₂O₂-Toleranz

Einfluss von H₂O₂ auf die MsP1-Aktivität

Die Aktivität von MsP1 wurde in Abhängigkeit der H₂O₂-Konzentration bei drei verschiedenen ABTS-Konzentrationen gemessen (Kapitel 2.8.5). Die Aktivität (Abb. 3.50) stieg mit der H₂O₂-Konzentration bis zu einem maximalen Wert. Die höchste Aktivität wurde jeweils erreicht, wenn die H₂O₂-Konzentration der eingesetzten ABTS-Konzentration entsprach. Wurde die H₂O₂-Konzentration weiter erhöht, nahm die Aktivität ab.

Die Änderung der kinetischen Konstanten wurde bei verschiedenen Mischungsverhältnissen der beiden Substrate ABTS und H₂O₂ untersucht. Hierzu wurden die Kinetiken in einem Konzentrationsbereich von 0,025 mmol L⁻¹ bis 0,1 mmol L⁻¹ ABTS und jeweils der 0,25 fachen, 0,5 fachen, 1 fachen, 2 fachen, 4 fachen und 10 fachen Konzentration an H₂O₂ durchgeführt (Kapitel 2.8.5).

Je höher die Konzentration der beiden Substrate war, desto höher war die Enzymaktivität (Abbildung 3.51). Bei den Verhältnissen von 4:1 und 10:1 von H₂O₂ zu ABTS (Abb. 3.51) war die Aktivität im Vergleich zu den Verhältnissen 2:1 bis 1:4 insgesamt höher. Bei den Verhältnissen 4:1 und 10:1 sank die Umsatzgeschwindigkeit mit Erhöhung der Substratkonzentration und folgte somit nicht mehr der Michaelis-Menten-Kinetik (Michaelis und Menten, 1913). Ab diesem Punkt begann der H₂O₂-Konzentrationsbereich, in dem die Hemmung durch H₂O₂ größer war als die Geschwindigkeitssteigerung durch erhöhte Substratzugabe. Die H₂O₂-Konzentration betrug 0,1 bis 1 mmol L⁻¹. Vergleicht man die Verhältnisse unter 1 (0,25 (Raute) und

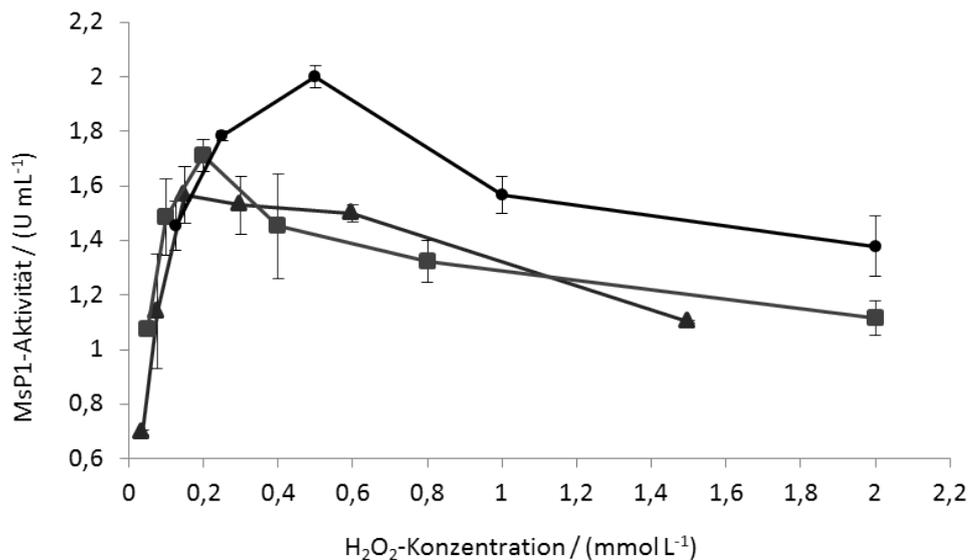


Abbildung 3.50: MsP1 Aktivität gegenüber ABTS in Abhängigkeit der H₂O₂-Konzentration.
 ABTS-Konzentrationen: Dreieck: 0,15 mmol L⁻¹; Viereck: 0,2 mmol L⁻¹;
 Punkt: 0,5 mmol L⁻¹

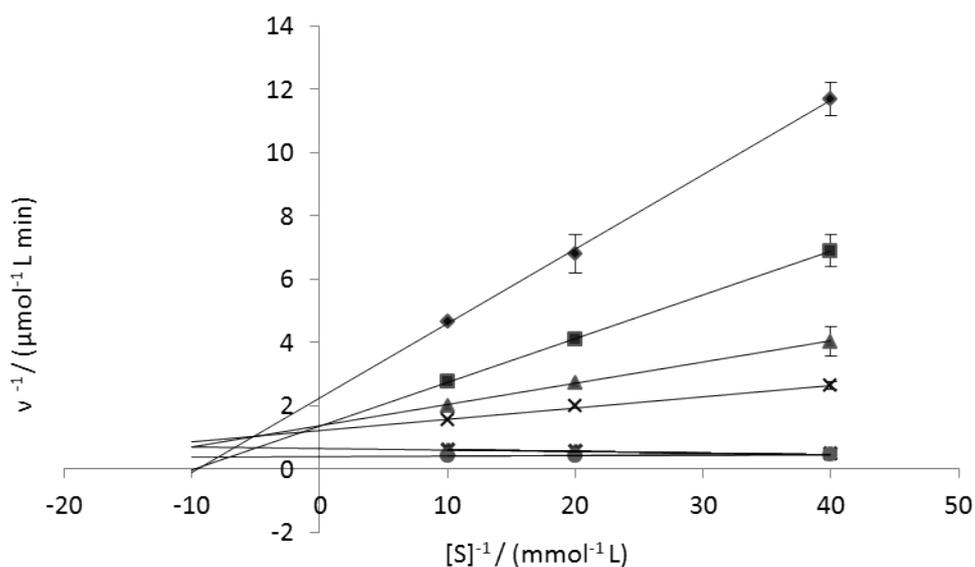


Abbildung 3.51: MsP1-Aktivität in Abhängigkeit der H₂O₂- und ABTS-Konzentration.
 Der Test wurde bei verschiedenen Mischungsverhältnissen von H₂O₂ zu ABTS durchgeführt.
 Raute: 1:4; Viereck: 1:2; Dreieck: 1:1; X: 2:1; Stern: 4:1; Punkt: 10:1.

0,5 (Viereck) in Abb. 3.51) verändert sich unter Erhöhung des Verhältnisses v_{max} . K_m bleibt jedoch fast gleich. Bei den Verhältnissen 0,5 bis 2 bleibt v_{max} fast identisch, K_m jedoch wird kleiner, was bedeutet, dass die Höchstumsatzrate nicht verändert wird, aber weniger Substrat zugegeben werden muss, um diese zu erreichen, da beide Substrate

gleichzeitig in ausreichender Menge vorliegen.

Die oben genannten Kinetiken wurden für 10 min im Fließgleichgewicht aufgenommen. Je höher die H_2O_2 -Konzentration war und je länger die Reaktion lief, desto größer war der hemmende Effekt von H_2O_2 auf die Reaktionsgeschwindigkeit (Abb. 3.52B). Lag eine geringere H_2O_2 -Konzentration vor, so bestanden auch bei längerer Reaktionszeit kaum Unterschiede in der Geschwindigkeit während der aufgenommenen Kinetik. Somit befand sich die Kinetik bis zu 25 min lang im Fließgleichgewicht.

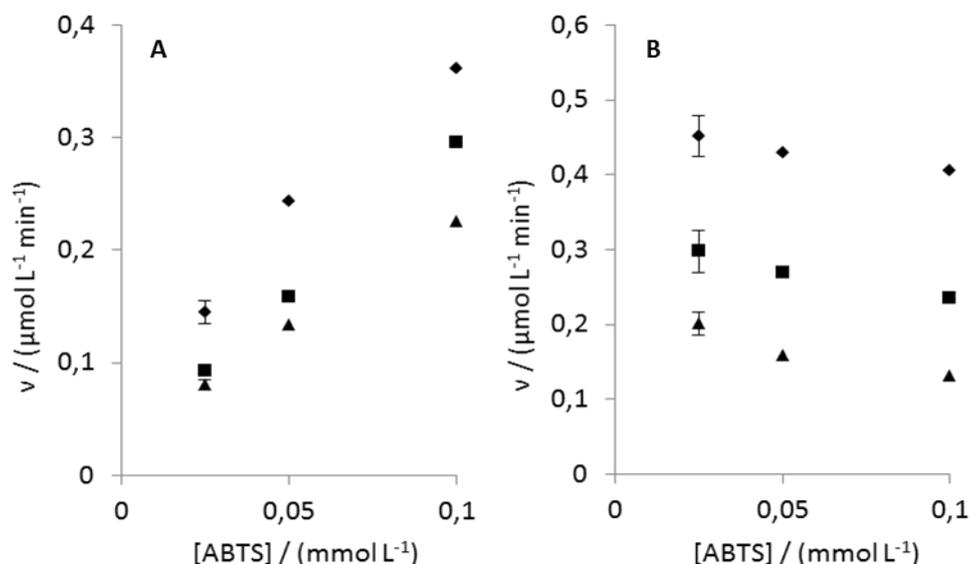


Abbildung 3.52: MsP1-Aktivität in Abhängigkeit der H_2O_2 -Konzentration und ABTS-Konzentration.

A: $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{ABTS}]=1:2$; B: $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{ABTS}]=10:1$. Reaktionsgeschwindigkeit gemessen in folgenden Zeitabschnitten: Raute: 0 bis 8 min, Viereck: 8 bis 15 min, Dreieck: 15 bis 25 min.

3.3.7 Bestimmung der kinetischen Konstanten von MsP1

Reinigung von MsP1

Zur Aufnahme der Kinetiken von MsP1 und der Bestimmung der Wechselzahl k_{cat} , wurde MsP1 weiter gereinigt (Kapitel 2.8.6). Nach der Ammoniumsulfatfällung folgte eine Größenausschlusschromatographie.

Ammoniumsulfatfällung Durch die Fällung (SDS-PAGE in Abb. 3.53) wurden Proteine (85 kDa und 120 kDa), die in der Spur 3 in dem Überstand der 70 %igen-Fällung zu sehen sind, sowie die im Sediment der 45 %igen Fällung (Spur 2) verbleibenden Proteine unterhalb 25 kDa in der Probenlaufront entfernt. In Spur 4, in die das ausgefällte MsP1 (Bande zwischen 65 und 70 kDa) aufgetragen wurde, waren die Proteine mit den erwähnten Molekulargewichten nicht mehr zu detektieren.

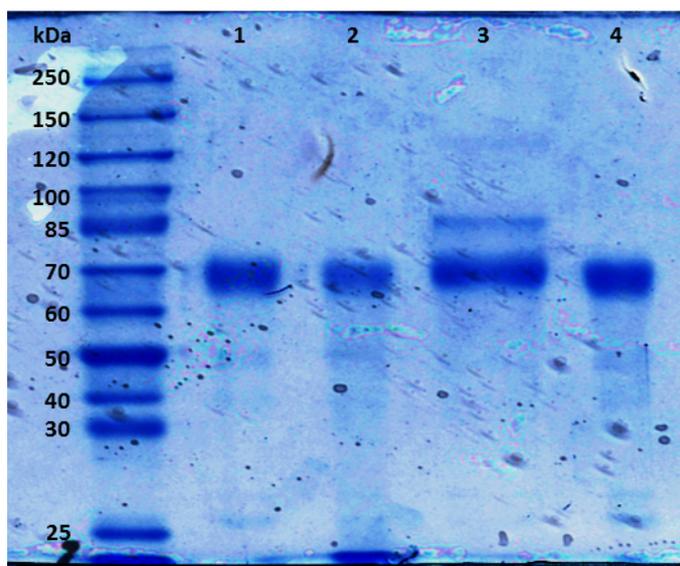


Abbildung 3.53: SDS-PAGE der Fraktionen aus der Ammoniumsulfat-Fällung von MsP1.

1: Originalprobe MsP1 (1:400); 2: Sediment 45 % Fällung (1:30); 3: Überstand 70 % Fällung (1:10); 4: Sediment 70 % Fällung MsP1 (1:300)

Größenausschlusschromatographie Als zweiten Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) (Abb. 3.54) durchgeführt. In den Fraktionen 30 bis 38 war die Proteinkonzentration am höchsten. In den Fraktionen 27 bis 33 wurde MsP1-Aktivität gemessen, wobei die höchste spezifische Aktivität in Fraktion 27 vorlag. Von den sieben Fraktionen mit Aktivität wurden die Spektren von 250 nm bis 450 nm aufgenommen und die Reinheitszahl bestimmt sowie eine SDS-PAGE (Abb. 3.55) angefertigt.

In Tabelle 3.2 sind die spezifischen Aktivitäten und die zugehörigen Reinheitszahlen der MsP1-Ausgangspolprobe, der MsP1-beihaltenden Fraktionen aus der Ammoniumsulfatfällung sowie der SEC aufgelistet. In der Fraktion 28 der SEC wurde die fünfmalige spezifische Aktivität im Vergleich zur Ausgangspolprobe detektiert.

Tabelle 3.2: Spezifische Aktivitäten (β,β -Carotin) und Reinheitszahlen der MsP1-Fraktionen nach verschiedenen Reinigungsschritten

Probe	spez. Aktivität U mg^{-1}	RZ
MsP1-Ausgangspolprobe	0,066	0,094
Sediment der 70 %igen Fällung	0,08	0,197
Fraktion 28	0,34	2,2
Fraktion 29	0,24	2,7

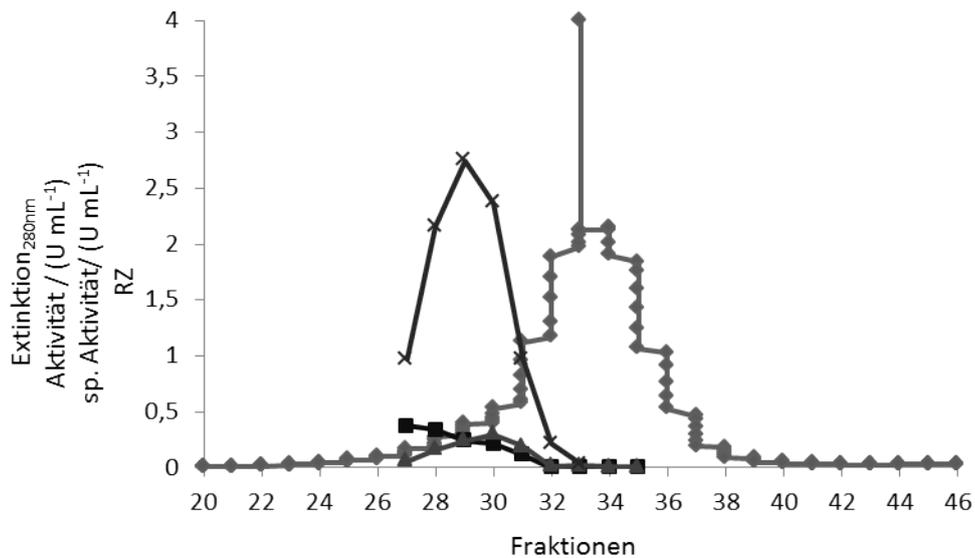


Abbildung 3.54: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von MsP1 nach der Ammoniumsulfatfällung.

Raute: Extinktion bei 280 nm; Dreieck: Aktivität; Viereck: spezifische Aktivität; X: Reinheitszahl

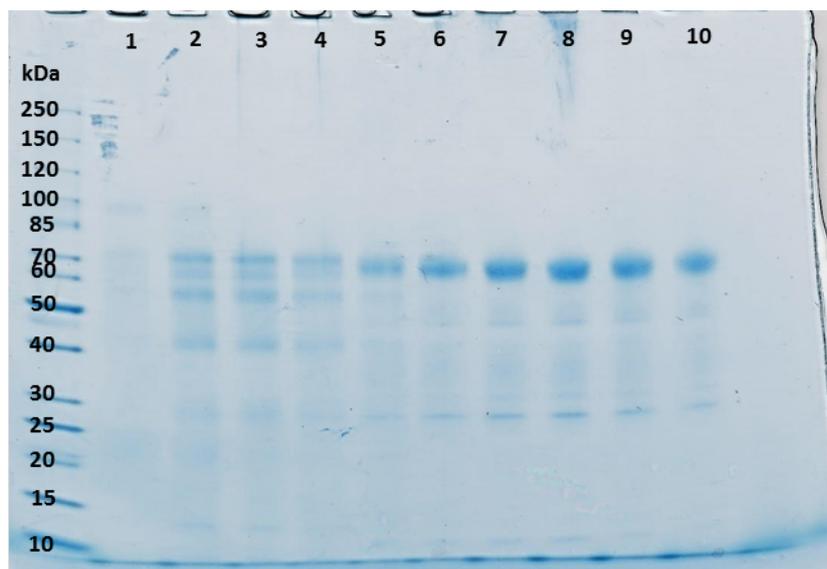


Abbildung 3.55: SDS-PAGE der Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie zu Reinigung von MsP1.

1: Fraktion 27; 2: Fraktion 28; 3: Fraktion 29 (1:2); 4: Fraktion 30 (1:3); 5: Fraktion 31 (1:4); 6: Fraktion 32 (1:7); 7: Fraktion 33 (1:10); 8: Fraktion 34 (1:10); 9: 70S, gefälltes MsP1(1:400); 10: original MsP1-Probe (1:400)

Mit der Geradengleichung des Logarithmus des Molekulargewichtes ($\log M_W$) nach dem Rf-Wert der Proteine des molekularen Markers ($y = (-1,34 \pm 0,02)x + (2,385 \pm$

0,008)) lassen sich die Molekulargewichte der einzelnen Banden der verschiedenen MsP1-Fractionen (Abb. 3.55) bestimmen. Für die Fraktion 28 in Spur 2 ergaben sich für die intensivsten Banden die Molekulargewichte 70 kDa, 63,5 kDa, 56 kDa und 41 kDa. Ab Fraktion 31 (Spur 5) war eine Bande bei 65 kDa zu sehen. Die Bande bei 70 kDa konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Zusätzlich kamen noch in Spur 6 bis 10 Proteine mit dem Molekulargewicht von 30 kDa und 26,5 kDa vor.

Die Reinheitszahl war bei Fraktion 29 am höchsten. Bei Fraktion 28 war die spezifische Aktivität höher als bei Fraktion 29. Fraktion 28 wurde zur Bestimmung der kinetischen Konstanten herangezogen.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Kalibration wurde mit gereinigtem MsP1 (Kapitel 2.8.9) durchgeführt (Gl. 3.1). Für die Aufnahme der Abhängigkeit des Quotienten der Extinktion bei 590 nm zu 450 nm von der errechneten Proteinkonzentration ($30 \mu\text{g L}^{-1}$ bis $220 \mu\text{g L}^{-1}$) wurden 7 Kalibrierpunkte verwendet. Daraus ergab sich folgende Kalibrationsgerade:

$$y = (0,0067 \pm 0,0002)x + (0,49 \pm 0,02) \quad (3.1)$$

Im Vergleich mit der Kalibration mit BSA ergab sich bei der Berechnung der Proben mit der Kalibration mit MsP1 eine drei Mal höhere Proteinkonzentration in der MsP1-Probe. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der SEC-Fraktion 28 wurde bei einer Verdünnung von 1:20 durchgeführt. Die Verdünnung wurde zweimal hergestellt, für jede Verdünnung erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung. Für die Verdünnungen, die in den Kinetikmessungen für β,β -Carotin genutzt wurden, ergaben sich folgende Proteinkonzentrationen: Verdünnung I besaß eine Proteinkonzentration von $24,9 \pm 2,2 \mu\text{g L}^{-1}$ und die Verdünnung II $24,2 \pm 2,2 \mu\text{g L}^{-1}$. Daraus ergab sich eine Proteinkonzentration von $491 \pm 30 \mu\text{g L}^{-1}$ für die unverdünnte Fraktion 28.

Bestimmung der kinetischen Konstanten

Die Wechselzahl, die Michaelis-Menten-Konstante und die maximale Umsatzgeschwindigkeit von MsP1 wurde mittels Messung der Kinetik gegenüber ABTS (Abb. 3.56) und β,β -Carotin (Abb. 3.57) bestimmt. Da bei der Bestimmung der kinetischen Daten für ABTS und β,β -Carotin das zweite Substrat, H_2O_2 , im Überschuss vorliegen muss, wurde die Messung mit einer Konzentration von $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ durchgeführt. Die Maximalgeschwindigkeiten (v_{max}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) sind für ABTS in Tabelle 3.3 und für β,β -Carotin in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Aus der eingesetzten Enzymkonzentration $[E]$ und den kinetischen Daten lässt sich nach Gleichung 3.2 die Wechselzahl von MsP1 für beide Substrate berechnen, sowie daraus folgend die Effizienz (Tab. 3.5). β,β -Carotin wurde wesentlich langsamer (um den Faktor ~ 460) umgesetzt als ABTS.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{[E]} \quad (3.2)$$

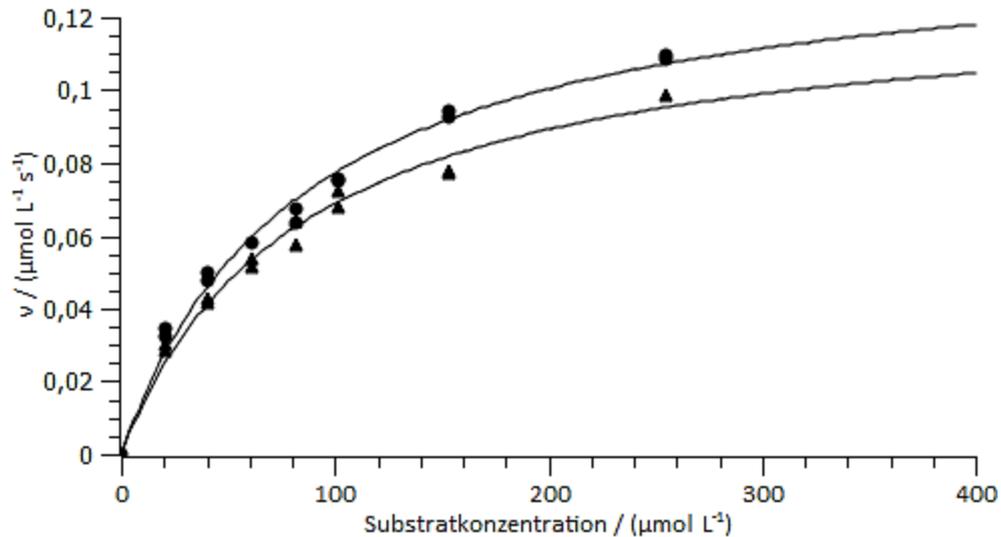


Abbildung 3.56: Kinetik von MsP1 (Fraktion 28) mit ABTS als Substrat mit einer H_2O_2 -Konzentration von $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.
Punkt: Verdünnung I; Dreieck; Verdünnung II

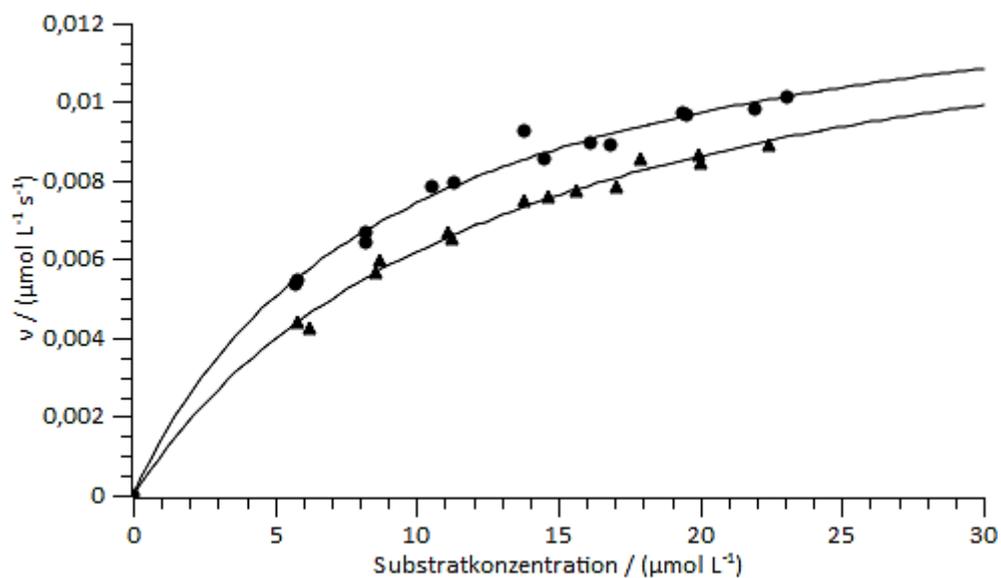


Abbildung 3.57: Kinetik von MsP1 (Fraktion 28) mit β,β -Carotin als Substrat mit einer H_2O_2 -Konzentration von $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.
Punkt: Verdünnung I; Dreieck; Verdünnung II

3.4 Nutzung verschiedener Mediatoren zur Steigerung der MsP1-Aktivität

Die Wirkung von Ligninabbauprodukten wie Ferulasäureethylester, 4-Ethylphenol, *p*-Coumarsäure und Coniferylalkohol auf die Aktivität von MsP1 wurde untersucht.

Tabelle 3.3: Maximalgeschwindigkeiten und Michaelis-Menten-Konstanten für ABTS/H₂O₂ als Substrat

Verdünnung	$v_{max} / \mu\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$	$K_m / \mu\text{mol L}^{-1}$
I	$0,1432 \pm (0,01 \%)$	$85,41 \pm (0,03 \%)$
II	$0,1267 \pm (0,01 \%)$	$84,04 \pm (0,03 \%)$

Tabelle 3.4: Maximalgeschwindigkeiten und die Michaelis-Menten-Konstante für β,β -Carotin/H₂O₂ als Substrat

Verdünnung	$v_{max} / \mu\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$	$K_m / \mu\text{mol L}^{-1}$
I	$0,01421 \pm (0,0007 \%)$	$12,930 \pm (0,002 \%)$
II	$0,01409 \pm (0,0009 \%)$	$8,9249 \pm (0,002 \%)$

Tabelle 3.5: Wechselzahl und Effizienz von MsP1 gegenüber β,β -Carotin/H₂O₂ und ABTS/H₂O₂ als Substrat

Substrat	k_{cat} / s^{-1}	$k_{cat}/K_m / \text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$
β,β -Carotin	$0,38 \pm (6,6 \%)$	$34211 \pm (7,7 \%)$
ABTS	$176 \pm (6,2 \%)$	$3,3 * 10^6 \pm (8 \%)$

3.4.1 Enzymaktivität von MsP1 gegenüber Ferulasäureethylester

Um eine mögliche Reaktion von MsP1/H₂O₂ mit Ferulasäureethylester (FSEE) nachzuweisen, wurden in einem Zeitraum zwischen 24 s und 1.730 s die UV/VIS-Spektren aufgenommen (Kapitel 2.9.1). In Abbildung 3.58 werden die sich bei der Reaktion verändernden Extinktionen bei den jeweiligen Wellenlängen dargestellt. Die Extinktion bei 322 nm nahm während der Reaktion ab und die Extinktion bei 212 nm zu. Die Extinktion bei 244 nm nahm ebenfalls ab, im Vergleich mit der Extinktion bei 322 nm jedoch in geringerem Maße.

3.4.2 Enzymaktivität von MsP1 und Laccase gegenüber Coniferylalkohol

Die Umsetzung von Coniferylalkohol mit Laccase aus *Trametes versicolor* bzw. MsP1 wurde mittels Aufnahme der UV/VIS-Spektren beobachtet (Kapitel 2.9.2). Coniferylalkohol wurde jeweils mit MsP1 und Laccase versetzt. Zusätzlich wurde jeweils in einer Probe ABTS als bekannter Laccase-Mediator zugesetzt. Die jeweilige Probenbezeichnung ist in der Tabelle 3.6 aufgelistet.

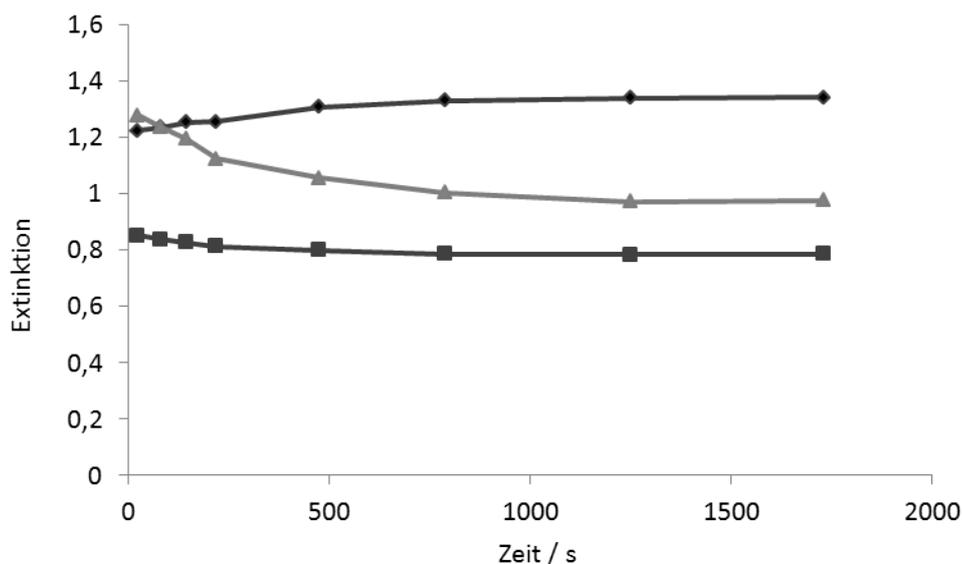


Abbildung 3.58: Auftragung der Extinktion bei der Reaktion von MsP1 mit Ferulasäureethylester, gemessen bei drei verschiedenen Wellenlängen. Raute: 212 nm; Viereck: 244 nm; Dreieck: 322 nm

Tabelle 3.6: Probenbezeichnung bei der Umsetzung von Coniferylalkohol mit Laccase aus *Trametes versicolor* bzw. MsP1

Probe	Enzym	2tesSubstrat	Mediator
1	Laccase _{inaktiv}	-	-
2	Laccase _{aktiv} (2 U)	-	-
3	Laccase _{aktiv} (2 U)	-	ABTS
4	MsP1 _{inaktiv}	H ₂ O ₂	-
5	MsP1 _{aktiv} (2,5 U)	H ₂ O ₂	-
6	MsP1 _{aktiv} (2,5 U)	H ₂ O ₂	ABTS

Coniferylalkohol besaß Extinktionsmaxima bei 214 nm und 264 nm. 5 min (Abb. 3.60) nach Zugabe der Laccase nahm die Extinktion bei den Proben 2 und 3 bei 214 nm und 264 nm im Vergleich zum Startwert (Abb. 3.59) ab. Ein neues Extinktionsmaximum trat bei 202 nm auf. Nach 40 min (Abb. 3.61) sank die Extinktion in Probe 2 bei 202 nm wieder und stieg bei 258 nm und den Wellenlängen zwischen 280 nm bis 400 nm an. Nach 20 h (Abb. 3.62) trat ein Extinktionsmaximum bei 414 nm auf, bei dieser Wellenlänge absorbiert das ABTS-Radikalkation (Childs und Bardsley, 1975).

Bei der Reaktion von Coniferylalkohol mit MsP1 nahm die Extinktion bei 214 nm in der Probe 5 wie in Probe 2 ab, es entstand nach 10 min (Abb. 3.63) aber kein weiteres Extinktionsmaximum bei 202 nm, wie es bei der Umsetzung mit Laccase (Probe 2) der Fall war. Erst nach 135 min (Abb. 3.64) verschob sich in den Proben 5 und 6 das Extinktionsmaximum zu 202 nm. Es trat keine Änderung der UV/VIS-Spektren nach 135 min

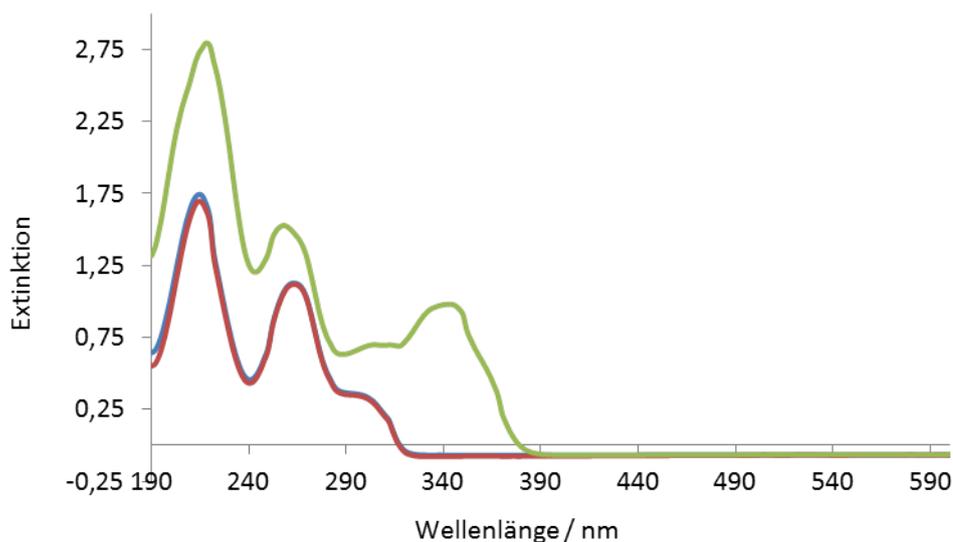


Abbildung 3.59: UV/VIS-Spektrum der Proben 1 und 4 (blau), 2 und 5 (rot) und 3 und 6 (grün) vor Zugabe der Enzyme.

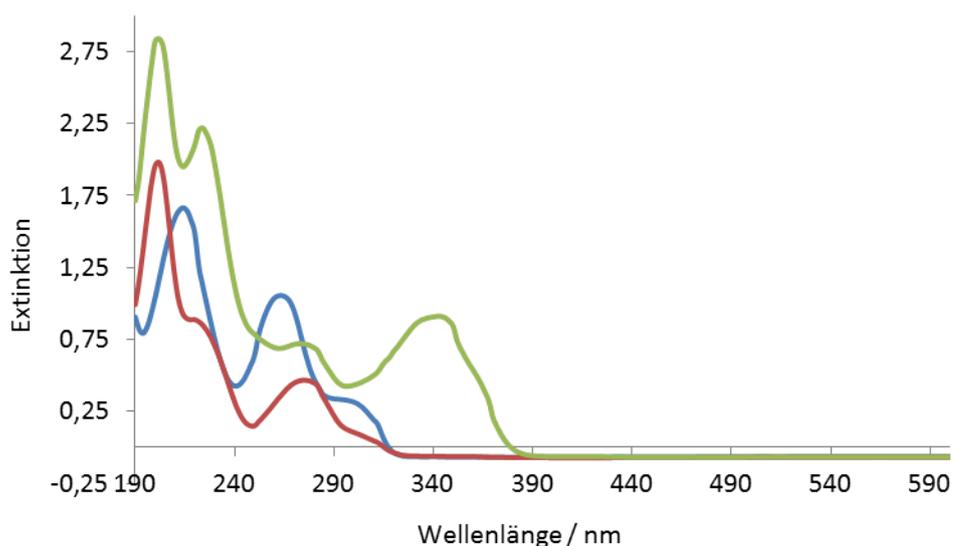


Abbildung 3.60: UV/VIS-Spektrum der Proben 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün) 5 min nach Zugabe von Laccase.

und nach 20 h (Abb. 3.65) auf. Auch nach 20 h wurde kein ABTS-Radikalkation nachgewiesen. Nach 20 h wurde in Probe 4 eine H_2O_2 -Konzentration von $1,09 \pm 0,08 \text{ mmol L}^{-1}$ und in Probe 5 eine H_2O_2 -Konzentration von $0,57 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ gemessen. Die H_2O_2 -Anfangskonzentration betrug in den Proben 1 mmol L^{-1} . Laccase und MsP1 reagierten unterschiedlich mit Coniferylalkohol.

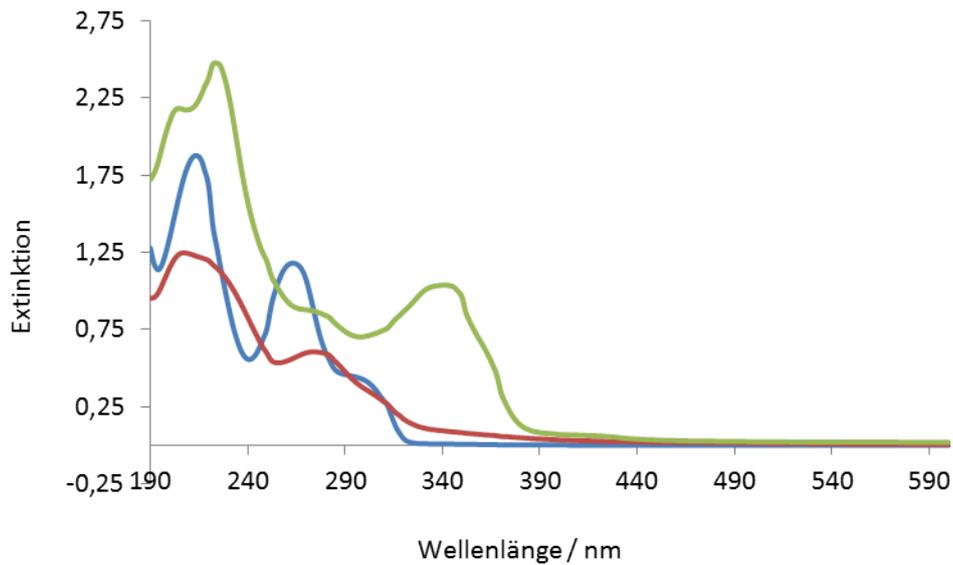


Abbildung 3.61: UV/VIS-Spektrum der Proben 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün) 40 min nach Zugabe von Laccase.

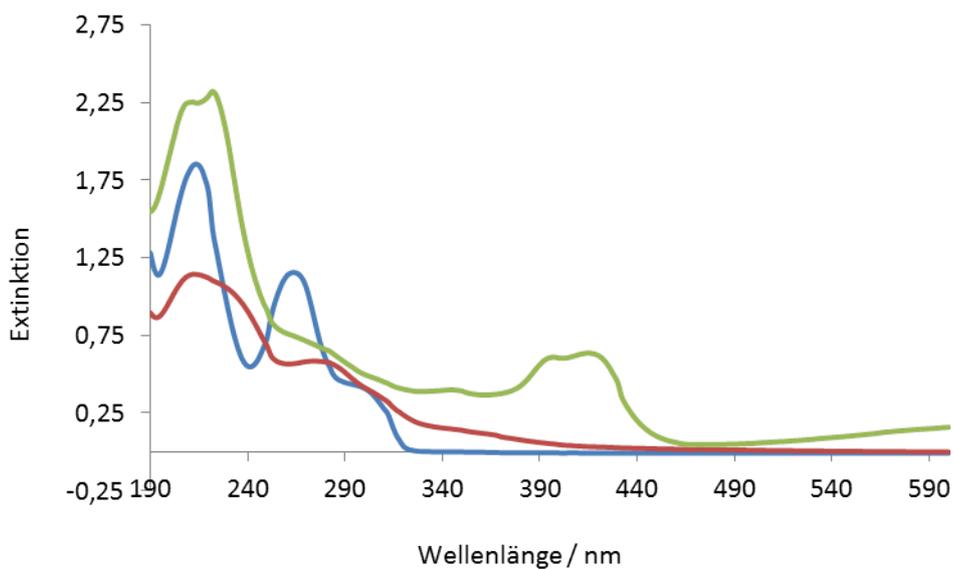


Abbildung 3.62: UV/VIS-Spektrum der Proben 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün) 20 h nach Zugabe von Laccase.

3.4.3 Aktivität von MsP1 in Gegenwart von Coniferylalkohol

Aktivität von gereinigtem und ungereinigtem MsP1

Durch Zugabe von Coniferylalkohol zum gereinigten MsP1 wurde versucht, die Aktivität gegenüber β,β -Carotin zu steigern (Kapitel 2.9.3). Bis 150 s (Abb. 3.66) waren β,β -Carotin, H_2O_2 und MsP1 im Ansatz vorhanden. Die Aktivitäten in den eingesetzten MsP1-Lösungen waren: MsP1D (nicht gereinigtes MsP1) $19,3 U_{Carotin} L^{-1}$; MsP1S (gereinigtes MsP1) $4,8 U_{Carotin} L^{-1}$. Bei 155 s wurde in beiden Proben eine Konzentration

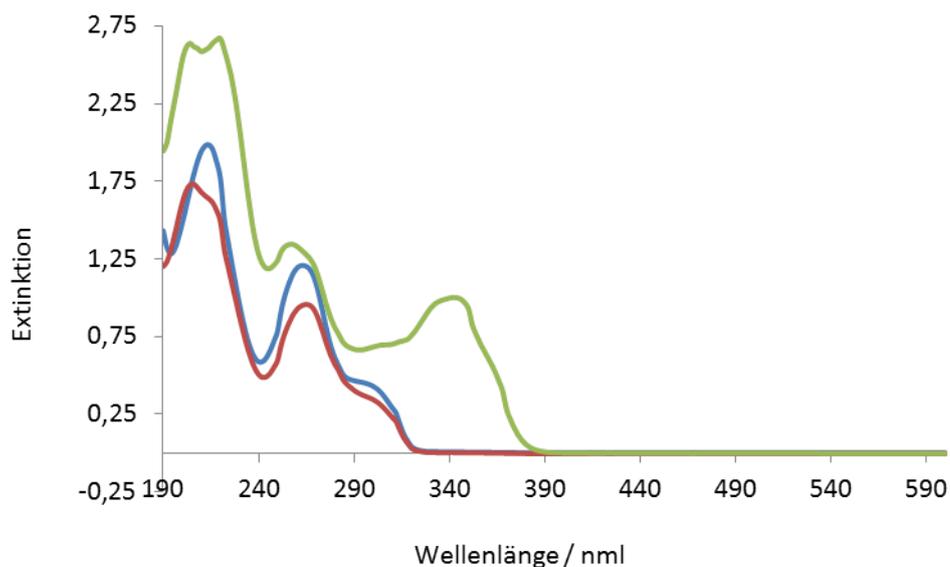


Abbildung 3.63: UV/VIS-Spektrum der Proben 4 (blau), 5 (rot) und 6 (grün) 10 min nach Zugabe von MsP1.

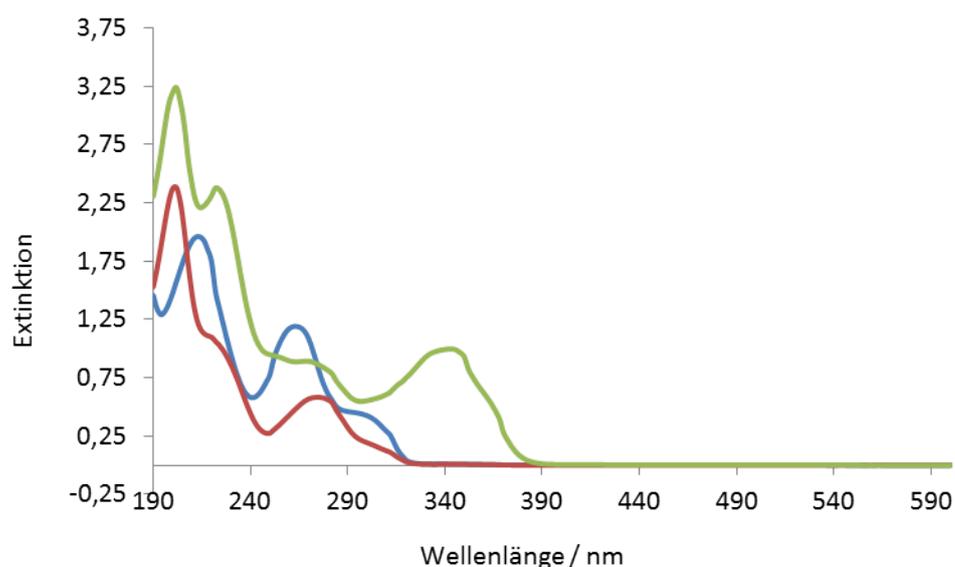


Abbildung 3.64: UV/VIS-Spektrum der Proben 4 (blau), 5 (rot) und 6 (grün) 135 min nach Zugabe von MsP1.

an Coniferylalkohol von $0,00858 \text{ mmol L}^{-1}$ eingestellt. Die Aktivität nahm darauf hin bei MsP1S zu, so dass beide Proben fast gleiche Aktivität aufwiesen: MsP1D $16,1 \text{ U L}^{-1}$; MsP1S $16,6 \text{ U L}^{-1}$. Nach 180 s war $1/3$ des β,β -Carotins verbraucht.

Anschließend wurde die Aktivität der beiden Proben mit Zugabe von Coniferylalkohol vor dem Start der Reaktion gemessen. Somit wurde erreicht, dass sich durch Zugabe von Coniferylalkohol die Aktivität der sauberen Probe erhöhte, so dass die resultierenden Aktivitäten der beiden Lösungen identisch waren (Tab. 3.7).

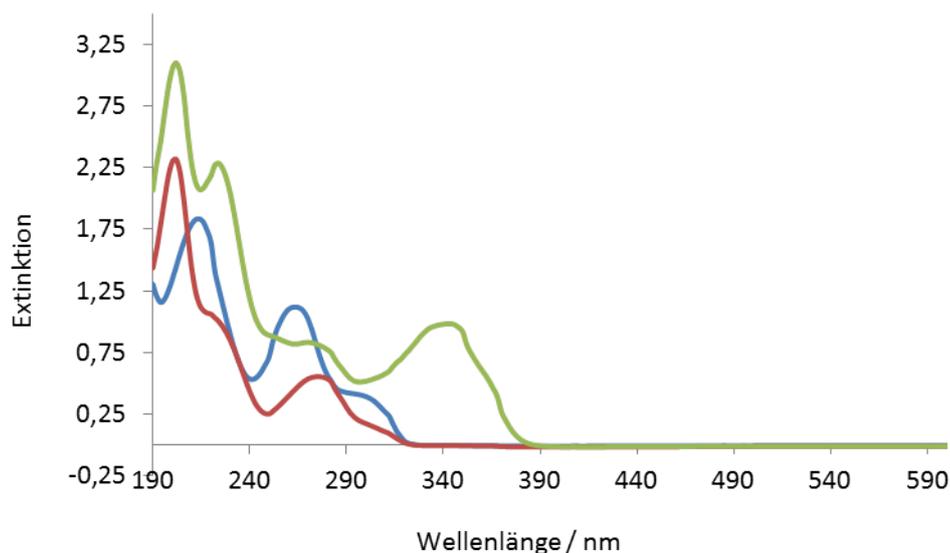


Abbildung 3.65: UV/VIS-Spektrum der Proben 4 (blau), 5 (rot) und 6 (grün) 20 h nach Zugabe von MsP1.

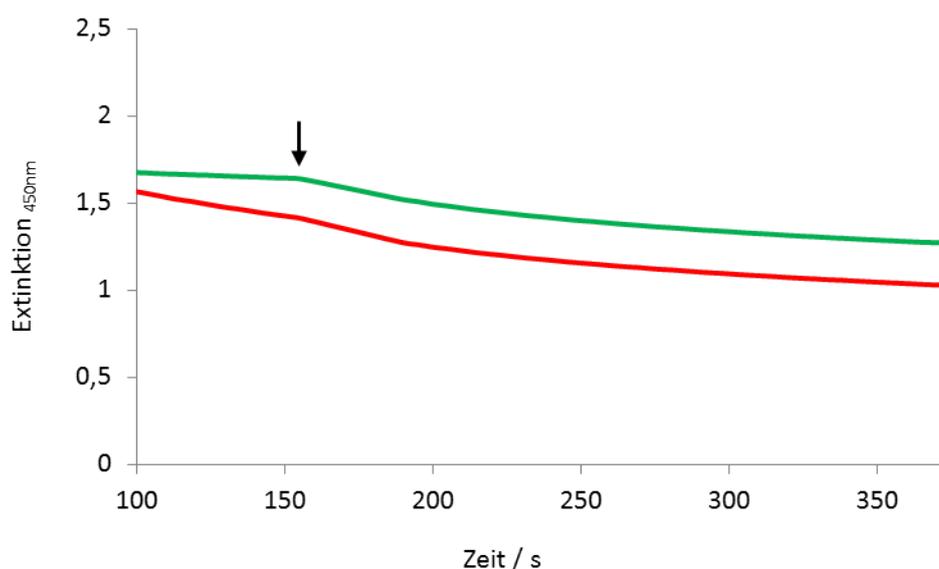


Abbildung 3.66: β,β -Carotinabbau mit nicht gereinigtem MsP1 (MsP1D) (rot) und gereinigtem MsP1 (MsP1S) (grün). Zugabe von Coniferylalkohol bei 155 s.

Die Aktivität von MsP1 wurde gegenüber ABTS in Gegenwart von Coniferylalkohol in zwei verschiedenen Konzentrationen untersucht. Zwei MsP1-Lösungen wurden, wie bei der Aktivitätsmessung mit β,β -Carotin, genutzt, wobei für die Aktivitätsmessung mit ABTS die Lösungen 100 mal höher verdünnt werden mussten. Die erhaltenen Aktivitäten gegenüber ABTS sind in Tabelle 3.8 aufgelistet. Die Aktivität der MsP1 verringerte sich bei der Reaktion mit ABTS in Gegenwart von Coniferylalkohol.

Tabelle 3.7: Aktivität von MsP1-Proben gegenüber β,β -Carotin unter Zugabe von Coniferylalkohol.

MsP1 Probe	Coniferylalkohol mmol L ⁻¹	Aktivität im Ansatz U L ⁻¹	MsP1-Verdünnung im Ansatz	Aktivität der MsP1-Lösung U L ⁻¹
MsP1D	0,00858	2,19	1:10	21,9
MsP1S	0,00858	2,02	1:10	20,2

Tabelle 3.8: Aktivität von MsP1-Proben gegenüber ABTS unter Zugabe von Coniferylalkohol. (* Abnahme der Extinktion nach 200 s)

MsP1 Probe	Coniferyl- alkohol mmol L ⁻¹	Aktivität im Ansatz U L ⁻¹	Verdünnung MsP1-Lösung	MsP1-Verdünnung im Ansatz	Aktivität der MsP1-Lösung U mL ⁻¹
MsP1D	0	4,11	1:100	1:10	4,11
MsP1D	0,00858	3,83	1:100	1:10	3,83
MsP1D	0,0858	3,25*	1:100	1:10	3,25
MsP1S	0	4,25	1:100	1:10	4,25
MsP1S	0,00858	3,73	1:100	1:10	3,73
MsP1S	0,0858	2,75*	1:100	1:10	2,75

Die Reinigung von MsP1 hatte keinen Einfluss auf die Aktivität gegenüber ABTS. Gegenüber β,β -Carotin war die Aktivität der gereinigten Probe geringer als bei der nicht gereinigten Probe. Die nicht gereinigte MsP1-Lösung hatte eine Aktivität von $19,3 U_{Carotin} L^{-1}$ und $4,11 U_{ABTS} mL^{-1}$ und die gereinigte MsP1-Lösung $4,8 U_{Carotin} L^{-1}$ und $4,25 U_{ABTS} mL^{-1}$. Die Differenz zwischen den Aktivitäten gegenüber den verschiedenen Substraten wurde in der gereinigten Lösung durch die Zugabe von Coniferylalkohol auf den Wert der Differenz der nicht gereinigten Lösung angehoben. Nach der Zugabe von Coniferylalkohol hatte die gereinigte MsP1-Lösung eine Aktivität von $20,2 U_{Carotin} L^{-1}$ und $3,73 U_{ABTS} mL^{-1}$.

MsP1-Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration an Coniferylalkohol

Die Aktivität gegenüber β,β -Carotin wurde mit gereinigtem MsP1 unter Zugabe von verschiedenen Mengen an Coniferylalkohol gemessen (Kapitel 2.9.3). Bei den Messungen wurde die MsP1-Stammlösung 1:500 für die Messungen mit Coniferylalkohol und 1:100 für die Messungen ohne Coniferylalkohol verdünnt. Der Einfluss von Coniferylalkohol auf den zeitlichen Verlauf des Abbaus von β,β -Carotin sollte untersucht werden. Je

mehr Coniferylalkohol zugegeben wurde, desto später startete die Reaktion (Abb. 3.67). Z.B. begann der β,β -Carotinabbau im Ansatz mit $0,04 \text{ mmol L}^{-1}$ Coniferylalkohol erst nach 150 s.

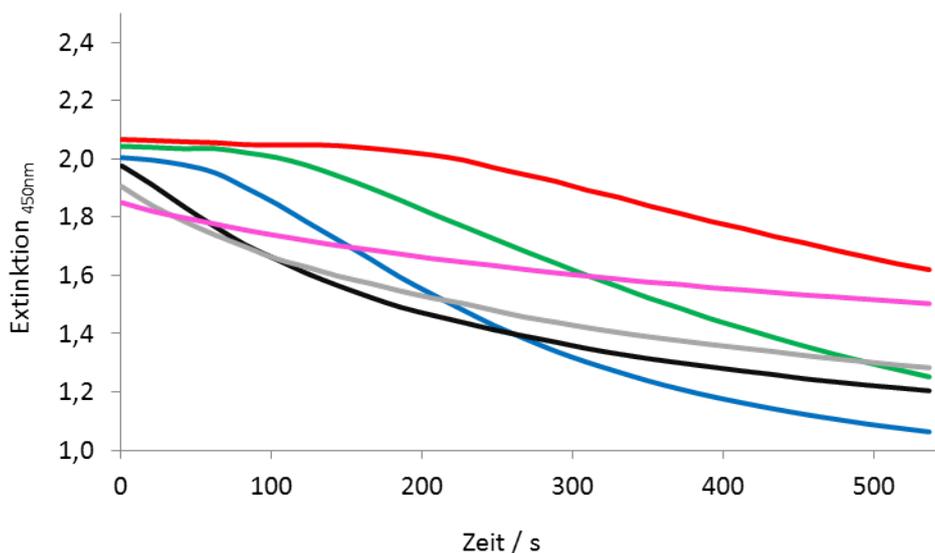


Abbildung 3.67: Abbau von β,β -Carotin mittels MsP1/H₂O₂ bei verschiedenen Coniferylalkohol-Konzentrationen.

rot: $0,04 \text{ mmol l}^{-1}$; grün: $0,02 \text{ mmol l}^{-1}$; blau: $0,01 \text{ mmol l}^{-1}$; schwarz: $0,004 \text{ mmol l}^{-1}$; grau: $0,002 \text{ mmol l}^{-1}$; rosa: 0 mmol l^{-1} ;

Tabelle 3.9: Aktivität von MsP1 (berechnet auf die eingesetzte Stammlösung) gegenüber β,β -Carotin in Abhängigkeit der Coniferylalkohol-Konzentration,

Coniferylalkohol mmol L^{-1}	$-\Delta E/\Delta t$ s^{-1}	Verdünnung MsP1-Lösung	MsP1-Verdünnung im Ansatz	Aktivität der MsP1-Lösung U mL^{-1}
0,04	0,0013	1:500	1:10	4,105
0,02	0,0021	1:500	1:10	6,632
0,01	0,0030	1:500	1:10	9,474
0,004	0,0035	1:500	1:10	11,050
0,002	0,0031	1:500	1:10	9,790
0	0,0014	1:100	1:10	0,884

Die Aktivität von MsP1 gegenüber β,β -Carotin ließ sich durch Einstellen einer geringen Konzentration an Coniferylalkohol ($0,001 \text{ mmol L}^{-1}$ bis $0,01 \text{ mmol L}^{-1}$) wesentlich erhöhen (8 bis 12fach). Die Aktivitätssteigerung nahm ab $0,004 \text{ mmol L}^{-1}$ Coniferylalkohol mit steigender Konzentration ab (Tab. 3.9).

3.4.4 Vergleich verschiedener Mediatoren zur Steigerung der MsP1-Aktivität gegenüber β,β -Carotin

Der Einfluss auf die Aktivität von MsP1 gegenüber β,β -Carotin wurde mit den Substanzen Coniferylalkohol, Ferulasäureethylester, 4-Ethylphenol und *p*-Coumarsäure in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und $0,0\bar{3}$ mmol L⁻¹ gemessen. In Abbildung 3.68 sind die Aktivitätsänderungen in Abhängigkeit der Mediatorkonzentration aufgetragen. Im niedrigen Konzentrationsbereich des Mediators stieg die Aktivität mit zunehmender Mediatorkonzentration bei allen Mediatoren. Bei Ferulasäureethylester und bei Coniferylalkohol nahm die Aktivität jedoch ab einer Mediatorkonzentration von $0,0\bar{3}$ mmol L⁻¹ wieder ab und wurde ~ 10 Mal geringer als ohne Mediator. Die Aktivitätssteigerung bei Coniferylalkohol war im Vergleich mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.4.3 (MsP1-Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration an Coniferylalkohol), bei dem eine 2mal höhere MsP1-Aktivität eingestellt wurde, um den Faktor $\sim 4,5$ geringer.

Die Messung für 4-Ethylphenol und *p*-Coumarsäure wurde nochmals in einer Doppelmessung mit Dreifachbestimmung in einem größeren Konzentrationsbereich wiederholt (Abbildung 3.69), um zu sehen, ob auch bei diesen Substanzen die Aktivität bei höheren Konzentrationen sinkt. Die Konzentrationen der Mediatoren betragen $0,0083$ mmol L⁻¹ bis $0,0\bar{6}$ mmol L⁻¹. Hier zeigte sich, dass bei diesen Mediatoren die Aktivität mit höheren Mediatorkonzentrationen nicht sank.

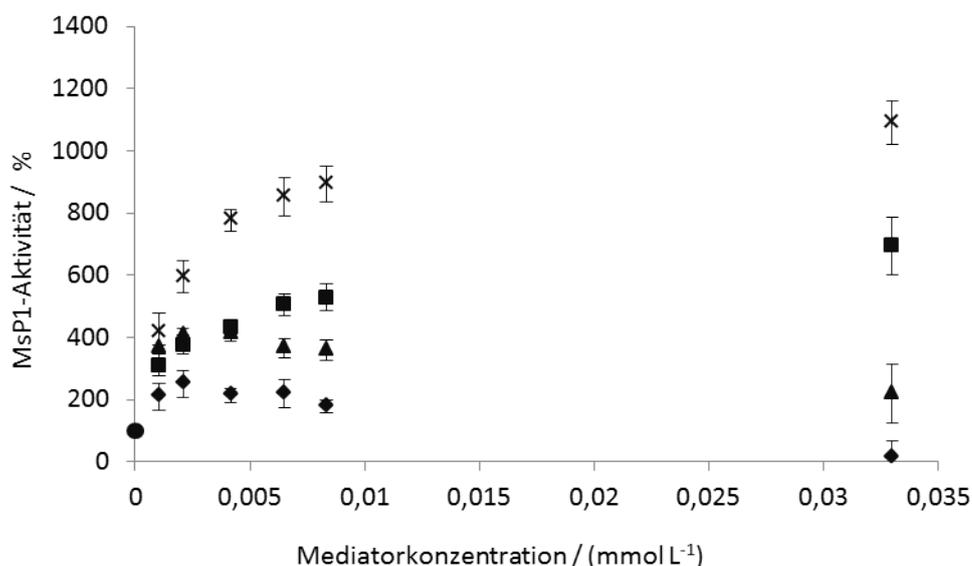


Abbildung 3.68: Aktivitätsänderung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit verschiedener Mediatoren und Mediatorkonzentrationen.
Raute: Coniferylalkohol; Viereck: 4-Ethylphenol; Dreieck: Ferulasäureethylester; X: *p*-Coumarsäure

Optimierung der Mediatorkonzentration

Die Messungen wurden nochmals mit dem Ziel durchgeführt, jeweils die Mediatorkonzentration zu finden, bei der die Aktivitätssteigerung am höchsten ist (Abb. 3.70 bis

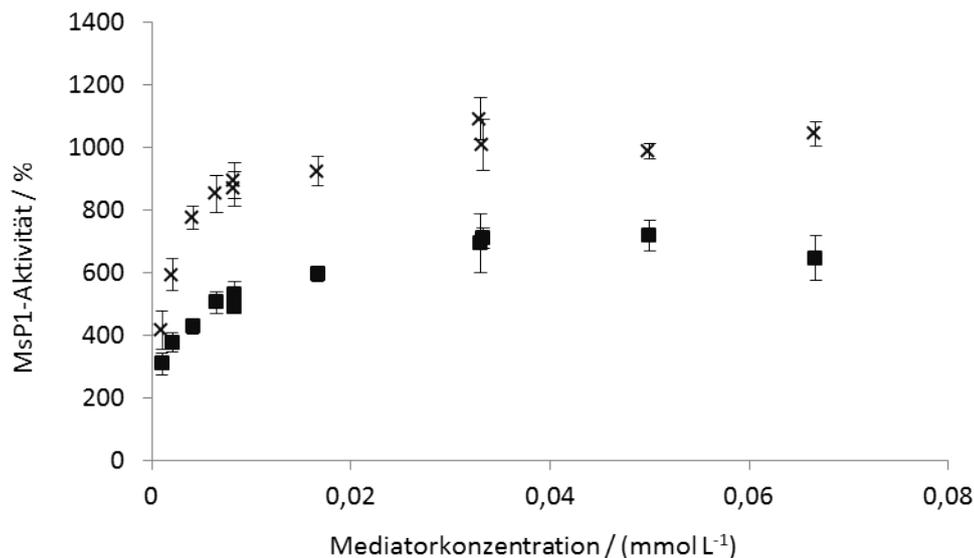


Abbildung 3.69: Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der p -Coumarsäure- (X) und 4-Ethylphenolkonzentration (Viereck)

Abb. 3.73). In Tabelle 4.6 sind die Konzentrationsbereiche, mit denen die höchsten Aktivitätssteigerungen erreicht wurden, aufgelistet. Dabei wurde die höchste Aktivität mit p -Coumarsäure erreicht. Diese betrug, bezogen auf die Aktivität ohne Mediator, 1.406 %. Die Aktivitätssteigerung mit Coniferylalkohol war im Vergleich mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.4.3 (MsP1-Aktivität in Abhängigkeit der Konzentration an Coniferylalkohol), bei dem eine $\sim 1,4$ fache MsP1-Aktivität eingestellt wurde, um den Faktor $\sim 2,4$ geringer.

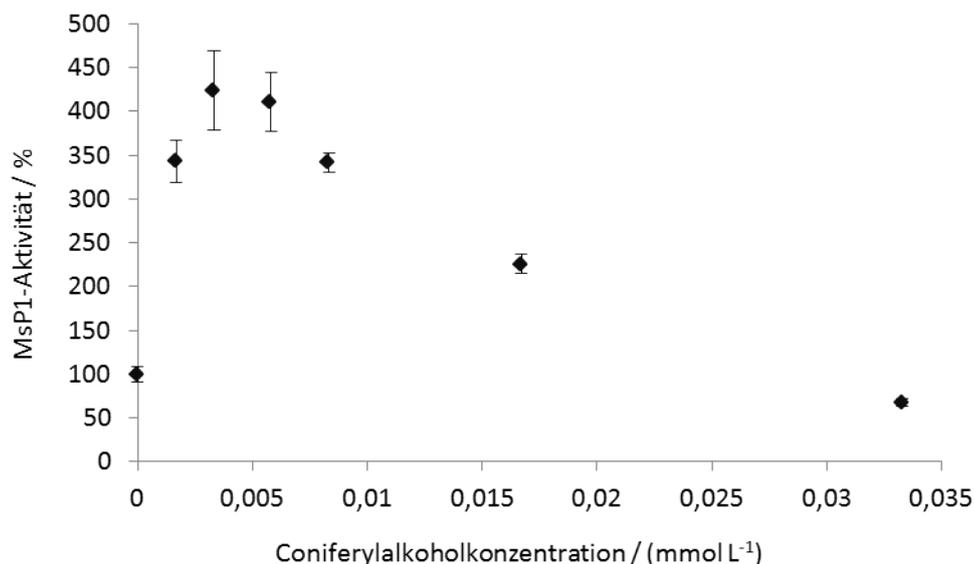


Abbildung 3.70: Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der Coniferylalkoholkonzentration

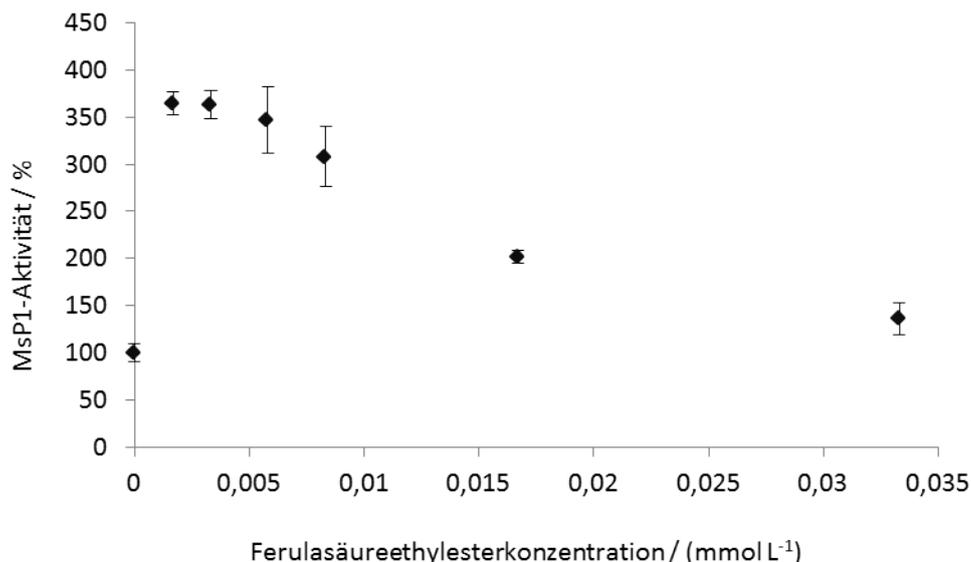


Abbildung 3.71: Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der Ferulasäureethylesterkonzentration

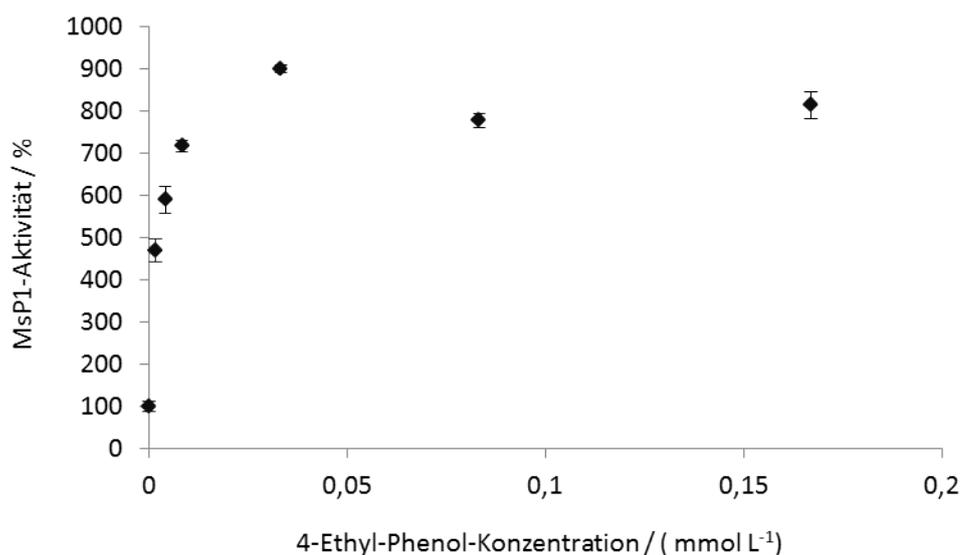


Abbildung 3.72: Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der 4-Ethylphenolkonzentration

3.4.5 Bestimmung der kinetischen Konstanten von MsP1 in Gegenwart verschiedener Mediatoren

Die Kinetik des β,β -Carotinabbaus wurde in Abhängigkeit der Substratkonzentration unter Einfluss der Mediatoren untersucht (Kapitel 2.9.5). Für die Mediatoren Coniferylalkohol und Ferulasäureethylester wurde eine Konzentration von $0,003 \text{ mmol L}^{-1}$ gewählt. Diese Konzentration bewirkte die größte Aktivitätssteigerung beim Abbau von β,β -Carotin (Kapitel 3.4.4). In Abbildung 3.74 ist das Lineweaver-Burk-Diagramm der Kinetik aufgetragen. Die daraus resultierenden Maximalgeschwindigkeiten und

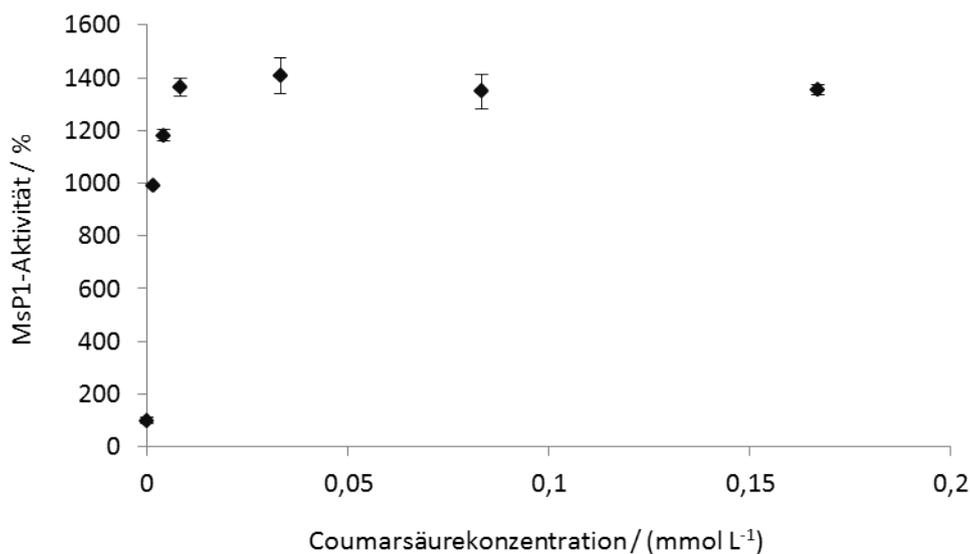


Abbildung 3.73: Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der p -Coumarsäurekonzentration

Tabelle 3.10: Aktivitätssteigerung und die dazu benötigten Konzentrationen der jeweiligen Mediatoren. Die prozentuale Aktivität ist bezogen auf die MsP1-Aktivität ohne Mediator (100%).

Mediator	Konzentration mmol L ⁻¹	Aktivitätssteigerung %
Coniferylalkohol	0,003–0,0058	424
Ferulasäureethylester	0,0017–0,0058	364
4-Ethylphenol	0,03–0,16	900
p -Coumarsäure	0,0083–0,16	1.406

Michealis-Menten-Konstanten sind in Tabelle 3.11 zusammengefasst.

Tabelle 3.11: Maximalgeschwindigkeit und Michaelis-Menten-Konstanten der MsP1-Kinetiken mit und ohne Mediator

Mediator	v_{max} $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$	K_m mmol L ⁻¹	Effizienz %
ohne Mediator	0,287	0,012	100
Coniferylalkohol	1,429	0,007	860
Ferulasäureethylester	1,041	0,022	205

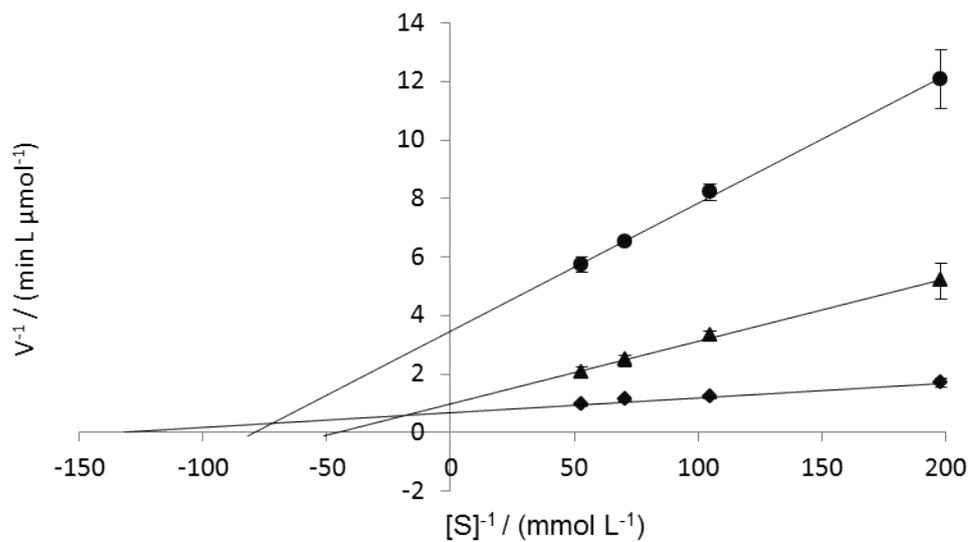


Abbildung 3.74: Lineweaver-Burk-Diagramm der MsP1-Kinetiken des β,β -Carotinabbaus mit und ohne Mediator.
Punkt: ohne Mediator; Dreieck: Ferulasäureethylester; Raute: Coniferylalkohol

Bei den beiden Mediatoren stieg die Maximalgeschwindigkeit, bei Coniferylalkohol sank gleichzeitig auch die Michaelis-Menten-Konstante.

3.5 Immobilisierung

MsP1 wurde auf ein mit einem Amino-Rest funktionalisiertes Kieselgel (Kapitel 2.10.1) immobilisiert. Die Immobilisierung wurde über Glutardialdehyd als Kupplungsreagenz realisiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben zur Stabilisierung der Bindung mit NaBH_4 (Probe 4 und 5) und H_2SO_4 (Probe 3 und 5) behandelt (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12: Auflistung der entstandenen Überstände bei unterschiedlicher Behandlung der Proben zur Immobilisierung von MsP1 auf Kieselgel. Probe 1: nicht funktionalisiertes Kieselgel, Probe 2-5: mit NH_2 funktionalisiertes Kieselgel

Probe	Überstand 1	Überstand 2	Überstand 3	Überstand 4	Überstand 5
1	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O
2	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O	H_2O
3	H_2O	H_2O	H_2O	H_2SO_4	H_2O
4	H_2O	NaBH_4	H_2O	H_2O	H_2O
5	H_2O	NaBH_4	H_2O	H_2SO_4	H_2O

Aus der Abbildung 3.75 geht hervor, dass die Aktivität von Probe 1 (nicht funktionalisiertes Kieselgel) mit 73 % (0,216 U) fast vollständig in den Überständen zu finden war. Die Ausbeute für das immobilisierte MsP1 betrug hier nur 0,9 % (Tab. 3.13). Die höchste Ausbeute mit 23 % wurde in Probe 2 (funktionalisiertes Kieselgel) gefunden. Hier wurde nach der Immobilisierung in allen Waschschrritten nur mit Wasser gewaschen. Die Enzymaktivität in den Überständen 1 bis 5 der Probe 2 betrug 14 % der eingesetzten Aktivität (Abb. 3.75). Das bedeutet, dass aufgrund der Immobilisierungsmethode ca. 63 % der Aktivität verloren gingen. Die Proteinmenge (Abb. 3.76) im Überstand 1 lag in allen Proben bis auf Probe 4 unter der Nachweisgrenze ($<1,5 \text{ mg L}^{-1}$) der Proteinbestimmungsmethode. Die Proben 4 und 5 wurden mit $2,5 \text{ mL } 2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ NaBH}_4$ behandelt. Bei diesem Schritt wurden 10 % der eingesetzten Proteinmenge ausgewaschen, aber nur 4 % Aktivität im Überstand (Abb. 3.75) wiedergefunden.

Die unbehandelte Probe 3 und die mit NaBH_4 behandelte Probe 5 wurden mit $1 \text{ mL } \text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung pH 1 gewaschen. Die Aktivität, die schließlich auf dem Kieselgel zu finden war, war bei der Probe 3 ca. 3-mal so hoch wie bei Probe 5 (Tab. 3.13). Der größte Aktivitätsverlust war bei Probe 5, welche mit Säure und NaBH_4 behandelt wurde, zu finden.

3.5.1 Wiederholter Einsatz des immobilisierten MsP1

MsP1 wurde auf Kieselgel immobilisiert, um einen wiederholten Einsatz desselben Enzympräparates realisieren zu können. Im Folgenden wurde das immobilisierte MsP1 (Proben 2 und 4 aus Kapitel 3.5) im ABTS-Test in 3 Zyklen eingesetzt (Kapitel 2.10.3).

In Abbildung 3.78 ist die Aktivität in Prozent, bezogen auf die Ausgangsaktivität der jeweiligen Probe, in Abhängigkeit der Zyklen abgebildet. Die berechneten Aktivitäten für das immobilisierte MsP1 betragen für Probe 2 (35 ± 7) U g^{-1} und für Probe 4

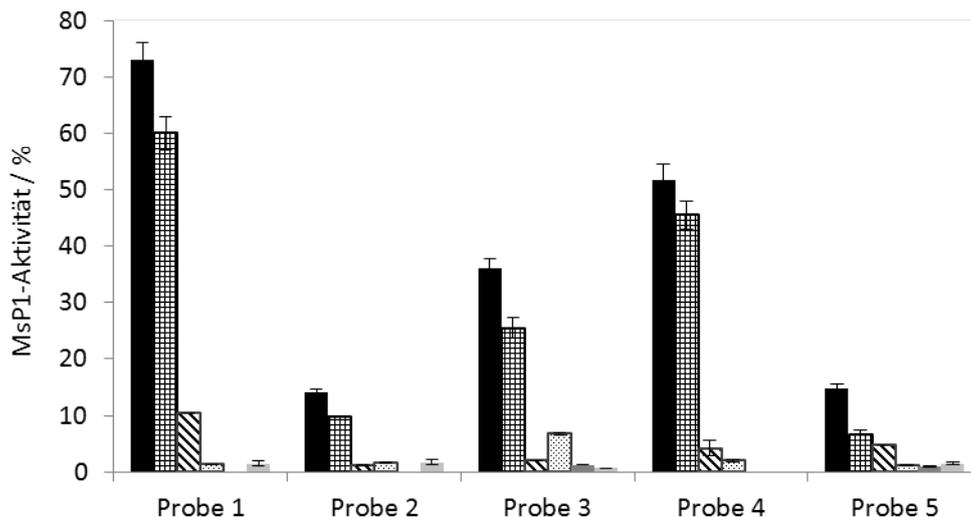


Abbildung 3.75: MsP1-Aktivität in % der Ausgangsaktivität in den Überständen bei der Immobilisierung von MsP1 auf Kieselgel.

Schwarz: Gesamtverlust in allen Überständen, kariert: Überstand 1, schraffiert: Überstand 2, gepunktet: Überstand 3, grau: Überstand 4, hellgrau: Überstand 5

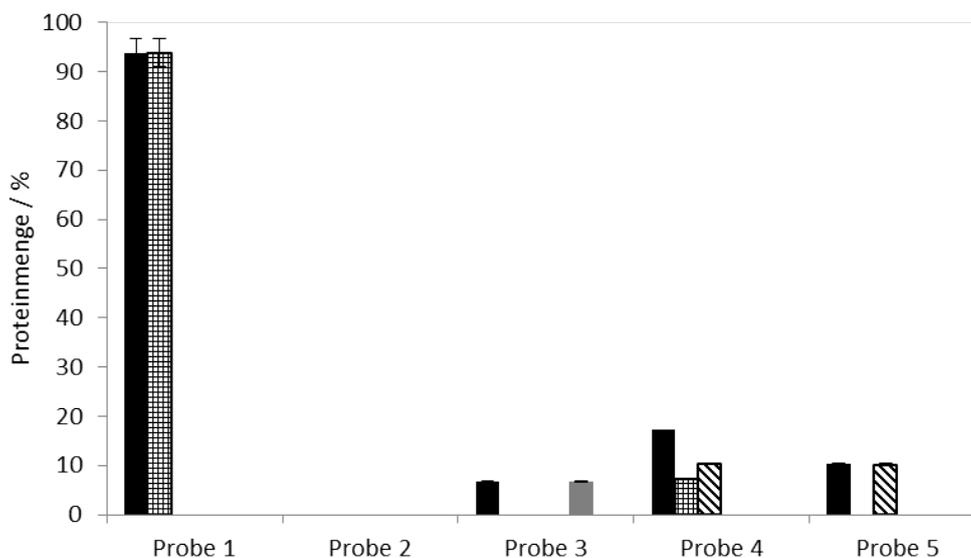


Abbildung 3.76: Proteinmenge in % der Ausgangsproteinmenge der MsP1-Lösung in den Überständen der Immobilisierung von MsP1 auf Kieselgel.

Schwarz: Summe von Überstand 1-5 der jeweiligen Probe, kariert: Überstand 1, schraffiert: Überstand 2, gepunktet: Überstand 3, grau: Überstand 4, hellgrau: Überstand 5

$(1,9 \pm 0,2) \text{ U g}^{-1}$. Im zweiten Zyklus betrug die Aktivität in Probe 2 nur noch ca. 60 % und bei Probe 4 nur noch knapp über 40 %. Im dritten Zyklus verringerte sich die Aktivität noch einmal auf 40 % bzw. 30 %.

Tabelle 3.13: Aktivität von MsP1 immobilisiert auf Kieselgel (Abb. 3.77)

Probe	Kieselgel g	$\Delta E/\Delta t$ s^{-1}	Aktivität $U\ g^{-1}$	Ausbeute %
1	0,00043	0,0000051	0,256	0,9
2	0,00047	0,0001453	6,577	23,4
3	0,00048	0,0000748	3,376	12,0
4	0,00059	0,0000651	2,377	8,9
5	0,00053	0,0000279	1,140	4,1

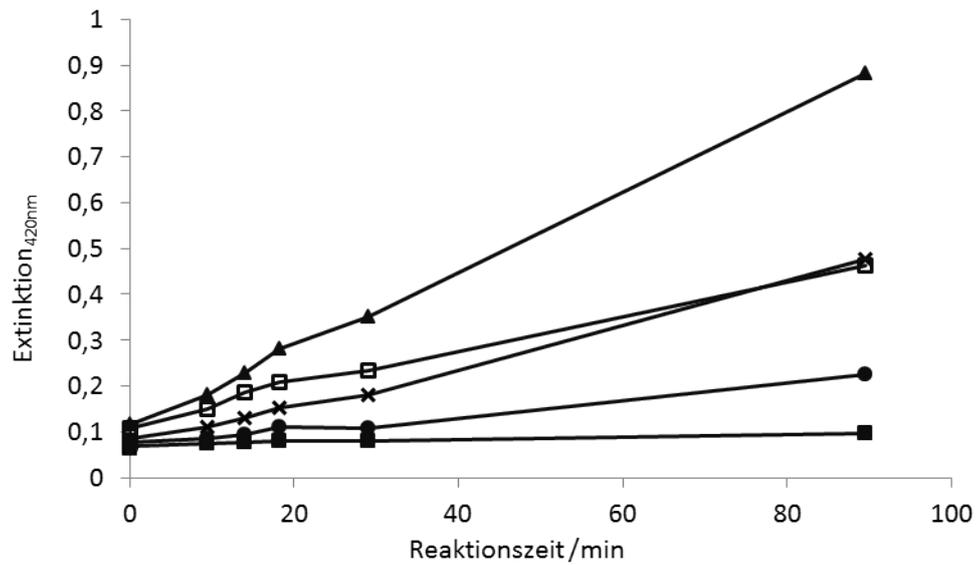


Abbildung 3.77: Messung der Aktivität mittels ABTS-Assay des immobilisierten MsP1. Viereck: Probe 1, Dreieck: Probe 2, Kreuz: Probe 3, offenes Viereck: Probe 4, Kreis: Probe 5. Probenbezeichnung aus Tabelle 3.12

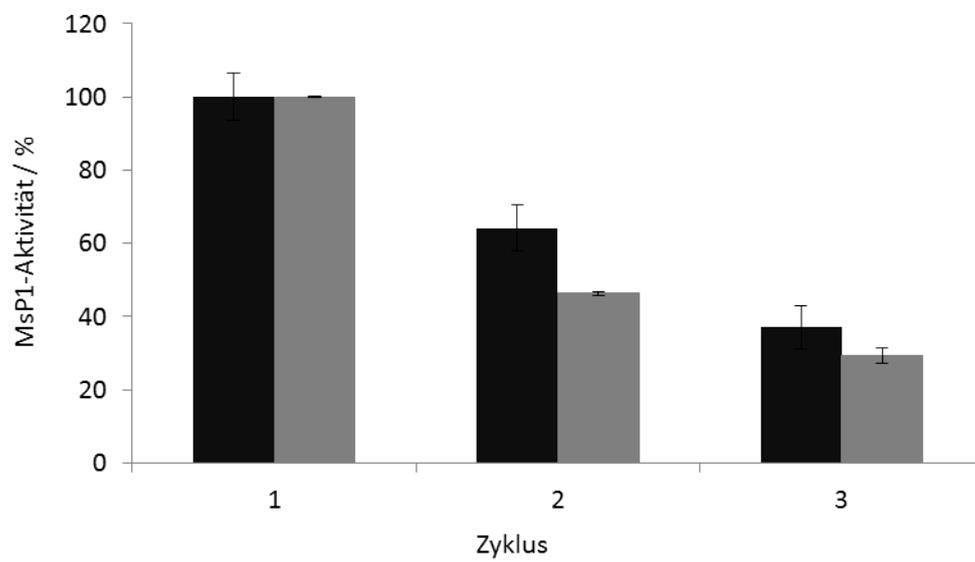


Abbildung 3.78: Aktivität von auf Kieselgel immobilisiertem MsP1 in Abhängigkeit der Einsatzzyklen
Schwarz: Probe 2; grau: Probe 4

3.6 Bleichung von gefärbter Molke und Milch

Mit dem Reflektionsspektromete r (Avaspec2048) wurde die Färbung und die zeitabhängige Abnahme dieser in Milch und Molke gemessen. Mit β,β -Carotin gefärbte Milch kann bis zu einem b-Wert von 4,56 im Vergleich zur Referenz visuell als weiß wahrgenommen werden (Abb. 3.79).

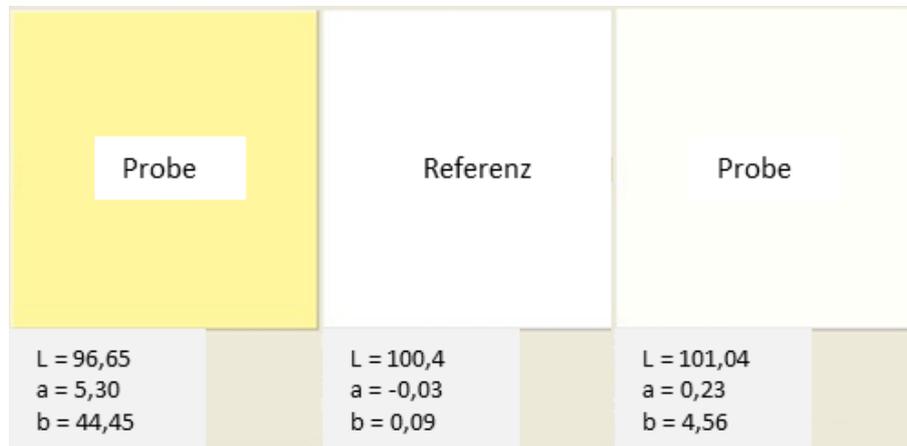


Abbildung 3.79: Visualisierung der Bleichung von mit β,β -Carotin gefärbter Milch mit Hilfe des 3-Enzym-Systems (MsP1 (5 mU mL^{-1}), GOX ($2,3 \text{ mU mL}^{-1}$) und saurer Lactase (1 mU mL^{-1}) im CIELab-System. Links: gefärbte Milch; mittig: ungefärbte Milch; rechts: gebleichte Milch.

3.6.1 H_2O_2 -Abhängigkeit der Bleichung von Molke

Molke wurde mit β,β -Carotin-Lösung bis zu einem b-Wert von 50 gefärbt. Um die optimale H_2O_2 -Konzentration für die Bleichung herauszufinden, wurden die Bleichungsexperimente mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen zwischen $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ und $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ durchgeführt. Eingesetzt wurden $3,6 \text{ mU mL}^{-1}$ MsP1 (Kapitel 2.11.3). Bei dieser Aktivität wurde eine effiziente Bleichung (Abb. 3.80) nach 14,5 h mit einem b-Wert von 1,6 bei einer H_2O_2 -Konzentration von $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ bis $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ erreicht. Nach 2 Stunden wurde ein b-Wert von < 3 mit $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ H_2O_2 erreicht.

3.6.2 Bleichung von Molke mit einem 2-Enzym-System

Um bei der Bleichung von Milchprodukten mit Hilfe von MsP1 nicht extern H_2O_2 zugeben zu müssen, wurde dem Reaktionsgemisch GOX zugegeben. Durch die GOX war es möglich, H_2O_2 *in situ* zu generieren (Kapitel 2.11.3). Die beiden Molkesorten, Süß- und Sauermolke, beinhalten jeweils je nach Herkunft $\sim 0,9$ bis $\sim 0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ D-Glucose. GOX oxidiert D-Glucose zu Gluconolacton, dabei entsteht H_2O_2 in stöchiometrischem Verhältnis. So ergibt die in Molke vorhandene D-Glucose die optimale H_2O_2 -Konzentration von $\geq 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ (Kapitel 3.6.1) für die Bleichung mit MsP1.

Der Reaktionsverlauf der Bleichung von β,β -Carotin lässt sich in 3 Phasen teilen (Abb. 3.81). Am Anfang (a) war die H_2O_2 -Konzentration noch gering, so dass die

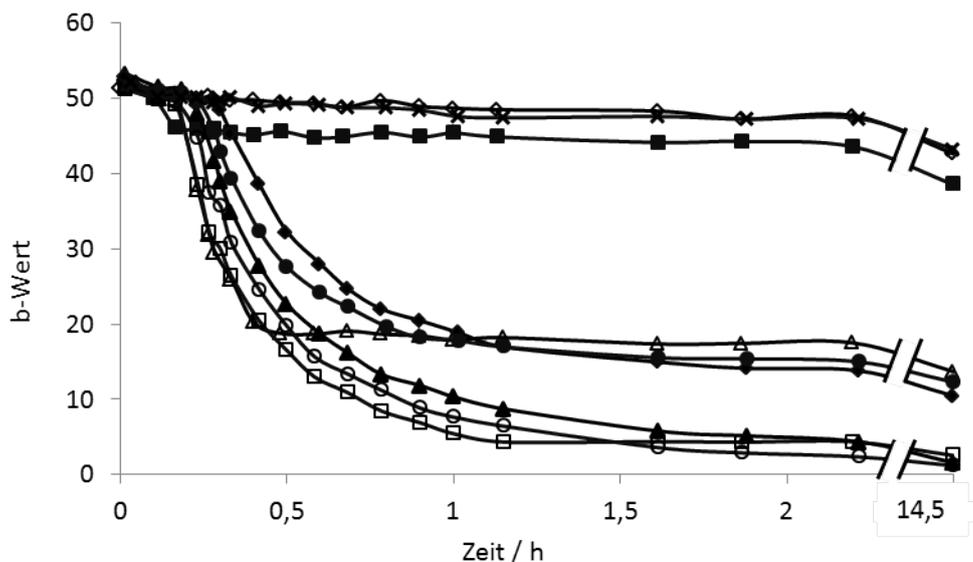


Abbildung 3.80: Bleichung von mit β,β -Carotin gefärbter Molke mit MsP1 ($3,6 \text{ mU mL}^{-1}$) bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen.

offene Raute: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; schwarzes Rechteck: $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$; offenes Dreieck: $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$; offenes Rechteck: $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$; offener Kreis: $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; schwarzes Dreieck: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$; schwarze Raute: $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$; schwarzer Kreis: 1 mmol L^{-1} ; X: 2 mmol L^{-1} .

Geschwindigkeit der Reaktion gering war. In Phase b wurde die Reaktion aufgrund der höheren H_2O_2 -Konzentration wesentlich schneller. Diese Reaktionsgeschwindigkeit blieb bis zu einem b-Wert von ca. 10, was einer β,β -Carotin-Konzentration von $0,0037 \text{ mmol L}^{-1}$ entspricht, konstant. In Phase c wurde die Reaktion wieder langsamer.

In der Negativkontrolle wurde eine sehr geringe Abnahme der Färbung beobachtet. Eine fast vollständige Bleichung des zugegebenen Farbstoffs (b-Wert von 1,8) wurde mit Süßmolke nach weniger als 10 Stunden erreicht. Das optimale 2-Enzym-System bestand aus 5 mU mL^{-1} MsP1 und $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX.

Die Bleichung von mit Annatto gefärbter Süßmolke wurde unter ähnlichen Bedingungen (1: 18 mU mL^{-1} MsP1, $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX, 2: $3,6 \text{ mU mL}^{-1}$ MsP1, $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX) wie die β,β -Carotinbleichung durchgeführt. Mit dieser Enzymmischung konnte eine fast vollständige Bleichung bis zu einem b-Wert von 4,5–4,9 (Abb. 3.82) in 10 Stunden erreicht werden. Durch den Einsatz der zwei verschiedenen Mengen an MsP1 konnte gezeigt werden, dass die Reaktion der GOX der geschwindigkeitsbestimmende Schritt war.

3.6.3 Bleichung von Milch mit einem 3-Enzym-System

Da Milch keine ausreichenden Mengen an D-Glucose beinhaltet, wurde ein zusätzliches Enzym für die Generierung von H_2O_2 benötigt. Die saure Lactase (β -Galactosidase) wurde eingesetzt, um Lactose zu D-Glucose und D-Galactose zu hydrolysieren.

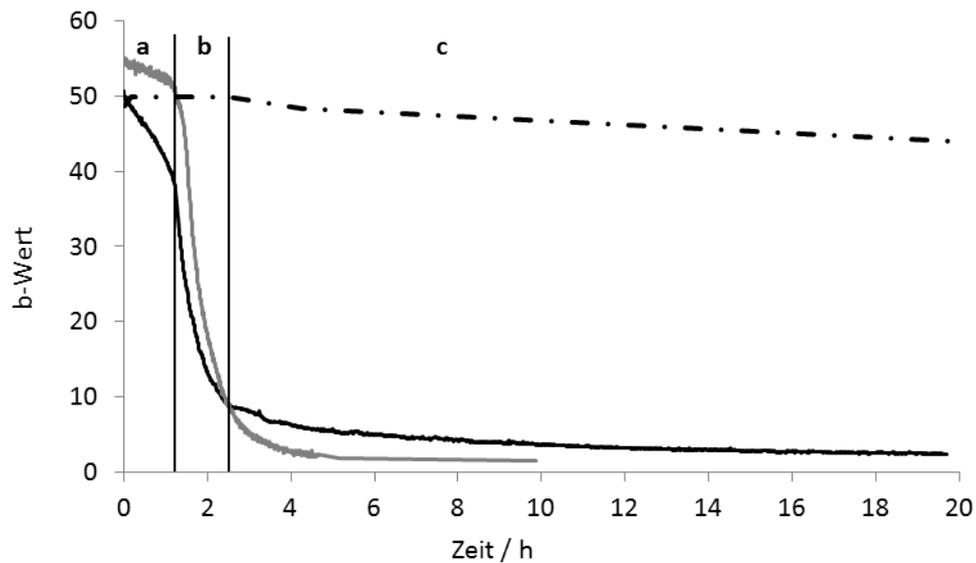


Abbildung 3.81: Bleichung von mit β,β -Carotin gefärbter Molke mit Hilfe des 2-Enzym-Systems.

graue Linie: Süßmolke; schwarze Linie: Sauermolke mit 5 mU mL^{-1} MsP1, $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX; Strich-Punkt-Linie: Negativkontrolle mit hitzeinaktiviertem MsP1 und $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX

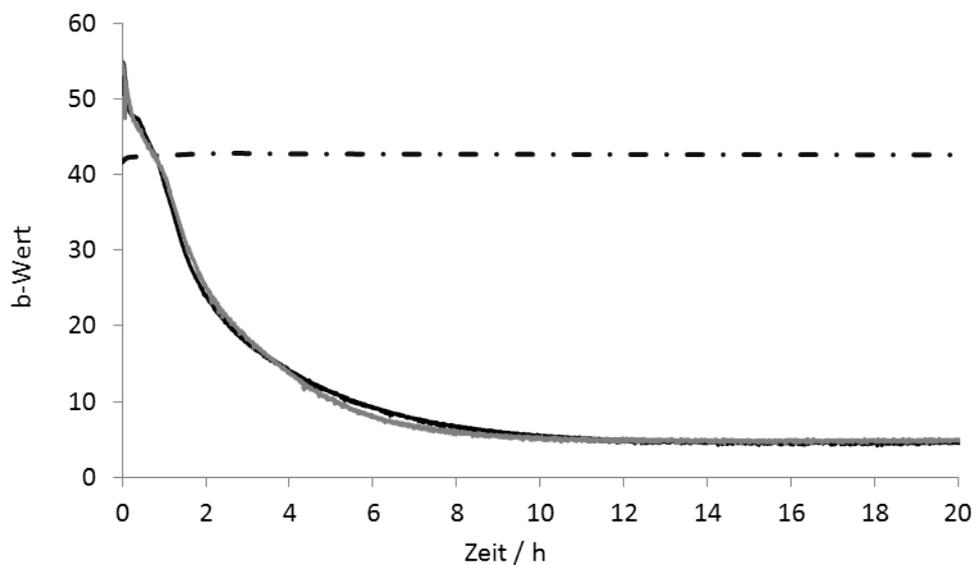


Abbildung 3.82: Bleichung von mit Annatto gefärbter Süßmolke.

graue Linie: mit 18 mU mL^{-1} MsP1, $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX; schwarze Linie; $3,6 \text{ mU mL}^{-1}$ MsP1, $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX; Strich-Punkt-Linie: Negativkontrolle

Für die optimale Bleichung mit dem 3-Enzym-System war es wichtig, das System zur H_2O_2 -Herstellung (Lactase/GOX) so einzustellen, dass im Verlauf der Bleichung MsP1 nicht durch zu hohe H_2O_2 -Konzentrationen gehemmt wird. Die Bleichung (Abb. 3.83)

verlief wie die von Molke (Abb. 3.81) in drei Schritten. Bis 50 min war die geringe H_2O_2 -Konzentration der limitierende Schritt, danach folgte eine schnelle Umsetzung (bis 3 h) und schließlich die vollständige Bleichung mit einem b-Wert von 2,4 nach insgesamt 7 h. In der Negativkontrolle, welche keine Lactase enthielt, fand keine Bleichung statt.

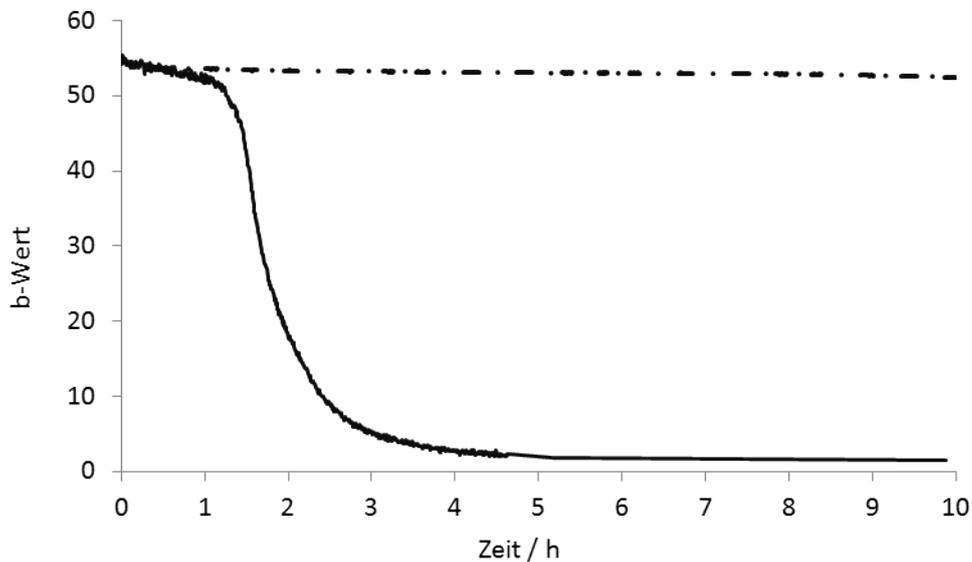


Abbildung 3.83: Bleichung von mit β,β -Carotin gefärbter Milch mit dem 3-Enzym-System. Der Enzymmix beinhaltete MsP1 (5 mU mL^{-1}), GOX ($2,3 \text{ mU mL}^{-1}$) und saure Lactase (1 mU mL^{-1}) (schwarze Linie). Die Negativkontrolle beinhaltete keine saure Lactase (Strich-Punkt-Linie).

4 Diskussion

4.1 Submerskulturen von *Mycetinis scorodonius*

Bioraffinerien haben eine wachsende Bedeutung bei der Erzeugung von Energie und der Deckung unseres steigenden Energiebedarfs. Insbesondere Biogasanlagen haben noch einen hohen Optimierungsbedarf bezüglich der eingesetzten Substrate und der Verwertung der Gärreste. Schon jetzt ist die Menge an Gärresten groß, z.B. fielen in 226 landwirtschaftlichen Biogasanlagen in Thüringen (Stand 01.01.2012) 3,5 Mio. m³ Biogasgülle bzw. Gärrest an. Als Substrat für Biogasanlagen werden unterschiedliche Mischungen aus Stroh, Getreide (auch Silage) und Nutztierkot, wie Schweine- und Rindergülle sowie Hühnermist eingesetzt. Durch die Zugabe von Kot wird der Gesamtstickstoff- und Ammonium-Gehalt, der im Stroh/Getreide nur wenige Prozent ausmacht, im Substrat erhöht. Zusätzlich erhöht sich der Anteil an Ammonium nach der Gärung, so dass in den Rückständen einer Biogasanlage der Ammoniumgehalt ~70 % des Gesamtstickstoffgehalts erreichen kann (Reinhold und Mumdey, 2012). In dieser Arbeit wurde *M. scorodonius* sowohl auf den Rückständen einer Biogasanlage von EnviTec Biogas (Lohne), die mit Gülle, Maissilage, Hühnermist, Ganzpflanzensilage und Maisspindeln inklusive Körnern beschickt wird, als auch auf reinem Maisstroh kultiviert. Maisstroh besteht aus ~36,4 % Glucose, ~17,0 % Xylose, 16,3 % Lignin sowie 8,0 % Feuchte und 6,6 % Asche, sowie Arabinose, Mannose und Galactose, die zusammen ~4,5 % ergeben (Cybulska et al., 2012).

Im ersten Schritt des Biogassyntheseweges erfolgt die Hydrolyse der Polymere zu niedermolekularen Kohlenhydraten, die dann nach der Acidogenese in der Methanogenese zu Methan (Abb. 4.1) abgebaut werden. Die Hydrolyse der Polymere erfolgt über von den Bakterien exprimierte Enzyme, wie Cellulasen, Cellobiasen, Xylanasen, Amylasen, Lipasen und Peptidasen (Weiland, 2010). Da Lignin nicht abgebaut wird, findet kein vollständiger Abbau von Lignocellulose wie Stroh statt. Eine Möglichkeit zur Vorbehandlung und zur besseren Verfügbarkeit von Lignocellulosen bietet eine Vorbehandlung mit Pilzen (Ghosh und Bhattacharyya, 1999) (Mackulak et al., 2012) (Muthangya et al., 2009). Sie sind in der Lage, verschiedenste Enzyme zum Abbau von Lignocellulosen zu sekretieren. Eine andere Möglichkeit der Vorbehandlung ist der direkte Einsatz von lignolytischen Enzymen (Frigon et al., 2012).

Lignocellulolytische Enzyme werden in zwei Kategorien eingeteilt: Hydrolytische und Oxidative. Oxidative Enzyme sind involviert in den Abbau von Lignin. Dazu gehören Laccasen (EC 1.10.3.2), die kupferhaltige Oxidoreductasen (Tissieres, 1949) sind. Sie enthalten 4 Kupferatome (Yoon et al., 2007) und katalysieren eine Ein-Elektronen-Reaktion zur Oxidation von Substraten mit Hilfe von O₂ (Lee et al., 2002). Neben den Laccasen werden verschiedene Peroxidasen (EC 1.11.1) sekretiert. Zu den lignolytischen Enzymen werden die zur Klasse II gehörenden Mn-Peroxidasen, Lignin-Peroxidasen

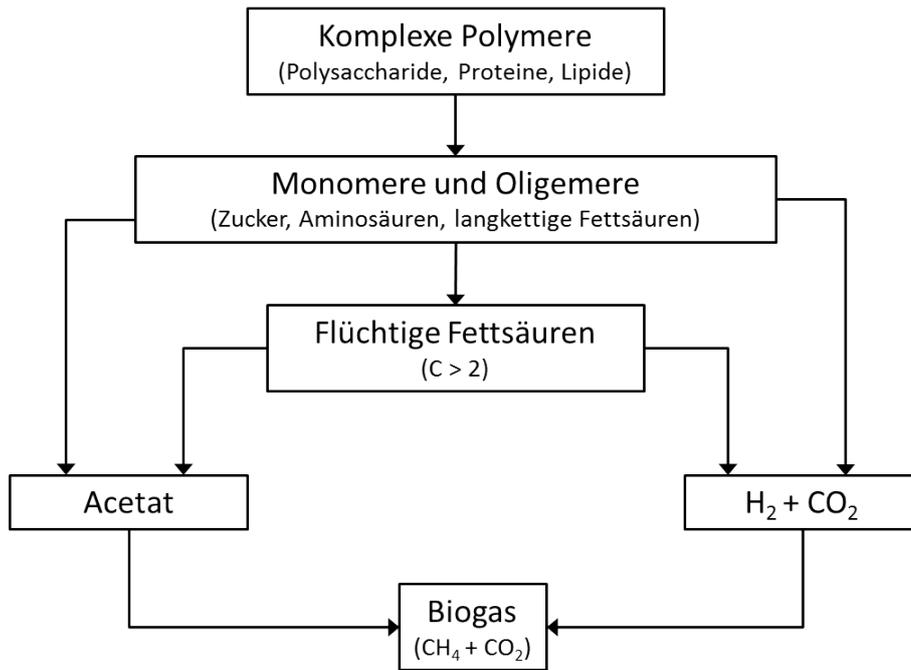


Abbildung 4.1: Stufen des Biogassyntheseweges nach (Weiland, 2010)

(Gold et al., 2000) und polyvalente Peroxidasen (Caramelo et al., 1999) sowie die DyP-Typ Peroxidasen gezählt. Manganperoxidasen oxidieren Mn^{2+} zu Mn^{3+} und wurden erstmals für *Phanerochaete chrysosporium* beschrieben (Kuwahara et al., 1984). Mit organischen Säuren komplexiertes Mn^{3+} ist in der Lage, Ligninstrukturen aufzubrechen (Joseleau et al., 1994). Polycyclische Aromaten wurden mit Hilfe von MnP und ungesättigten Fettsäuren oxidiert (Moen und Hammel, 1994). Als erste DyP wurde Dec 1 aus dem Pilz *Bjerkandera adusta* (ehemals fälschlicherweise als *Thanatephorus cucumeris* / *Geotrichum candidum* identifiziert) gereinigt (Kim und Shoda, 1999). DyP-Typ-Peroxidasen zeigen eine Aktivität zu einer für Peroxidasen unüblichen Substratklasse, den Anthrachinon-Farbstoffen (Sugano et al., 2006). Für die Funktion benötigen die Peroxidasen H_2O_2 , welches Pilze über weitere Enzyme, wie z.B Aryl-Alkohol-Oxidasen (Kim et al., 2001), zur Verfügung stellen.

Cellulasen und Xylanasen übernehmen den Abbau des Kohlenhydratgerüsts, welches aus Cellulose und Hemicellulosen besteht. Je nach Angriffsort der Hydrolyse werden die Cellulasen in Endocellulasen (EC 3.2.1.4) (Pettersson und Porath, 1963), (Henriksson et al., 1999), Exocellulasen (EC 3.2.1.91) (Uzcategui et al., 1991) (Willick und Seligy, 1985) und β -Glucosidasen (EC 3.2.1.21) (Morais et al., 2002) unterteilt. Die Kombination aller Cellulasen ergibt einen effizienten Enzymmix zum Abbau von Cellulose (Vincken et al., 1994). Xylanasen können in Endo-1,4- β -Xylanasen (EC 3.2.1.8) (Wong et al., 1988) und β -D-Xylosidasen (EC 3.2.1.37) (Biely et al., 1997) eingeteilt werden. Zusätzlich zu diesen Enzymen wurde eine hemicelluloseabbauende Xyloglucanase entdeckt (Grishutin et al., 2004).

Xylan ist über Estergruppen von Ferulasäure und *p*-Coumarsäure mit Lignin verknüpft (Grabber et al., 2000) (Ishii, 1997). Zur Hydrolyse der Esterbindungen zwischen

Lignin und der Arabinose im Xylan werden Esterasen sekretiert. Bekannt sind Acetyl-Xylan Esterasen (EC 3.1.1.6) (Liu und Ding, 2009) und Feruloyl-Esterasen (EC 3.1.1.73) (Castanares et al., 1992) (Caufrier et al., 2003) sowie Glucuronylesterasen (Spanikova und Biely, 2006).

Oxidative Enzyme haben eine sehr breite Substratspezifität gegenüber Lignin. *M. scorodoni* exprimiert die β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen MsP1 und MsP2 (Scheibner et al., 2008). Es stellte sich die Frage, in welchem Zusammenhang mit Laccase und den hydrolytischen Enzymen Cellulase und Xylanase MsP1 von dem Pilz exprimiert wird. In dieser Arbeit wurden die oxidativen Enzyme Laccasen, Peroxidasen, β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen und die hydrolytischen Enzyme Cellulasen, Xylanasen und Esterasen sowie die Glucose-, Phenol-, und Proteingehalte zeitabhängig im Verlauf einer Kultivierung des Pilzes *M. scorodoni* bestimmt.

Die Aktivität der einzelnen Enzyme wurde mit jeweils unterschiedlichen Substraten bestimmt. Deswegen ist ein Vergleich der absoluten Aktivitäten der in dieser Arbeit bestimmten Enzyme nicht möglich. Jedoch kann die zeitliche Änderung der Enzymaktivitäten sowie die Glucose- und Proteinkonzentration untereinander in Beziehung gebracht werden. Von den hier gemessenen Enzymen stieg die Aktivität der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen als lignolytische Enzyme am zweiten Tag an und zeigte an diesem Tag ein Maximum. Nach dem Überimpfen der Vorkultur betrug die Konzentration an Glucose in der Hauptkultur $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ bis $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (Abb.3.8). Für verschiedene Pilze wie *Trametes villosa* (Yamanaka et al., 2008), *Botryosphaeria sp* (Dekker und Barbosa, 2001) und *Trametes pubescens* (Galhaup et al., 2002) wurde gezeigt, dass Glucose im Medium die Produktion von lignolytischen Enzymen inhibiert.

Die beiden Enzyme Cellulase und Xylanase konnten erst ab Tag 4 gemessen werden. Bis Tag 3 war die Glucosekonzentration so hoch, dass der Xylanase- und Cellulase-Assay mit dem Nachweis an reduzierenden Zuckern nicht durchgeführt werden konnte. Die Aktivität der beiden Enzyme war an Tag 4 hoch und hatte ein Maximum an Tag 6. Bailey *et al.* wiesen darauf hin, dass die Messung der Enzymaktivitäten mittels Nachweis von reduzierenden Zuckern fehlerhaft sein kann, wenn nicht darauf geachtet wird, dass die Messung innerhalb des Fließgleichgewichts während der Enzymkinetik stattfindet (Bailey, 1988). Die Linearität der Xylanase- und Cellulase-Assays wurde bei diesen Messungen zuvor nachgewiesen. Die Laccaseaktivität sowie die Cellulase- und Xylanaseaktivität hatten am selben Tag Maxima. Die Aktivität der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen hatte an diesem Tag ein Minimum. Das gleiche Bild ergab sich auch an Tag 15, wieder mit einem Maxima für Xylanase-, Cellulase- und Laccaseaktivitäten und einem Minimum der Aktivität von β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen. An diesem Tag stieg auch insgesamt die Proteinkonzentration. Im Laufe der gemessenen 18 Tage ergab sich ein wellenförmiges Expressionsmuster. Die Änderung der Xylanase-, Cellulase- und Laccaseaktivität erfolgte nach Änderung der Aktivität der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen.

Gosh *et al.* konnten in ihren Studien an *Pleurotus ostreatus* und *P. sajor-cuju*, die auf Bananenblattstämmen kultiviert wurden, verschiedene Cellulasen nachweisen. Hierzu wurden verschiedene Substrate für den Cellulasenachweis genutzt. Mehrere

Expressionsmaxima wurden bei einer Kultivierungsdauer von 48 Tagen detektiert. Die Aktivitätsmaxima der β -Glucosidase und der Cellulase, die mit Carboxymethylcellulose nachgewiesen wurden, sowie der Xylanase traten an Tag 16 auf. Das Maximum der Cellulaseaktivitäten, die mit AvicelTM nachgewiesen wurden, trat erst an Tag 24 auf. An diesem Tag stieg auch die Laccaseaktivität in den Kulturen beider Pilze (Ghosh et al., 1998). Bei den Hydrolasen, wie auch schon bei den Oxidasen (lignolytische Enzyme) gezeigt, werden verschiedene Formen zu verschiedenen Zeiten exprimiert. Xu *et al.* kultivierten *Irpelex lacteus* auf Maisstroh in SSF. Zum Nachweis des Strohabbaus wurden die sekretierten Enzyme und der Gewichtsverlust der jeweiligen Stroh-Komponenten (Hemicellulose, Cellulose und Lignin) gemessen. Hemicellulose wurde als erstes Polymer abgebaut, gefolgt von der Cellulose und letztlich Lignin. Ein Teil der abgebauten Polysaccharide wurde auch im Medium als reduzierende Zucker wiedergefunden. Bei der Messung der Cellulaseaktivität mit Filterpapier wurden die höchsten Aktivitäten der Gesamtkultivierungsdauer zwischen Tag 40 und 60 detektiert. Gleichzeitig wurde die maximale Aktivität von LiP, das das dominierende ligninabbauende Enzym war, gemessen. MnP wurde nicht detektiert (Xu et al., 2009).

Je nach Pilz werden die verschiedenen lignolytischen Enzyme LiP, Laccase und MnP zu verschiedenen Zeiten und in unterschiedlichem Maße exprimiert. MnP, Ligninperoxidase (Zeng et al., 2013) und Laccase scheinen die wichtigsten Enzyme zum Ligninabbau zu sein. Manche Pilze produzieren nur eines der genannten Enzyme. *Marasmius quercophilus* z.B. produziert auf Steineichenblättern vorwiegend Laccasen, keine LiP und wenig MnP. Tagger *et al.* wiesen nach, dass Laccase aus *M. quercophilus* Ligninabbauprodukte, wie *p*-Coumarylalkohol und Coumarsäure, Ferulasäure, Coniferylalkohol, Sinapylalkohol und Sinapinsäure, Vanillin, Vanillylalkohol und Vanillinsäure sowie Syringasäure (Abb. 4.2) transformiert (Tagger et al., 1998). *Pleurotus spec* haben in einer Untersuchung im Vergleich zu anderen Pilzen zwar die höchste Laccaseproduktion, sind aber dabei die schlechtesten Ligninabbauer (Knezevic et al., 2013).

In den hier untersuchten Kulturen von *M. scorodoni* wurden die höchsten Phenolkonzentrationen an den Tagen 3, 8 und 16 detektiert. Zeitgleich sank an diesen Tagen die Laccaseaktivität, während die Aktivität der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen anstieg. Laccase wurde an den Tagen nach dem Anstieg der Phenolgehalte exprimiert. Ergebnisse von Evans lassen vermuten, dass Laccase für die Polymerisation der entstehenden Ligninabbauprodukte zuständig ist. Bei *Coriolus versicolor* wurde Lignin abgebaut, obwohl Laccase durch Antikörper gehemmt wurde. Die Molekulargewichte der Ligninabbauprodukte waren jedoch niedriger in den Kulturen mit inhibierter Laccase als bei den Kulturen mit aktiver Laccase. Durch Zugabe von Catalase konnte der Ligninabbau inhibiert werden, was zeigt, dass hier Peroxidasen ligninabbauend sind (Evans, 1985). Die Aufgabe der Laccase ist somit unter anderem, Ligninabbauprodukte, wie die entstehenden Phenole, in für den Pilz unschädliche Komponenten zu transformieren. Wie in Kapitel 3.4.4 gezeigt, wurde MsP1 schon bei niedrigem Gehalt von Coniferylalkohol in der Reaktion mit β,β -Carotin gehemmt. Dies könnte der Grund sein, warum die Expression der Laccase bei *M. scorodoni* der Expression von β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen zeitlich nachgeschaltet ist. In dieser Arbeit wurde *M. scorodoni* auf gewaschenem und ungewaschenem Stroh kultiviert. Ein Unterschied im zeitaufgelösten Expressionsmuster konnte nur in der Expression der Laccase beobachtet werden. Die

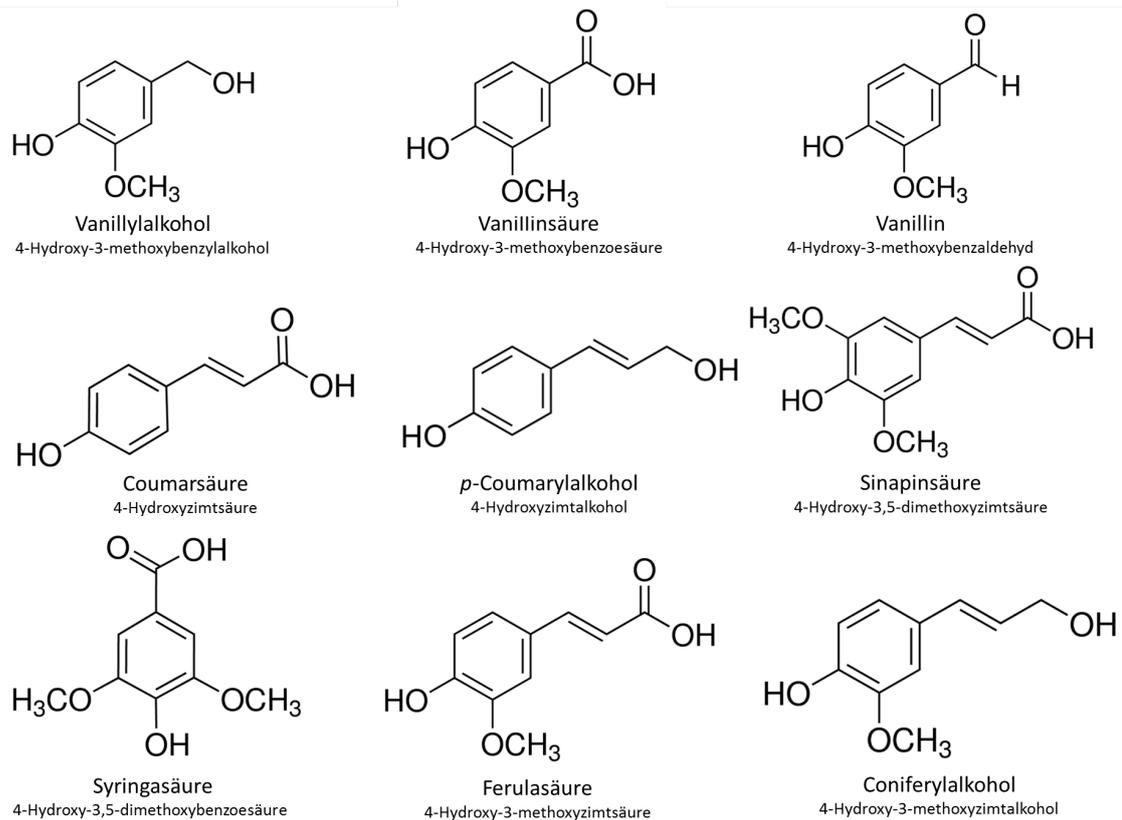


Abbildung 4.2: Ligninabbauprodukte, die von Laccase aus *M. quercophilus* transformiert werden. 1: Vanillylalkohol (4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol), 2: Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure), 3: Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd), 4: Coumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure), 5: *p*-Coumarylalkohol (4-Hydroxy-Zimtalkohol), 6: Sinapinsäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure), 7: Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure), 8: Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure), 9: Coniferylalkohol (4-Hydroxy-3-methoxyzimtalkohol). Nach (Tagger et al., 1998)

Laccaseaktivität lag in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh um 1/3 höher als in den Kulturen mit gewaschenem Stroh. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Laccase als Aufgabe die Polymerisierung von gelösten phenolischen Substanzen hat.

Der Ligninabbau wurde für verschiedene Enzyme auch mit Modellsubstraten, die eine β -O-4-Bindung beinhalten, nachgewiesen. Diese wurden mit Laccase (Bohlin et al., 2009) und verschiedenen Peroxidasen (Dodson et al., 1987) (Perez und Jeffries, 1990) (Liers et al., 2010) abgebaut. Für die Peroxidasen LiP und MnP wurde die Fähigkeit zum Abbau von Lignin mit gereinigten Kulturüberständen von *Phanerochaete chrysosporium* nachgewiesen, hierfür wurde ^{14}C -markiertes Lignin eingesetzt (Hammel und Moen, 1991) (Wariishi et al., 1991). Hofrichter *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass die von dem Pilz *Nematoloma frowardii* produzierte Mn-Peroxidase in Gegenwart von ebenfalls produzierten organischen Säuren das synthetische Lignin mineralisiert, wobei dieser Pilz

dabei keine LiP und nur sehr wenig Laccase exprimierte (Hofrichter et al., 1999). Durch die Produktion der organischen Säuren wird das Medium von vielen Basidiomyceten angesäuert (Yamanaka et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde eine zweite Kultivierung von *M. scorodoni* auf Stroh und den Rückständen einer Biogasanlage durchgeführt. In der Kultivierung war die Aktivität von Laccasen und β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen an Tag 1 und 2 gering. Die Aktivität der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen stieg an Tag 3 und sank wieder an Tag 4. Gleichzeitig stieg an den Tagen 4 bis 6 die Laccaseaktivität. Der Verlauf im Expressionsmuster der mit ABTS gemessenen Peroxidasen unterscheidet sich von dem mit β,β -Carotin bzw. Mangan gemessenen. Die mit ABTS gemessenen Peroxidasen zeigten schon an Tag 1 sehr hohe Aktivität und hatten ähnlich wie die Laccasen Aktivitätsmaxima an den Tagen 1, 4 und 9. Die β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen dagegen hatten das erste Aktivitätsmaximum an Tag 2 (Kulturen angeimpft mit homogenisierter Vorkultur) bzw. Tag 3 (Kulturen angeimpft mit unbehandelter Vorkultur). Die Expression der Mn-Peroxidasen begann erst ab Tag 8, mit Aktivitätsmaxima an Tag 10 bis 11 und Tag 14, gleichzeitig mit den Aktivitätsmaxima der β,β -Carotin abbauenden Peroxidasen (Kapitel 3.1.2, Abb. 3.9 bis 3.20).

Exprimierte Menge, Zeitpunkt und Art der lignolytischen Enzyme variieren von Pilz zu Pilz. Keines der Enzyme kann alleine Lignin vollständig abbauen. Erst ein synergetisches Zusammenspiel von verschiedenen Enzymen führt zum Ligninabbau. Zusätzlich sekretieren Pilze Isoenzyme, die verschieden spezialisiert sind (Johannson und Nyman, 1993) (Lobos et al., 1994) (D'Souza et al., 1999) (Scheibner et al., 2008). In einer Studie von Arora *et al.* wurde die Aktivität von lignolytischen Enzymen und der verbleibende Ligningehalt im Substrat während der Kultivierungsdauer gemessen. Bei allen gemessenen Pilzen wurden an dem Tag mit dem höchsten Ligninverlust im Substrat die Aktivitätsmaxima der jeweils exprimierten lignolytischen Enzyme gemessen. Diese traten entweder gleichzeitig (*Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia fascicularia*) oder mit nacheinander folgenden Maxima (*Daedalea flavida*, *Phlebia floridensis*) auf. *Phanerochaete chrysosporium* und *Trametes versicolor* exprimierten hohe LiP-Aktivitäten, wenig MnP und fast gar keine Laccase, waren jedoch in der Lage, Lignin abzubauen. *Phlebia fascicularia* exprimiert wesentlich höhere Laccaseaktivitäten als die anderen beiden Pilze. Die Ligninabbaurate war ebenfalls höher. Bei Inkubationszeiten von 32 Wochen wurden mehrere Expressionsmaxima der jeweiligen Enzyme beobachtet (Arora et al., 2002). *Phlebia floridensis* produzierte alle drei Enzyme Laccase, LiP und MnP. Wie *M. scorodoni* exprimiert *Phlebia floridensis* bei der Inkubation auf Weizenstroh Laccase gegenläufig zu den Peroxidasen. Als erstes stieg die LiP-Aktivität, dann folgte ein Maximum der Laccaseaktivität und als diese wieder sank, stieg die MnP-Aktivität. Ein zweites Maximum der Laccaseaktivität folgte nach einem Absinken der MnP-Aktivität (Arora und Gill, 2005).

In einer Studie zeigten Elisashvili *et al.* an sieben verschiedenen Weißfäulepilzen, die auf verschiedenen Substraten kultiviert wurden, dass die Expression der Enzyme stark variiert. Sie untersuchten Cellulase-, Xylanase-, Mn-Peroxidase- und Laccaseaktivitäten. Zum Beispiel erhielt man die höchste Laccaseaktivität (7.620 U L^{-1}) mit dem Pilz *Cerrena maxima*, welcher in Submerskultur auf Bananenschalen kultiviert

wurde (Elisashvili et al., 2008). *M. scorodoni* exprimiert in der hier vorliegenden Arbeit die höchste Laccaseaktivität auf Biogasanlagenrückständen mit einer Aktivität von 2.715 U L^{-1} an Tag 9. Bei den Studien von Elisashvili *et al.* fällt auf, dass alle Pilze in Submerskulturen eine höhere Laccaseaktivität als in Emerskulturen aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurden in den Emerskulturen höhere MnP-Aktivitäten, mit Ausnahme von *Cerrena maxima* und *Coriolopsis polyzona*, gemessen (Elisashvili et al., 2008).

Expressionsmuster sind nicht nur von Pilz zu Pilz verschieden, sondern verändern sich bei *co*-Kultivierung von verschiedenen Pilzen im Vergleich zur Einzelkultivierung (Dong et al., 2014) und unterscheiden sich bei einzelnen Pilzen auch auf verschiedenen Substraten. Bei *Phlebia floridensis* stiegen die Aktivitäten von Laccase und MnP in stickstoffreichen und ligninhaltigen Medien. Die Aktivität von LiP sank jedoch in diesen Medien. Die Expression der lignolytischen Enzyme Laccase und LiP wird in diesem Pilz aber auch durch die Kohlenstoffquelle beeinflusst, wobei Xylan die Expression dieser Enzyme erhöht (Arora und Gill, 2005). Bei dem gleichen Pilz ändern sich die Expressionsmuster schon bei geringen Unterschieden des Substrates. Arora *et al.* haben gezeigt, dass allein der Einsatz von Weizen aus verschiedenen Anbaugebieten zur Veränderung der Laccaseexpression führt (Arora und Sharma, 2009).

Mit Ausnahme der Esterasen wurden die detektierten Enzyme bei *M. scorodoni* in den Kulturen mit den Biogastrückständen (Abb. 3.11, 3.14, 3.20) mit einer ~ 10 -fachen Aktivität im Vergleich zu den anderen Kulturen exprimiert. Die Aktivität der β, β -Carotin abbauenden Peroxidasen (Abb. 3.17) war sogar um das 14fache höher. Auch ist in diesen Kulturen am deutlichsten zu sehen, dass Laccase als erstes Enzym in sehr hohen Aktivitäten exprimiert wird. Ebenfalls gab es einen wellenförmigen Wechsel in der Expression von β, β -Carotin abbauenden Peroxidasen und Laccasen, wobei dieser am deutlichsten an den Aktivitätsmaxima (β, β -Carotin abbauenden Peroxidasen: Tag 7 und Laccase: Tag 9) der beiden Enzyme zu sehen war. Im Biogassyntheseweg wird ein Teil der leicht zugänglichen Kohlenhydrate abgebaut (Weiland, 2010). Um weiter Cellulose und Hemicellulose abzubauen, muss zusätzlich Lignin abgebaut werden. Dies könnte der Grund sein, warum *M. scorodoni* auf den Rückständen aus einer Biogasanlage höhere Aktivitäten an ligninabbauenden Enzymen exprimiert. *Phellinus robustus* zeigte nur auf Hühnerfedern eine antizyklische Expression mit vorgeschalteter Laccase und folgender MnP-Expression. Auf Mandarinenschalen, Mais und Weizenkleie wurden die beiden Enzyme gleichzeitig exprimiert (Songulashvili et al., 2006). Songulashvili *et al.* kultivierten *Ganoderma lucidum* auf verschiedenen landwirtschaftlichen Abfällen. Je weniger Zucker die Abfälle beinhalteten, desto mehr Laccasen und MnP wurden exprimiert (Songulashvili et al., 2007).

Die Enzymaktivitäten zeigen jedoch nicht die tatsächlich exprimierte Menge der Enzyme, da die Aktivität der verschiedenen Enzyme durch Mediatoren, *co*-Faktoren und auch Inhibitoren, die in dem komplexen Gemisch vorhanden sind, reguliert werden. In dieser Arbeit wurde im Kapitel 3.3.6 gezeigt, dass die MsP1-Aktivität bei zu hohen Wasserstoffperoxidkonzentrationen stark inhibiert wird. Auf der anderen Seite wird die Aktivität gegenüber β, β -Carotin jedoch durch verschiedene Mediatoren stark erhöht (Kapitel 3.4.4). Auch für Laccasen (Camarero et al., 2008) (Diaz-Gonzalez et al., 2011) und HRP (*horseradish peroxidase*) (Kawai et al., 2006) wurden verschiedene natürliche

Mediatoren beschrieben. Es gibt viele Nachweise, dass diese Enzyme C-C-Bindungen im Lignin spalten. Der Nachweis wurde schon mit verschiedenen Modellsubstraten geführt. Manche Enzyme bedürfen für den Abbau der Dimere Mediatoren (Kawai et al., 2006), andere können dies auch ohne (Caramelo et al., 1999) (Liers et al., 2010). Eine weitere Ungenauigkeit bei der Detektion von Enzymaktivitäten in Überständen ist, dass die Aktivität von membrangebundenen Enzymen nicht nachgewiesen wird. Eine Möglichkeit zur direkten Detektion der Enzymexpression bietet die RT-PCR, mit der auch Genfamilien und Cluster erkannt werden können (Broda et al., 1996). Dieses Verfahren würde es ermöglichen, die tatsächliche Expression von MsP1 und anderen β,β -Carotin abbauenden Enzymen gegenüber der Expression von Laccase darzustellen, ohne den Einfluss des Mediums auf die Aktivität der Enzyme berücksichtigen zu müssen.

In dieser Arbeit wurde der Pilz *M. scorodoni* auf Maisstroh und den Rückständen einer Biogasanlage, welche ebenfalls Stroh enthielten, kultiviert. Um die Esterbindung zwischen Lignin und Xylan zu spalten, sekretiert der Pilz Esterasen. Für eine Feroyl-Esterase aus *Aspergillus niger* wurde gezeigt, dass 16 % der zugänglichen *p*-Coumarsäure und 59 % der Ferulasäure aus Weizenstroh gelöst wurden (Benoit et al., 2006). In dieser Arbeit wurde die Esterase-Aktivität (Abb. 3.21, 3.22, 3.23) mit *p*-Nitrophenylacetat nachgewiesen, so dass hier nicht zwischen den einzelnen natürlichen Substraten und Aufgaben der verschiedenen Esterasen unterschieden wurde. Für den Ligninabbau stehen den verschiedenen Pilzen unterschiedlich spezialisierte Esterasen zur Verfügung. Bei *Penicillium pinophilum* konnte extracellulär eine *p*-Coumaroyl/Feruloyl-Esterase gefunden werden. Die Esteraseaktivität konnte nur auf Xylan gezeigt werden. Auf Weizenstroh wurde durch den Nachweis von *p*-Coumar- und Ferulasäure die *p*-Coumaryl/Feruloyl-Esteraseaktivität nur in Anwesenheit von Xylanasen gemessen. Dadurch wurde gezeigt, dass im Sekretom des Pilzes synergetische Effekte beim Abbau von Xylan und dessen Bindung an Lignin auftreten. Die Esterase hatte eine höhere Affinität zu den Methylestern der *p*-Coumarsäure als zu denen der Ferulasäure (Castanares et al., 1992). Eine der bekanntesten Esterasenfamilien stellen die Feruloylesterasen dar. Die Feruloylesterase hydrolysiert an Arabinose sowohl in 2-O als auch in 5-O gebundenes Ferulat (Rumbold et al., 2003). Der Schimmelpilz *Aureobasidium pullulans*, der auf Birken-Xylan kultiviert wurde, produziert Feruloylesterase. Das Enzym weist ein hohes Temperaturoptimum von 60 °C auf. Eine weitere Gruppe der Esterasen sind die Glucuronoylerasen, die Methylester von 4-O-Methyl-D-Glucuronsäuren (MeGlcA) hydrolysieren (Abb. 4.3). Die erste Glucuronoylerase wurde im celluloseabbauenden Enzymsystem in *Schizophyllum commune* gefunden (Spanikova und Biely, 2006). Im Sekretom des thermophilen Pilzes *Sporotrichum thermophile* wurde ebenfalls eine Glucuronoylerase mit einer Thermostabilität bei 50 °C gefunden (Vafiadi et al., 2009).

Die hier gemessenen Expressionsmuster von *M. scorodoni* lassen vermuten, dass MsP1 eine wichtige Rolle im Abbau von Lignin hat. Da die MsP1-Expression der Laccase vorgeschaltet war, könnte wiederum die Laccase eine Schutzfunktion haben, um die entstandenen für den Pilz toxischen Ligninmonomere zu polymerisieren. MsP1 wurde anschließend als isoliertes Enzym in der Reaktion mit organosolv Lignin und Maisstroh untersucht, um ligninabbauende Reaktionen nachzuweisen.

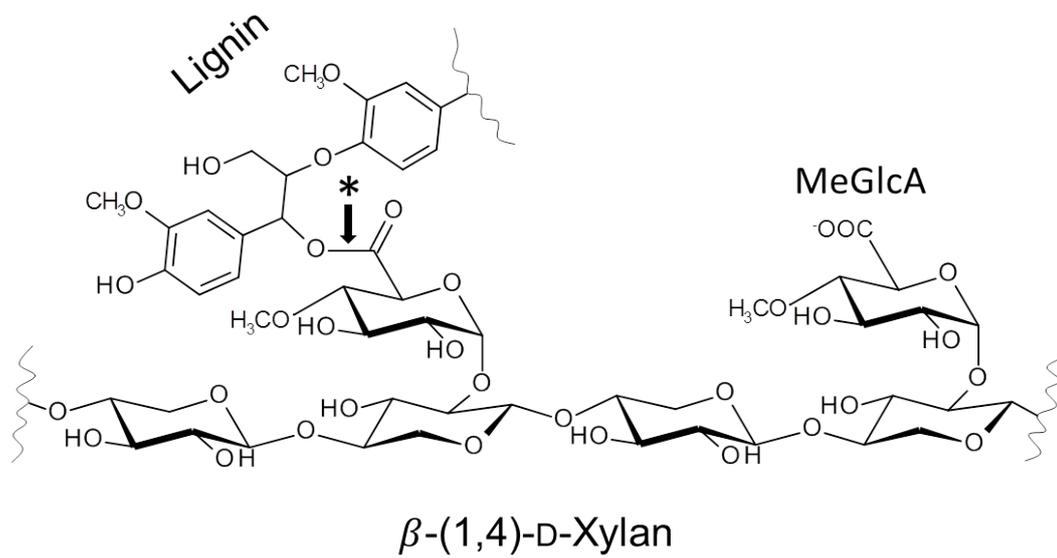


Abbildung 4.3: Esterbindung zwischen MeGlcA-Resten von Glucuronoxylan und den aromatischen Alkoholen des Lignins. * Angriffsort der Glucuronoyl-terasen. Nach (Spanikova und Biely, 2006).

4.2 Ligninabbau

Das Interesse an Bioethanol zweiter Generation und an Biogasanlagen steigt zunehmend. Es ist eine große Herausforderung, ein kostengünstiges Substrat wie Lignocellulosen aus Gräsern oder Holz, welche als Nebenprodukte in der Agrarwirtschaft anfallen, für die Herstellung von Bioethanol und Biogas nutzbar zu machen (Ragauskas et al., 2006). Bei der Herstellung von Bioethanol aus Lignocellulose hat sich der Saccharifikationsprozess bisher als der kostenintensivste erwiesen (Lynd et al., 2002). Bei diesem ist die Entfernung von Lignin aus Lignocellulosen sehr energieaufwendig. In dieser Arbeit wurde die Peroxidase MsP1 eingesetzt, um die Depolymerisation von Stroh zu erreichen. Weißfäulepilze können sehr effektiv mit Hilfe der exprimierten Peroxidasen Lignin aus Lignocellulosen abbauen (Dias et al., 2010). Um grundsätzlich nachzuweisen, dass MsP1 mit Lignin reagiert und dieses auch depolymerisiert, wurde organosolv Lignin eingesetzt. Organosolv Lignin entsteht durch thermische Behandlung der Lignocellulose mit organischen Lösungsmitteln und einem Säurekatalysator (Torre et al., 2013) und basiert auf der Löslichkeit des Lignins in verschiedenen organischen Lösemitteln (Taherzadeh und Karimi, 2008) (Zhao et al., 2009). Für die Ethanolproduktion aus Biomasse wird der Organosolv-Prozess für Lignin (z.B. ALCELL™) seit den 90er Jahren im größeren Maßstab verwendet. Organosolv Lignin ist relativ rein und beinhaltet nur wenig der anderen Komponenten wie Kohlenhydrate, Sulfate oder Asche (Pye und Lora, 1991). In dieser Arbeit wurde die Umsetzung des organosolv Lignins in 30 % Ethanol durchgeführt. Es hat sich gezeigt, dass bei diesem Lösemittelgehalt nur Ligninmoleküle mit einem Molekulargewicht von unter $\sim 240 \text{ g mol}^{-1}$ in Lösung gehen.

Lignin aus Weichholz beinhaltet typischerweise mehr Coniferyl- und Lignin aus Gräsern mehr *p*-Coumaryleinheiten (Gosselink et al., 2004). Die zu spaltenden Bindungen im Organosolv-Verfahren sind die β -O-4'-Bindungen, die z.B. im Riesenchinaschilf (*Miscanthus giganteus*) 82 % bis 84 % der Bindungen im Lignin ausmachen, gefolgt von Phenylcoumarin (10 % bis 11 %) und Resinol (6 % bis 7 %) (Bauer et al., 2012). Die Zusammensetzung von Ethanol-organosolv Lignin wurde z.B. aus dem Schmetterlingsflieder detailliert mittels NMR und SEC untersucht. Hallac *et al.* fanden heraus, dass der Polymerisationsgrad um 85 % nach einer Organosolv-Behandlung gesunken war, wobei die Depolymerisation hauptsächlich über die homolytische Spaltung von β -O-4'-Bindungen hervorgerufen wurde. Aus dieser Spaltung resultierten Stilbenstrukturen. Der Polymerisationsgrad der entstandenen Produkte ist definiert als ihr mittleres Molekulargewicht, bezogen auf das mittlere Molekulargewicht von unbehandeltem Lignin ($18.600 \text{ g mol}^{-1}$) in Prozent. Wenn ausreichend Bindungen gespalten werden, entstehen kleinere Moleküle, die in Ethanol löslich sind. β -5'-Bindungen und β - β' -Bindungen zeigten sich resistent bezüglich der Ethanol-Organosolv-Behandlung (Abb. 4.4). Die Alkohole (z.B. Cinnamylalkohol) wiederum können durch die Säurekatalyse zu Ethylethern kondensieren (Hallac et al., 2010). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass MsP1 organosolv Lignin weiter depolymerisieren kann, so dass ausgehend von den Erkenntnissen von Hallac *et al.* MsP1 die in organosolv Lignin noch bestehenden Bindungen spalten kann, wie die genannten β -5'- und β - β' -Bindungen. Für MsP1 wurde nachgewiesen, dass es in der Lage ist, Adlerol (1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-(2-Methoxyphenoxy)propan-1,3-diol), ein nichtphenolisches β -O-4 Ligninmodell dimer, zu spalten (Liers et al., 2013).

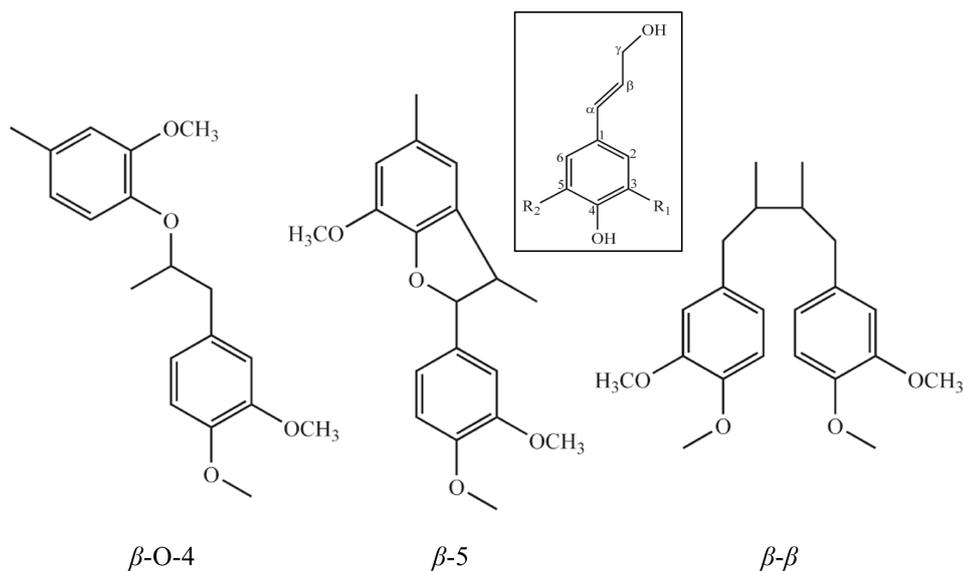


Abbildung 4.4: Einige in Lignin vorkommende Bindungen. β -O-4'-Bindungen werden im Organosolv-Verfahren gespalten, β -5'- und β - β '-Bindungen dagegen nicht. Nach (Hallac et al., 2010).

Die Hauptfraktionen der gelösten Ligninbestandteile, die mit Hilfe der HPSEC nachgewiesen wurden, wiesen Molekulargewichte im Bereich zwischen 240 g mol^{-1} und $\sim 180 \text{ g mol}^{-1}$, auf. Diese Molekulargewichte lassen vermuten, dass es sich hier um Mono- und Dimere des Lignins handelt. Organosolv Lignin aus verschiedenen *Angiospermae* weisen Tetramere, Trimere, Dimere und unterschiedliche Mengen an Monomeren, alle mit Molekulargewichten unterhalb von 1.000 g mol^{-1} auf. Die Molekulargewichte von organosolv Lignin, die höher als 1.000 g mol^{-1} sind, variieren stark je nach Herkunft des Ausgangsmaterials und den Aufschlussbedingungen (Sarkanen et al., 1981).

Im Laufe der Inkubation von der organosolv Lignin-Suspension mit MsP1 lösen sich Ligninmoleküle mit größeren Molekulargewichten ($18.815 \text{ g mol}^{-1}$ bis 1.290 g mol^{-1}). Sarkanen *et al.* bestimmten das Molekulargewicht von gelöstem organosolv Lignin in einer wässrigen $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH Lösung. Im Durchschnitt wiesen die organosolv Lignine von Roterle, Pappel, Weizenstroh, Espe und Bagasse ein Molekulargewicht von 2.000 g mol^{-1} bis 4.000 g mol^{-1} mit einem numerischem Durchschnitt von 800 g mol^{-1} bis 1.200 g mol^{-1} auf. In höheren Konzentrationen (100 g L^{-1}) assoziierten die Ligninmoleküle zu Komplexen mit höheren Molekulargewichten. Sarkanen *et al.* vermuteten, dass die Assoziation vorwiegend zwischen Molekülen mit kleinen und Molekülen mit großen Molekulargewichten stattfindet (Sarkanen et al., 1981). Fragmente von Rutenhirse (*Panicum virgatum*), die im ethanolischen Organosolv-Prozess behandelt wurden, wiesen Molekulargewichte von 4.200 g mol^{-1} mit einem numerischen Durchschnitt von 980 g mol^{-1} auf (Hu et al., 2012).

Industriell hergestelltes organosolv Lignin, welches von Majcherczyk *et al.* mit SEC analysiert wurde, besteht aus Ligninmolekülen mit Molekulargewichten je nach Ausgangsmaterial und Behandlung im Durchschnitt von 4.000 g mol^{-1} bis 7.100 g mol^{-1} mit

einem numerischem Durchschnitt von 1.200 g mol^{-1} bis 1.800 g mol^{-1} . Monomere mit einem Molekulargewicht bis zur Kalibrationsgrenze von 154 g mol^{-1} wurden ebenfalls nachgewiesen (Majcherczyk und Hüttermann, 1997). Die in dieser Arbeit identifizierten Molekulargewichte von $18.818 \text{ g mol}^{-1}$ bis $> 200 \text{ g mol}^{-1}$ für die in Lösung gegangenen Ligninmoleküle liegen in den in der Literatur angegebenen Bereichen. Der Abbau von organosolv Lignin mit MsP1 wurde hier in einer Ethanollösung mit einem Puffer mit dem pH-Wert von 3,5 durchgeführt. Ein großer Teil des Lignins wurde nicht gelöst, in der Suspension wurden die gelösten Bestandteile mittels HPSEC und die ungelösten mit EM und Partikelmessung bestimmt. Mittels HPSEC wurde im Laufe der Inkubation mit MsP1 eine Zunahme und anschließend wieder eine Abnahme der größeren Moleküle ($18.815 \text{ g mol}^{-1}$ bis 1.290 g mol^{-1}) nachgewiesen. So kann vermutet werden, dass unlösliches Lignin durch Verkleinerung der Molekülgröße, verbunden mit dem Einbau von polaren Gruppen durch die Oxidation mittels MsP1, in Lösung gebracht wird. Wenn organosolv Lignin in der Suspension in Komplexen aus Molekülen mit sehr kleinem und Molekülen mit großem Molekulargewicht vorliegt (Sarkanen et al., 1981), könnte eine mögliche Änderung der Ladung auch im Zerfall dieser Komplexe resultieren. Die darauffolgende Verringerung der Molekülgrößen (bis zu $\sim 180 \text{ g mol}^{-1}$) kann durch weiteren Abbau erklärt werden.

Die Molekulargewichte und die funktionellen Gruppen der Ligninfragmente im organosolv Lignin unterscheiden sich je nach eingesetztem Lösungsmittel im Organosolv-Prozess. Mit steigender Lösungskapazität des eingesetzten Lösemittels nimmt der Gehalt an Methoxy-, Phenyl- und aliphatischen Hydroxylgruppen zu (Li et al., 2012c). Die Aktivität von MsP1 gegenüber Lignin hängt wahrscheinlich von Molekulargewicht, Löslichkeit und Redoxpotential des Lignins ab. Des Weiteren werden lösliche Substrate einfacher angegriffen, so dass im Laufe der Inkubation in Lösung gegangene Ligninfragmente schneller depolymerisiert werden.

Ein Problem beim Einsatz von Enzymen zur Hydrolyse von Kohlenhydraten in Lignocellulose ergibt sich dadurch, dass die Enzyme irreversibel an Lignin adsorbieren. Für physikalische Vorbehandlungen wurde gezeigt, dass sich dadurch die Effizienz der Saccharifikation deutlich verringert (Berlin et al., 2006) (Nakagame et al., 2010) (Kumar et al., 2012). Die Interaktion zwischen Lignin und Xylan mit Cellulasen spielt eine wichtige Rolle im Abbau von Cellulose aus Lignocellulosen. Nach einer Organosolv-Behandlung von verschiedenen Substraten verringerte eine höhere Konzentration an Restxylan die initiale Cellulosehydrolyse. Zusätzlich verringerte eine höhere Ligninkonzentration die Gesamtausbeute (Li et al., 2013). Für die unspezifische Adsorption von Cellulasen an Lignocellulosen ist deren Ligninoberfläche verantwortlich (Eriksson et al., 2002), wobei die Cellulase (*Trichoderma reesei*) mehr durch Weichholzlignin als durch aus Maisstroh isoliertes Lignin inhibiert wird (Nakagame et al., 2010). Die Adsorption von Cellulasen an Lignin erhöht sich durch eine Vorbehandlung wie *steam-explosion* (Nonaka et al., 2013). Kristensen *et al.* zeigten, dass eine Adsorption von Cellulasen einen großen Einfluss auf die Hydrolyse von Cellulose hat. Der Einsatz von oberflächenaktiven Substanzen erhöhte die enzymatische Umsetzung von Cellulose auf vorbehandeltem Stroh. Säurevorbehandeltes Stroh (z.B. aus Organosolv-Prozess) lieferte die geringste Ausbeute. Diese konnte durch oberflächenaktive Substanzen gesteigert werden. Der Einfluss der oberflächenaktiven Substanzen auf die Ausbeute war im Vergleich zu den

anderen Vorbehandlungsmethoden größer (Kristensen et al., 2007). Die Adsorption von Cellulase an Lignin ist temperaturabhängig und nimmt mit steigender Temperatur zu. Vermutet wird, dass nicht die cellulosebindende Domäne, sondern das aktive Zentrum für die unspezifische Bindung an Lignin verantwortlich ist (Rahikainen et al., 2013). Auch Xylanasen binden an Stroh, dort hauptsächlich an Lignin und in geringem Maße an Xylan. Die Adsorption ist zu 90 % irreversibel und führt zu einer Inaktivierung. Die Hydrophobizität des Enzyms führt zu der schnelleren Bindung an Lignin im Vergleich zu freiem Xylan (Zilliox und Debeire, 1998). Mittels HPSEC konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass während der Inkubation mit MsP1 Ligninmoleküle mit größeren Molekulargewichten ($\sim 3.800 \text{ g mol}^{-1}$) in Lösung (30 %/Puffer) gehen. MsP1 konnte vermutlich polare Gruppen in das Lignin einbringen, so dass dieses dann im polarem Puffer besser löslich wurde. Durch Änderung der Polarität von Lignin mittels MsP1 würde die Adsorption von Cellulasen an Lignin verringert werden. Die Cellulosehydrolyse würde dadurch erhöht werden.

In dieser Arbeit wurde eine enzymatische Delignifizierung von Maisstroh untersucht. Nach der Vorbehandlung wurde eine Verzuckerung mit Cellulasen, Xylanasen und Pectinasen durchgeführt und die Auswirkung auf die Glucoseausbeute untersucht. Maisstroh besteht aus $\sim 36,4 \%$ Glucose, $\sim 17,0 \%$ Xylose, $\sim 4,5 \%$ Arabinose, Mannose und Galactose, $16,3 \%$ Lignin sowie $8,0 \%$ Feuchte und $6,6 \%$ Asche (Cybulska et al., 2012). Durch eine Vorbehandlung des Strohs mit MsP1 vor der Kohlenhydrathydrolyse konnte die Ausbeute an Glucose unter den gleichen Versuchsbedingungen um bis zu 23% gesteigert werden. Der erfolgreiche Einsatz von MsP1 zur Vorbehandlung von Stroh für die Cellulosehydrolyse wurde patentiert (Zorn et al., 2011). Als zweites Hilfsenzym wurde Xylanase zum Abbau von Arabinoxylan eingesetzt. Die gleichzeitige Zugabe von Pectinasen (Pakarinen et al., 2012) und Xylanasen zu Cellulasen ist förderlich für den Celluloseabbau aus Agrarabfällen (Zhang et al., 2010). Zur Delignifizierung wurden schon als Vorbehandlung für Lignocellulose Enzyme (Wang et al., 2013) (Plácido et al., 2013) sowie die direkte Kultivierung mit Pilzen (López-Abelairas et al., 2013) (Liu et al., 2013) (Tiwari et al., 2013) (Singh et al., 2014b) untersucht. Eine Vorbehandlung von Reisstroh mit *Phanerochaete chrysosporium* für 15 Tage führte nach enzymatischer Hydrolyse mit Cellulasen zu einer Ausbeute an Glucose von $64,9 \%$ (Bak et al., 2009). Bei der Umsetzung von Miscanthusgras wurden 75% der Cellulose zu Glucose hydrolysiert. Dafür wurde das Miscanthusgras vor der Saccharifizierung zuerst enzymatisch mit einem Enzymcocktail aus Cellulasen und Xylanasen (Cellulyve) und anschließend mit dem Organosolv-Verfahren vorbehandelt (Obama et al., 2012). Enzymatische Vorbehandlungen erreichen noch nicht die Ausbeuten von chemisch-physikalischen wie die der Säure- oder Alkalibehandlung mit Ausbeuten von 80% bis 90% (Gharpuray et al., 1983) (Jeoh et al., 2007) (Lee et al., 1983).

Standard ist bis heute die physikalische Vorbehandlung von Stroh zur Delignifizierung, die meist hohe Temperaturen von $120 \text{ }^\circ\text{C}$ bis $220 \text{ }^\circ\text{C}$ sowie den Einsatz von verschiedenen Chemikalien beinhaltet. Lignin wird mit Natriumcarbonat (Kim et al., 2014), mit Ozon (Panneerselvam et al., 2013a) (Panneerselvam et al., 2013b), mit wässriger Ammoniaklösung (Yu et al., 2013) oder wie im Organosolv-Verfahren in organischen Lösungsmitteln mit Katalysatoren für mehrere Stunden behandelt. Als Katalysatoren werden oft Säuren oder auch Chlorsalze und als Lösungsmittel Ethanol

eingesetzt (Torre et al., 2013) (Wildschut et al., 2013) (Sammons et al., 2013). Je nach Temperatur und Zeit werden verschiedene Mengen an Lignin entfernt, wobei nicht die Menge an entferntem Lignin, sondern die erhaltene Zugänglichkeit zum Glucan und die Veränderung der Oberfläche (Porengröße) entscheidend sind (Koo et al., 2012). Bei der thermochemischen Vorbehandlung hat der pH-Wert beim Ligninabbau meist mehr Einfluss als die verwendete Temperatur. Bei der Verwendung von Säuren als Katalysatoren können die Temperaturen im Organosolv-Prozess zwar um ~ 20 °C verringert werden, dabei entstehen jedoch Hydroxymethylfurfural und Furfural (Lim und Lee, 2013) (Wildschut et al., 2013). Essigsäure, Furfural und Hydroxymethylfurfural sind Nebenprodukte der säurekatalysierten Hydrolyse von Hemicellulose und haben eine wachstumshemmende Wirkung auf Fermentationsorganismen in der Ethanolproduktion (Nichols et al., 2008) (Nichols et al., 2010) (Palmqvist und Hahn-Hägerdal, 2000). Durch Trennung von Lignin, Hemicellulose und Cellulose wird die Adsorption der hydrolytischen Enzyme verhindert. Fraktionierung während der Delignifizierung (Bioraffinerie) mit einer Vorhydrolyse der Hemicellulose und anschließendem Organosolv-Verfahren bei hohen Temperaturen liefert einzelne Fraktionen mit Hemicellulose, Cellulose und Lignin, was den Ertrag steigert (Hong et al., 2013), jedoch auch den Aufwand erhöht. Zusätzlich wird die Entstehung der Inhibitoren verhindert, weil weniger Hemicellulose (~ 33 %) im nachgeschalteten Organosolv-Verfahren vorhanden ist (Huijgen et al., 2012).

Die Entfernung von Hemicellulose hat einen größeren Einfluss auf die Saccharifikations-Effizienz als der Ligninabbau (Lv et al., 2013). Mit einem zusätzlichen Abbau von Xylan in Bagasse, z.B. durch Vorbehandlung mit Säure, kann die Ausbeute an Glucose von 20 % auf 96 % gesteigert werden (Santi Junior et al., 2013). Ein Grund, warum enzymatische Vorbehandlungen, wie hier mit MsP1, die Effizienz von physikalischen Vorbehandlungen nicht erreichen, könnte die hier mangelnde Entfernung der Hemicellulose sein. Zu überlegen wäre, ob eine Vorbehandlung mit lignolytischen Enzymen in Kombination mit Xylanasen eine darauffolgende Saccharifikation weiter steigern würde.

Wird jedoch Xylose als fermentierbarer Zucker gewünscht (Ohgren et al., 2006) (Kötter und Ciriacy, 1993) (Nikolic et al., 2009), wäre dieser bei einer physikalischen Vorbehandlung nach einem Waschschrift verloren. Eine chemische Vorbehandlung, bei der bis zu 7 % des Lignins entfernt, aber 100 % Glucan und bis zu 75 % des Xylans erhalten bleiben, ist das Einweichen mit wässriger Ammoniaklösung. Bei dieser Vorbehandlung müssen zwar keine hohen Temperaturen erreicht werden, die Behandlungszeit erstreckt sich jedoch über mehrere Tage (Isci et al., 2007) (Kim und Lee, 2005). Bei einer enzymatischen Vorbehandlung von Maisstroh entstehen im Vergleich zu einer Säurevorbehandlung weniger inhibierende Substanzen und zudem gehen auch nur geringe Mengen von Kohlenhydraten samt Hemicellulose in Lösung und bleiben im Stroh erhalten (Wang et al., 2013). Mit der hier vorgestellten Methode zu Delignifizierung von Maisstroh mittels MsP1 könnte die Entstehung der oben genannten Wachstumsinhibitoren umgangen werden.

Ein Laccase-Mediator-System kann auch zur Depolymerisation von Lignin eingesetzt werden (Zhang et al., 2014b). Mit einem kommerziell erhältlichen Laccase-Mediator-System konnte nur in Verbindung mit Ultraschall- und Heißwasserbehandlung eine Steigerung der Glucoseausbeute erreicht werden. Mit dem Laccase-Mediator-System

allein wurde sogar ein minimaler Abfall der Ausbeute beobachtet (Plácido et al., 2013). Die hier erreichte Steigerung der Ausbeute von bis zu 23 % könnte mit längeren Vorbehandlungszeiten, einer kontinuierlichen H_2O_2 -Zugabe im optimalen Bereich (z.B. *in situ*-generiert (Szweda et al., 2013)) und der optimalen Temperatur für MsP1 (Pühse et al., 2009) wahrscheinlich noch deutlich gesteigert werden. Die eingesetzte Cellulase GC220 wurde durch H_2O_2 gehemmt. Aus diesem Grund wurden die Vorbehandlung zur Lignindepolymerisation mit MsP1 und die Hydrolyse der Kohlenhydrate in zwei Schritten durchgeführt. Über eine optimale H_2O_2 -Zugabe in niedrigen Konzentrationen könnte eine gleichzeitige Delignifizierung und Verzuckerung erreicht werden. Für einen gleichzeitigen Einsatz müsste jedoch untersucht werden, ob MsP1 selbst die hydrolytischen Enzyme hemmt. Wang *et al.* zeigten nämlich, dass auch die lignolytischen Enzyme aus den Kulturüberständen von *Phanerochaete chrysosporium* und *Coridus versicolor* Cellulasen inhibieren. Im ersten von zwei getrennten Schritten der Ligninvorbehandlung mit dem peroxidasehaltigen Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium* und einer anschließenden Hydrolyse mit Cellulasen und Xylanasen konnte eine Steigerung der Zuckerausbeute erreicht werden. Die Steigerung belief sich bei 37 °C auf 12 % und bei 45 °C auf 50 %, wobei hier ein Waschschrift zwischen Delignifizierung und Verzuckerung zur Unterbindung der Hemmung der hydrolytischen Enzyme durch die Vorbehandlung durchgeführt wurde (Wang et al., 2013).

Zwei Einsatzgebiete sind für MsP1 aufgezeigt worden. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von MsP1 in der Vorbehandlung von Stroh die Ausbeute der Saccharifikation erhöht. Organosolv Lignin wurde mittels MsP1 weiter depolymerisiert. Dies ermöglicht die Weiterverarbeitung dieses Oligomergemisches, so dass mehr Monomere generiert werden, die als phenolische Grundstoffe in der chemischen Industrie weiterverarbeitet werden können.

4.3 Biochemische Charakterisierung von MsP1

MsP1 soll im industriellen Maßstab sowohl in der Molke- und Milchbleichung als auch zur Depolymerisierung von Lignin eingesetzt werden. Der Aktivitätsverlust im Einsatzzeitraum und bei den unterschiedlichen Einsatzbedingungen sowie Möglichkeiten zu Aktivitätssteigerungen müssen bekannt sein. Aus diesem Grund wurden wichtige biochemische Charakteristika bestimmt.

Temperatur- und Druckoptimum

MsP1 zeigte eine sehr hohe Temperaturstabilität, eine Aggregation und ein deutlicher Aktivitätsverlust wurden erst bei 70 °C detektiert. Die Aggregation konnte mittels DSC nachgewiesen werden. Tatsächlich ist Proteinaggregation im allgemeinen ein exothermer Prozess (Dzwolak et al., 2003). Die Änderung der Steigung im DSC-Diagramm bei ca. ~68 °C könnte als das Ende der thermisch induzierten Dimerdissoziation erklärt werden. Diese Vermutung wird auch von den Ergebnissen der SAX-Messung unterstützt, bei welchen ebenfalls eine Dimerdissoziation bei dieser Temperatur und eine nachfolgende Proteinentfaltung gemessen wurde (Pühse et al., 2009).

Mittels Fluoreszenzmessungen konnte eine Entfaltung ab 50 °C nachgewiesen werden. Im allgemeinen weist eine Rotverschiebung der Trp-Emission auf eine zunehmend polare Umgebung der fluoreszierenden Tryptophanreste hin, was meist bei einer Entfaltung und Denaturierung vom Protein geschieht (Silva et al., 1986). Verschiedene Puffer wurden je nach ihrer Temperatur und Druckempfindlichkeit für die Messungen der Temperatur und Druckoptima benutzt (Neuman et al., 1973).

Bei den druckabhängigen Trp-Fluoreszenzmessungen wurde eine Diskontinuität mit einer resultierenden Änderung der Steigung zwischen 500 bar und 600 bar beobachtet. Dieses kann mit den kleinen Strukturänderungen, die mittels SAXS (Pühse et al., 2009) gemessen wurden, erklärt werden. Die zunehmende Rotverschiebung bei Drücken über 700 bar kann mit intrinsischen Druckeinflüssen auf die Trp-Reste beschrieben werden (Louzada et al., 1996). Zusätzlich könnten durch den Druck hervorgerufene Bewegungen innerhalb der Proteinstruktur für die zunehmende Rotverschiebung verantwortlich sein. Die Bewegungen innerhalb der Proteinstruktur nehmen im Allgemeinen mit dem Druckaufbau zu, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen geschwächt werden (Meersman et al., 2006) (Daniel et al., 2006) (Silva et al., 2001) (Winter, 2003). Die FT-IR-Messungen gaben eine unveränderte Sekundärstruktur bis 8000 bar an. Der relative Flächeninhalt jeder Unterbande ist eine gute Annäherung an den tatsächlichen Anteil der jeweiligen Sekundärstruktur (Byler und Susi, 1986) (Panick et al., 1998) (Herberhold et al., 2004) (Herberhold et al., 2003).

Im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der DyP-Typ Enzymfamilie besitzt MsP1 ein außergewöhnlich hohes Temperaturoptimum. Für die Peroxidase DyP Dec1 aus *Bjerkandera adusta*, welche in der Lage ist, verschiedene synthetische Farbstoffe zu bleichen, wurde ein Temperaturoptimum von 30 °C ermittelt (Kim und Shoda, 1999). Lignolytische Enzyme wie Manganperoxidasen, Laccasen und die Mitglieder der DyP-Familie repräsentieren interessante Werkzeuge für niedrigenergetische und kostengünstige industrielle Anwendungen, in denen Lignin verarbeitet wird, wie in der Papier- und

Zellstoffindustrie sowie in der Aufbereitung von landwirtschaftlichen Reststoffen. Cellulose und Hemicellulose aus landwirtschaftlichen Reststoffen werden typischerweise bei Temperaturen von 50 °C mit Hilfe von Carbohydrolasen hydrolysiert. Reaktionen bei höheren Temperaturen verlaufen energetisch günstiger und es gibt zusätzliche Vorteile in der Prozessführung, z.B. durch geringere Viskosität (Viikari et al., 2007) (Kumar et al., 2008). Eine gleichzeitige Delignifizierung und Saccharifikation bei höheren Temperaturen benötigt auch thermostabile Enzyme. MsP1 zeigte ein Temperaturoptimum bei 50 °C und bei 70 °C noch eine Aktivität von ca. 5 %.

Auch bei der Druckstabilität zeigte MsP1 außergewöhnliche Eigenschaften. Die Aktivität von MsP1 nahm bis 500 bar stetig zu, um dann wieder leicht bis zum Erreichen der Ausgangsaktivität bei Normaldruck zu sinken. Verschiedene andere Enzyme werden im Gegensatz hierzu bei höheren Drücken im Bereich von 2 kbar denaturiert. Ein Verlust an Aktivität von 20 bzw. 50 % wurde für eine Lipoxygenase aus Soja und eine Meerretichperoxidase nach 15 min Inkubation bei 2 kbar und 55 °C beschrieben (Tedjo et al., 2000). Auf der anderen Seite werden manche Enzyme durch höhere Drücke stabilisiert. Bis zu 4 kbar wurden benötigt, um eine Carboxypeptidase aus dem Archaeobakterium *Sulfolobus solfataricus* bei höheren Temperaturen im aktiven Zustand zu halten (Bec et al., 1996). L-Galactosidasen aus *Escherichia coli* und *Aspergillus oryzae* wurden bei Drücken von 2 bar bis 3 bar bei Temperaturen von 50 °C bzw. 65 °C stabilisiert (Boonyaratanakornkit et al., 2002).

Der benötigte Druck für eine vollständige Dimerdissoziation von MsP1 konnte in diesen Versuchen nicht aufgebaut und gefunden werden. Andere oligomere Enzyme, wie die Glyceraldehyde-3-Phosphatdehydrogenase, Lactatdehydrogenase und Malatdehydrogenase dissoziierten unter Druck reversibel (Boonyaratanakornkit et al., 2002).

Die zunehmende Aktivität von MsP1 bei einem Druck von 500 bar könnte ein Ergebnis der kleinen Strukturänderungen sein, die möglicherweise den Übergangszustand der enzymatischen Reaktion stabilisieren. Allgemein könnte höherer Druck die enzymkatalysierte Reaktion entweder über die Konformationsänderung des Enzyms oder über die Veränderung des Reaktionsmechanismus verändern (Northrop, 2002). Tatsächlich wurde Hochdruck für die Beschleunigung einer enzymatischen Reaktion und deren Selektivität bei einer Anzahl von Enzymen eingesetzt, um neue Anwendungen zu ermöglichen. Die meisten Anwendungen finden sich in der Nahrungsmittelindustrie, hier vornehmlich bei der Milch- und Saftproduktion (Kouassi et al., 2007). Beispielsweise korreliert ein bitteres Aroma in Zitrus Säften direkt mit der Konzentration an Naringin. Das Enzym Naringinase hydrolysiert das bittere Naringin zu dem geschmacksneutralen Naringenin. Die Aktivität dieses Enzyms konnte bei 1,6 kbar auf das Dreifache der Aktivität bei Normaldruck erhöht werden (Ferreira et al., 2008). Ein anderes Beispiel ist die mikrobielle Transglutaminase (MTG), welche unter hydrostatischem Druck von 6 kbar die Vernetzung von Proteinen katalysierte. Diese Reaktion konnte nicht unter Normaldruck katalysiert werden (Lauber et al., 2003), jedoch wurden die alpha-helikalen Strukturen dieses Proteins bei den hohen Drücken entfaltet (Menendez et al., 2006).

Bei MsP1 wurden keine signifikanten Änderungen in der Sekundärstruktur bis zu einem Druck von 10 kbar gemessen (Abb. 3.41). Geringe Änderungen, welche den Anfang

einer Entfaltungsreaktion vermuten lassen, waren zwischen 8 kbar bis 10 kbar zu sehen. Die hohen Optima bezüglich Temperatur und Druck machen MsP1 zu einem Enzym, welches für industrielle Zwecke eine hohe Stabilität aufweist.

Kinetische Eigenschaften von MsP1

Bei der rekombinanten Produktion wird MsP1 als ein Fusionsprotein in *Aspergillus niger* exprimiert, um den Transport aus der Zelle zu gewährleisten. Um die beiden Proteine des geschnittenen Fusionsproteins voneinander zu trennen, wurden eine Ammoniumsulfat-Fällung und eine SEC durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Dabei wird üblicherweise Rinderse- rumalbumin (BSA) als Kalibrierprotein eingesetzt. Hier wurde die Kalibration, um einen methodischen Fehler zu umgehen, direkt mit der MsP1-Probe (Kapitel 2.8.9) durchgeführt (Gl. 3.1). Zwei Proben wurden abgewogen, um ebenfalls Wiegefehler zu berücksichtigen. Häm-Peroxidasen wie Chloroperoxidasen (*Caldariomyces fumago*), LiPs (*Phanerochaete chrysosporium*), MnPs (*Corioloopsis gallica*) (Valderrama et al., 2002) und HRPs nutzen Wasserstoffperoxid oder auch organische Peroxide als Elektronen- akzeptoren, um eine große Bandbreite an Substraten zu oxidieren (An et al., 2010) (Bagirova und Shekhovtsova, 1999) (Kang et al., 1993). Ein Ping-Pong-Mechanismus wird in der Reaktion von HRP mit Phenolen und aromatischen Aminen (Vasudevan und Li, 1996) sowie von LiPs mit Veratrylalkohol (Hu et al., 1993) angenommen.

Die Bindungsgleichung für einen Zweisubstrat Ping-Pong-Mechanismus lautet für den Anfang der Reaktion bei Abwesenheit der Produkte und bei nicht-inhibierender Substratkonzentration (Bisswanger, 1994, S. 140):

$$\nu_o = \frac{\nu_{\max}[\text{H}_2\text{O}_2][\text{AH}]}{K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}[\text{AH}] + K_m^{\text{AH}}[\text{H}_2\text{O}_2] + [\text{H}_2\text{O}_2][\text{AH}]} \quad (4.1)$$

Für die Messung der kinetischen Konstanten wurde die Konzentration an H_2O_2 konstant gehalten und somit ergab sich für das zweite Substrat ($\text{AH} = \text{ABTS}$ bzw. β - β -Carotin) folgende Bindungsgleichung:

$$\nu_o = \frac{V_{\max}^{\text{appAH}}[\text{AH}]}{K_m^{\text{appAH}} + [\text{AH}]} \quad (4.2)$$

Die nichtlineare Kurvenanpassung nach Marquardt-Levenberg wurde genutzt, um die Werte nach Michaelis und Menten (Michaelis und Menten, 1913) an die hyperbolische Geschwindigkeitsgleichung (4.2) anzupassen.

Der erste Schritt des Reaktionsmechanismus von Peroxidasen beinhaltet die Reaktion von H_2O_2 mit dem Fe^{3+} -Ion zur Generierung von *Compound I*, welches das 2fach oxidierte Äquivalent gegenüber dem Enzymgrundzustand ist. Sowohl das Eisen als auch der Porphyrinring sind jeweils einmal oxidiert. *Compound I* wird dann in zwei Schritten zu Fe^{3+} reduziert (Dolphin, 1979, S. 316-319). Im allgemeinen, wenn keine weiteren Zwischenschritte einbezogen werden, sieht die Reaktionsgleichung nach Chance *et al.* wie folgt aus:



Die Bindung von H_2O_2 an das Enzym geschieht sehr schnell, dafür ist der Zerfall des Zwischenprodukts in Abwesenheit eines Sauerstoffakzeptors sehr langsam, was auf einen sehr stabilen Komplex hindeutet. Die Messung von k_3 , dem katalytischen Zerfall von am Enzym gebundenem Sauerstoffakzeptor in die Bestandteile Endprodukt und Enzym, bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und kann über das Michaelis-Menten-Modell (Gl. 4.2) als Reaktion pseudo-erster Ordnung gemessen werden (Chance, 1999).

Bei Messungen der Kinetiken der Bindung von H_2O_2 an *Compound 0* (Grundzustand des Enzyms) zur Bildung von *Compound I* bei der Cytochrom c Microperoxidase-8 (MP-S) postulierten Baldwin *et. al.*, dass nicht direkt H_2O_2 sondern HO^{2-} der Reaktionspartner des Enzyms im ersten Schritt ist. Auch wenn die Umsatzrate des ersten Schrittes pH unabhängig ist, vermuteten sie, dass diese eine Ionisierung von H_2O_2 beinhaltet, um HO^{2-} zu liefern, was einen zusätzlichen Schritt im Reaktionsmechanismus beinhaltet würde (Baldwin *et al.*, 1987).

Die Kinetiken von MsP1 wurden bei einer H_2O_2 -Konzentration von $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ gemessen. Dies ist die Arbeitskonzentration, die bei der Bleichung von Milchprodukten mit MsP1 (Kapitel 3.6) eingesetzt wurde. Obwohl dies nicht die optimale Konzentration für MsP1 ist und bereits im hemmenden Bereich von H_2O_2 liegt, sollte gewährleistet werden, dass die Messung der Kinetik nur von der β, β -Carotin- bzw. der ABTS-Konzentration abhängt. Um der Gleichung (4.2) gerecht zu werden, muss das zweite Substrat, also H_2O_2 , bei der Messung der Kinetiken für das erste Substrat im Überschuss vorliegen. Da beim β, β -Carotin-Assay mit einer höchsten Konzentration von $25 \mu\text{g L}^{-1}$ gearbeitet wurde, hätte auch eine geringere H_2O_2 -Konzentration gewählt werden können. Um aber die Konstanten der Kinetiken der beiden Substrate vergleichen zu können, wurde auch hier mit einer H_2O_2 -Konzentration von $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ gearbeitet.

Die erhaltenen apparenten Werte für K_m betragen für β, β -Carotin $\sim 11 \mu\text{mol L}^{-1}$ und für ABTS $\sim 85 \mu\text{mol L}^{-1}$. Die apparente Geschwindigkeitskonstante k_{cat} betrug für β, β -Carotin $\sim 0,38 \text{ s}^{-1}$ und für ABTS $\sim 176 \text{ s}^{-1}$. Somit ergab sich eine Effizienz für β, β -Carotin von $\sim 3,4 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ und für ABTS von $\sim 3,3 \cdot 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$. Bei dieser H_2O_2 -Konzentration hat die Substrathemmung von H_2O_2 einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Bei einer Messung von K_m und k_{cat} bei einer H_2O_2 -Konzentration von $0,125 \text{ mmol L}^{-1}$ und einem durch einen zusätzlichen Schritt gereinigten Enzym wurden Werte für ABTS als Substrat von $\sim 16 \mu\text{mol L}^{-1}$ bzw. 1.000 s^{-1} gefunden (Szwe-da *et al.*, 2013). Der Unterschied bei k_{cat} lässt sich durch die höhere Reinheit des

Enzyms und somit eine andere Annahme der Enzymkonzentration für die Berechnung erklären. Der K_m -Wert variiert durch die unterschiedliche H_2O_2 -Konzentration, welche in der Veröffentlichung nicht im hemmenden aber auch im nicht-sättigenden Bereich gewählt wurde. Für das Substrat H_2O_2 wurden, zusammen mit ABTS, von Liers *et al.* bei pH 4,5 ein K_m von $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ und ein k_{cat} von 55 s^{-1} sowie eine Effizienz von $1,1 \cdot 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ L s}^{-1}$ für MsP1 gefunden (Liers *et al.*, 2013).

Ähnliche Ergebnisse wurden für die DyP-Typ-Peroxidase aus dem Basidiomyceten *Auricularia auricula-judae* gefunden (Liers *et al.*, 2010). DyP-Typ Peroxidasen haben als einzige Peroxidase-Familie die Fähigkeit, Anthrachinon abzubauen (Sugano, 2009). Kinetische Parameter wurden für mehrere DyP-Typ-Peroxidasen mit dem Farbstoff *Reactive Blue 5* als Substrat bestimmt. Für Dec1 aus *Bjerkandera adusta* wurde ein k_{cat} von 260 s^{-1} bestimmt (Kim und Shoda, 1999), während TyrA aus *Shewanella oneidensis* ein k_{cat} von $5,9 \text{ s}^{-1}$ zeigte (Zubieta *et al.*, 2007). Wie bei der Reaktion von MsP1 mit ABTS, einem Modellssubstrat für Peroxidasen (Childs und Bardsley, 1975), liegt das k_{cat} für dieses untypische Substrat relativ hoch. Eine Peroxidase aus Linsen (*Lens culinaris* L.) zeigte mit Guajacol, einem anderen Modellssubstrat für Peroxidasen, wesentlich höhere K_m -Werte. Das weist darauf hin, dass die Peroxidase nicht spezifisch für das Substrat ist. Diese Peroxidase war in der Lage, Textilfärbemittel (*Green Domalan BL*) abzubauen, wobei für alle Substrate ein Bi-Substrat Ping-Pong Mechanismus vermutet wurde (Hidalgo-Cuadrado *et al.*, 2012).

Der Reaktionsmechanismus der einzelnen Peroxidasen hängt vom Substrat ab. Der gängigste Mechanismus, der bei vielen Peroxidasen angenommen wird, ist der Ping-Pong Mechanismus, was z.B. bei der Oxidation mit Veratrylalkohol mit LiP (Tien *et al.*, 1986) und Mn-Peroxidase (Glenn und Gold, 1985) gezeigt wurde. Die Ergebnisse in dieser Arbeit lassen die Vermutung zu, dass die Reaktion von MsP1 und ABTS mit H_2O_2 nicht diesem Reaktionsmechanismus gehorcht (Kapitel 3.3.7). Dass die Kinetik der Peroxidasen auch anderen Mechanismen unterliegt, konnte mit ABTS und HRP gezeigt werden, bei welcher ein ungeordneter Mechanismus beobachtet wurde (Childs und Bardsley, 1975) (Shindler *et al.*, 1976). Bei der Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration in der Reaktion mit MsP1/ABTS konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht weiter erhöht wurde, wenn H_2O_2 äquimolar zum ABTS vorhanden war, was einen ungeordneten Mechanismus unterstreichen würde. Die Geschwindigkeit der Reaktion von HRP mit Phenol/ H_2O_2 konnte mit Erhöhung der Phenolkonzentration bis zu einem 40-fachen Überschuss an Phenol gegenüber H_2O_2 gesteigert werden. Die Autoren vermuteten hier einen Ping-Pong Mechanismus (Vasudevan und Li, 1996).

Im einfachsten Fall, dem ungeordneten Mechanismus, binden die Substrate und Produkte völlig unabhängig voneinander. Wenn ein *Rapid-Equilibrium*-Mechanismus angenommen wird und die Konzentration eines der Substrate konstant gehalten wird, dann ergibt sich die ursprüngliche Form der Michaelis-Menten-Gleichung (Gl. 4.2), welche dann per Linearisierung nach Lineweaver-Burk eine Kurvenschar für die verschiedenen Konzentrationen des zweiten Substrates in Form einer kompetitiven Hemmung ergibt. Bogolitsyn *et al.* haben über eine Modellierung der experimentell erhaltenen kinetischen Daten der HRP die Mechanismen für mehrere Substrate der Peroxidase untersucht. Für viele Ligninmodellsubstrate wie Guajacol, Ferulasäure, Vanillylalkohol und Acetovanillon

ist der Reaktionsmechanismus über einen weiten Konzentrationsbereich ein *disordered Random Bi Uni* Mechanismus nach folgendem Schema (Bogolitsyn et al., 2010):



Dies bedeutet, dass für jedes Substrat und für jede Peroxidase die jeweiligen Mechanismen bestimmt werden müssen.

Die Inhibierung von Peroxidasen bei einem Überschuss von H_2O_2 ist gut untersucht. Arnao *et al.* analysierten die Kinetik der Selbstmordhemmung in Konkurrenz zur katalytischen Umsetzung von ABTS. In Abwesenheit des reduzierenden Substrates und mit Überschuss an H_2O_2 wurde HRP von H_2O_2 (Selbstmordsubstrat) inaktiviert. Die Anwesenheit von Sauerstoffakzeptoren schützt die Peroxidase im gewissen Rahmen vor Hemmung (Arnao et al., 1990). Bei den Untersuchungen der Kinetiken von MsP1 in Abhängigkeit des Verhältnisses von H_2O_2 zu ABTS hat sich gezeigt, dass ab einem zweifachen Überschuss an H_2O_2 die Maximalgeschwindigkeit gesenkt wurde.

Die Art der Inhibierung hängt von der Konzentration an H_2O_2 ab. Bei HRP war die auftretende Hemmung bei Konzentrationen von H_2O_2 unter 1 mmol L^{-1} überwiegend reversibel. Stieg die H_2O_2 -Konzentration, nahm auch die irreversible Hemmung zu (Baynton et al., 1994). *Compound III* ist ein Enzymderivat, welches bei einem Überschuss an H_2O_2 (Keilin und Hartree, 1951) über die Reaktion von H_2O_2 mit *Compound II* (Gl. 4.4) gebildet wird (George, 1953) (Chance, 1952) (Nakajima und Yamazaki, 1987). *Compound III* nimmt nicht am normalen katalytischen Zyklus der Peroxidase teil. Für HRP konnte gezeigt werden, dass inaktives *Compound III* nicht gebildet wird, wenn andere Oxidationsmittel genutzt wurden (George, 1953). Es kann als ein Analogon zu Oxyhämoglobin und Oxyhämoglobin angesehen werden (Dunford und Stillman, 1976) (Castro et al., 1978).

Die Reaktion von H_2O_2 mit *Compound II* beinhaltet im ersten Schritt die Bildung von Übergangszuständen der Eisen(III)-Peroxidase mit einem Hyperoxidion. Im zweiten Schritt reagiert das Enzymintermediat mit H_2O_2 zu *Compound III*. Die Geschwindigkeit der ersten Reaktion steigt mit steigendem pH, während die der zweiten Reaktion mit steigendem pH abnimmt. Sowohl Reaktionen mit den aromatischen Aminosäuren des

Enzyms als auch Veränderungen der Hämgruppe sind bei der Bildung von *Compound III* bei hohen Überschüssen an H_2O_2 zu beobachten, was einer Selbstmordhemmung gleich kommt. *Compound III* kann sehr langsam wieder zurück in das native Enzym reagieren, was einer reversiblen Hemmung gleichkommt (Adediran und Lambeir, 1989). Bei hohen Konzentrationen an H_2O_2 wird *Compound III* in p-670 (*Compound IV* (Chance, 1949)) umgewandelt (Bagger und Williams, 1971). Adediran zeigte mit einer Inkubation von *Compound III* für 60 min, dass die Ausbeute an p-670 sowie der Abbau von *Compound III* mit steigendem pH abnimmt, somit ist p-670 das Abbauprodukt von *Compound III* (Adediran, 1984). Wenn H_2O_2 verbraucht ist, bleibt die Menge an p-670 konstant und *Compound III* reagiert zurück zu Ferri-Peroxidase (Bagger und Williams, 1971). So kann die irreversible Hemmung mit dem Endprodukt p-670 und die reversible Hemmung von Peroxidasen nach folgendem Schema Abb. 4.5 erfasst werden (Adediran, 1996):

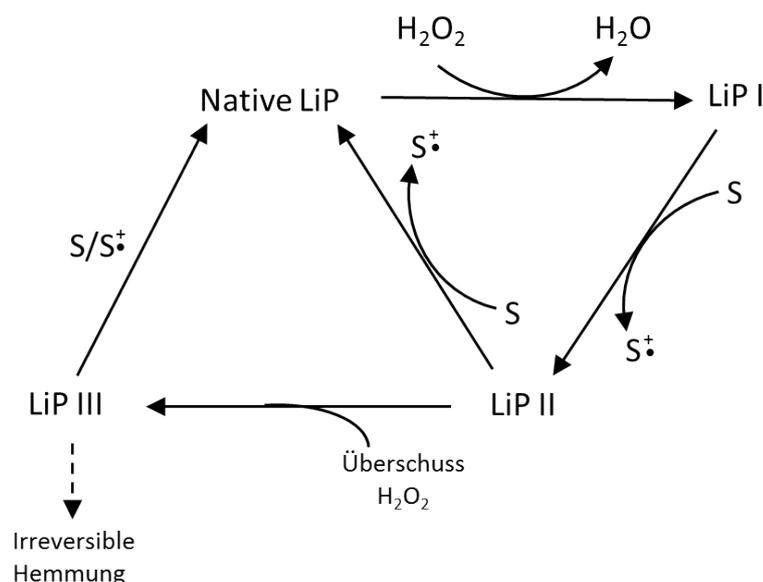


Abbildung 4.5: Schematische Darstellung der vier Oxidationszustände der LiP und deren Zusammenhänge, wobei (S) das Substrat und (S^\bullet) das Substratradikal ist. Modifiziert nach (Adediran, 1996)

Die hier untersuchten Reaktionen von MsP1 wurden bei pH 3,5 in der Nähe des Optimums (pH 2,6) durchgeführt. MsP1 unterliegt schon bei sehr niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen (Kapitel 3.3.6) einer Hemmung. Wenn die Weiterreaktion von *Compound III* zu p-670 (Adediran, 1984) oder dessen Äquivalent bei MsP1 ebenfalls bei niedrigen pH-Werten favorisiert ist, könnte eine irreversible Hemmung durch Erhöhung des pH-Wertes verringert werden. Das pH-Optimum in dieser Arbeit wurde mit ABTS bestimmt. Zu untersuchen wäre, ob auch bei Reaktionen mit Ligninmodellsubstraten bei diesem pH ein Optimum ist und ob eine Hemmung durch H_2O_2 über die Veränderung des pH-Wertes verringert werden kann. MsP1 weist bei verschiedenen Substraten verschiedene pH-Optima auf. Für β,β -Carotin wurde hier ein Optimum bei pH 2,6, für 2,6-Dimethoxyphenol und Veratrylalkohol bei pH 3,0 bzw. pH 2,0 (Liers et al., 2013) gefunden.

Andere Peroxidasen zeigen ebenfalls eine sehr niedrige Peroxidtoleranz, wie z.B. die Microperoxidase. Für dieses Enzym wurde eine Inaktivierung schon bei $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ H_2O_2 gemessen (Khosraneh et al., 2007). Nicell *et al.* untersuchten die H_2O_2 -Toleranzen von HRP und Sojabohnenperoxidase (SBP) bei verschiedenen Enzymkonzentrationen. Die höchsten Aktivitäten wurden für HRP in einem Bereich von $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ bis $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ und für SBP von $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ bis 1 mmol L^{-1} H_2O_2 gemessen. Im Vergleich zu HRP nahm die Aktivität der SBP mit steigender H_2O_2 -Konzentration langsamer ab. Die Abnahme der Aktivität mit steigender H_2O_2 -Konzentration ist auf die Bildung des langsam reagierenden *Compound III* zurückzuführen (Nicell und Wright, 1997). Bei der Messung der Kinetik des Umsatzes von Veratrylalkohol mit LiP aus *Phanerochaete chrysosporium* bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen zeigte sich, passend zum Ping-Pong Bi Bi Mechanismus, eine kompetitive Hemmung (Hu et al., 1993). Andererseits gibt es Peroxidasen, die eine H_2O_2 -Resistenz zeigen, wie die Zo-Peroxidase (ZoPrx) aus Daikon (*Raphanus sativus L. cv. daikon*) (Gil-Rodriguez et al., 2008). Ogola *et al.* ersetzten mittels ortsspezifischer Mutagenese fünf Methioninreste in einer Peroxidase aus *Anabaena sp.* (AnaPX). Einige der Mutanten zeigten eine wesentlich höhere H_2O_2 -Stabilität bis zu einer H_2O_2 -Konzentration von 100 mmol L^{-1} (Ogola et al., 2010). Die Peroxidase AnaPX gehört wie MsP1 zu der DyP-Typ Peroxidasefamilie (Ogola et al., 2009) (Scheibner et al., 2008), so dass gentechnische Veränderungen in Analogie zu AnaPX denkbar sind, um die H_2O_2 -Stabilität von MsP1 zu erhöhen.

Einfluss von Mediatoren auf die Aktivität von MsP1

Mediatoren können Reaktionen von Laccasen und Peroxidasen mit Substraten, die ein sehr hohes Redoxpotential aufweisen, beschleunigen oder sogar überhaupt erst möglich machen. Mit ABTS (Bourbonnais und Paice, 1990) und 1-Hydroxybenzotriazol und dessen Derivaten (D'Alfonso et al., 2014) als Mediatoren war es möglich, phenolische und nicht-phenolische Ligninmodelle mit Laccase abzubauen. Die Ligninmonomere Ferulasäure (FA), *p*-Coumarsäure und Sinapinsäure wurden ebenfalls als Laccasemediatoren untersucht. Alle drei stellen auch Substrate für Laccase dar, wobei k_{cat} für *p*-Coumarsäure am kleinsten und K_m am größten ist. Die höchsten Umsatzraten wurden bei der Oxidation von Benzo[a]pyren durch Laccase mit *p*-Coumarsäure als Mediator gefunden (Camarero et al., 2008) (Canas et al., 2007). Dieser Mediator konnte aber die Delignifizierung von Papierfasern nicht erhöhen (Camarero et al., 2007). Bei der Bleichung von Farbstoffen wie *Acid Blue 74* und *Reactive Black 5* fungierte Sinapinsäure als bester Mediator. Alle drei Ligninmonomere konnten als Antioxidantien in der Reaktion von Laccase mit ABTS eingesetzt werden, was in einer Abnahme der Konzentration des ABTS-Radikalkations zu sehen war (Camarero et al., 2008). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Abbau von β,β -Carotin durch die Zugabe von Coniferylalkohol, Ferulasäureethylester, *p*-Coumarsäure und 4-Ethylphenol (Abb. 4.6), beschleunigt werden konnte. Nicell *et al.* postulierten folgendes Schema für die Reaktion einer Peroxidase mit Phenolen (PhOH) und 4-Aminoantipyrin (AmNH₂) (Nicell und Wright, 1997):



4-Aminoantipyrin kann auch direkt mit Enzym/H₂O₂ reagieren.



Bei der Reaktion von MsP1/H₂O₂ mit ABTS wurde eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit gemessen, wenn Mediatoren zugegeben wurden. Nach einiger Zeit ging die Extinktion bei 420 nm zurück. Bei dieser Wellenlänge wurde das stabile Produkt, ein ABTS-Radikalkation über dessen Extinktion gemessen. Durch die Zugabe von Phenolen ist es wahrscheinlich, dass Phenolradikale (Gl. 4.13) mit ABTS-Radikalkationen wieder zurück reagieren, also als Antioxidantien wie bei der Laccase (Camarero et al., 2008) agieren. Die Abnahme der Extinktion bei der Reaktion mit Coniferylalkohol und ABTS ließe sich durch die Abnahme der Konzentration an ABTS-Radikalkationen erklären. Biskup *et al.* untersuchten verschiedene Phenole auf ihre antioxidativen Fähigkeiten über den Abbau von ABTS-Radikalkationen. Zusätzliche Methylengruppen zwischen

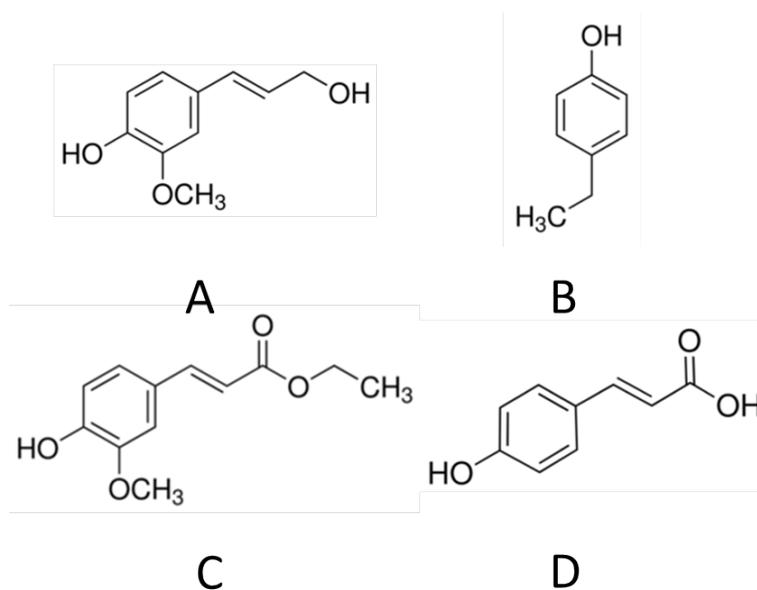


Abbildung 4.6: Für die Erhöhung der Aktivität von MsP1 gegenüber β,β -Carotin eingesetzte Mediatoren: A: Coniferylalkohol; B: 4-Ethylphenol; C: Ferulasäureethylester; D: *p*-Coumarsäure

der Carboxylgruppe und dem Benzolring erhöhen die Aktivität. Zusätzlich beeinflusst die Anzahl und die Stellung der Hydroxylgruppen die Aktivität. Je mehr Hydroxylgruppen am Phenol vorhanden sind, desto höher ist die Aktivität. Phenole mit zwei Hydroxylgruppen in *ortho*-Stellung reagieren schneller mit dem ABTS-Radikalkation als Phenole mit zwei Hydroxylgruppen in *meta*-Stellung (Biskup et al., 2013). Bei einer Reaktion von LiP mit Chlorpromazin (CPZ) und Veratrylalkohol erhöhte die Zugabe von VA die Zunahme des CPZ-Radikalanions, im weiteren Verlauf aber auch die Weiterreaktion zu Chlorpromazinsulfoxid (CPZSO). Vermutet wird in der Arbeit von Goodwin *et al.*, dass VA als Radikalkation mit dem CPZ reagiert und diese Reaktion schneller ist als die Umsetzung von CPZ mit LiP (Goodwin et al., 1995).

Die Aktivität von MsP1 gegenüber β,β -Carotin wurde durch Coniferylalkohol, *p*-Coumarsäure, Ferulasäureethylester und 4-Ethylphenol erhöht. Nach Gl. 4.16 wird katalytisch inaktives *Compound III* vom Phenol in *Compound I* überführt. Diese reaktive Spezies kann dann wieder am katalytischen Zyklus teilnehmen, was die Maximalgeschwindigkeit erhöht und eine Hemmung durch H₂O₂ abschwächt. Bei Untersuchungen von HPR konnte eine irreversible Hemmung (P-670) in Anwesenheit von Phenolen ausgeschlossen werden. Die dominierende Spezies in diesen Ansätzen waren Phenylradikale, die bevorzugter mit dem Substrat (4-Aminoantipyrin) reagierten als zu polymerisieren (Nicell und Wright, 1997). Auf diese Arbeit bezogen wäre β,β -Carotin durch Phenylradikale gespalten worden. Die Reaktion von β,β -Carotin wäre dann keine enzymatisch katalysierte mehr. Eine Untersuchung der entstandenen Produkte im Vergleich zu denen bei der rein enzymatischen Umsetzung (Zelena et al., 2009) würde Aufschluss über diesen Reaktionsweg geben. Wurde eine Coniferylalkoholkonzentration über $0,03 \text{ mmol L}^{-1}$ gewählt, sank die Abbaurate von β,β -Carotin unter 100 %, bezogen auf die Aktivität ohne

Mediator. Dies könnte auf eine Hemmung des Enzyms sowie auf eine Polymerisation der Phenolradikale (Fournand et al., 2003) aufgrund ihrer höheren Konzentration zurückzuführen sein. Die Radikale würden dann nicht mehr zur Reaktion mit β,β -Carotin zur Verfügung stehen. Fournand *et al.* zeigten die Mediatorwirkung von Coniferylalkohol bei der Polymerisation von Sinapylalkohol mit HRP. Die Reaktion von Sinapylalkohol mit HRP ist bei niedrigen pH-Werten sehr langsam. Durch die Zugabe von Coniferylalkohol wurde die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Gleichzeitig aber polymerisierte Coniferylalkohol (Fournand et al., 2003).

Wenn der Mediator an einen ES-Komplex bindet, wird K_m kleiner (Bisswanger, 1994, S. 98). Die Reaktion wird aber beschleunigt, so dass die Maximalgeschwindigkeit größer wird. Bindet der Mediator an reinem Enzym wird K_m wie bei der kompetitiven Hemmung größer (Bisswanger, 1994, S. 98) und die Maximalgeschwindigkeit nimmt zu. Bindet der Mediator an beide ES und E mit gleicher Affinität, wie bei der nicht-kompetitiven Hemmung, bleibt K_m gleich. Wird als Bindungspartner E bevorzugt, dann wird K_m größer. Wird dagegen ES als Bindungspartner bevorzugt, wird K_m kleiner. Bei dem Mediator Coniferylalkohol wird K_m kleiner, dies könnte dann bedeuten, dass dieser Mediator bevorzugt an den ES-Komplex bindet.

Beim Reaktionsverlauf des Abbaus von β,β -Carotin bei verschiedenen Coniferylalkoholkonzentrationen wurde eine Lag-Phase beobachtet, wobei deren Dauer von der Coniferylalkoholkonzentration abhing. Das lässt vermuten, dass zuerst Coniferylalkohol an MsP1 bindet und reagiert. Möglich wäre somit auch, dass Coniferylalkohol nicht an einen MsP1- β,β -Carotin-Komplex (ES), sondern dass β,β -Carotin an den noch nicht zerfallenen MsP1-Coniferylalkoholradikal-Komplex (EP) bindet, womit auch die unterschiedliche Bindungsaffinität an jeweils E oder ES zu erklären wäre. Dann würde jedoch keine Polymerisation stattfinden, da keine freien Radikale zur Polymerisation vorliegen würden. Die Messung der Radikalkonzentration oder der Polymerisationsprodukte gäbe Aufschluss über den Mechanismus. Wenn freie Radikale der Mediatoren entstehen, könnten diese an den MsP1- β,β -Carotin-Komplex binden. Bei allen hier gemessenen Aktivatoren wird die Maximalgeschwindigkeit der β,β -Carotin-Umsetzung erhöht. Bei Coniferylalkohol wird gleichzeitig K_m gesenkt. Das lässt vermuten, dass es eine Reaktion von β,β -Carotin und Mediator unter Einbeziehung des Enzyms zusätzlich zu einer wahrscheinlichen Reaktion von freien Radikalen mit β,β -Carotin gibt. Eine Lag-Phase wurde auch bei der Umsetzung von Veratrylalkohol mit LiP aus *Trametes versicolor* in Abhängigkeit der Chlorpromazin- (Goodwin et al., 1995) und *Remazol brilliant blue R* (RBBR)-Konzentration gemessen. LiP weist gegenüber RBBR eine höhere Substratspezifität als gegenüber VA auf. RBBR hemmt die VA-Oxidation durch LiP kompetitiv. Die Lag-Phase ist auf den Verbrauch des VA-Radikalkations und Rückreaktion zu VA zurückzuführen, wodurch das Produkt Veratrylaldehyd nicht gebildet werden kann (Christian et al., 2005). Die hier gemessene Lag-Phase beim Abbau von β,β -Carotin bezieht sich auf die komplette Reaktion, da hier das Substrat und nicht das Endprodukt detektiert wurde. Bei der Untersuchung von verschiedenen Mediatoren für die Oxidation von 4-Methoxymandelsäure mit LiP wurde gezeigt, dass die Mediatorfähigkeit von deren Redoxpotential und von der Effektivität, mit der das Enzym den Mediator oxidierte, abhing, nicht jedoch von der Radikalkonzentration, die während der Reaktion herrschte. Dabei muss das Redoxpotential niedrig genug sein, um von der LiP I und LiP II oxidiert

zu werden, aber hoch genug, um das zweite Substrat zu oxidieren. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Redoxmediation tatsächlich in einem Enzymkomplex stattfindet (Baciacchi et al., 2002).

Bei der Umsetzung von β,β -Carotin mit MsP1 wird K_m durch die Zugabe des Mediators Ferulasäureethylester größer. Es konnte in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass MsP1 alle hier benutzten Aktivatoren polymerisiert, somit binden auch alle an das Enzym und es kann von einer nicht-kompetitiven Aktivierung ausgegangen werden. Unabhängig von der Veränderung des K_m ist die optimale Mediatorfähigkeit bei Coniferylalkohol und Ferulasäureethylester auf einen sehr kleinen Konzentrationsbereich des Mediators zwischen $0,003 \text{ mmol L}^{-1}$ und $0,0058 \text{ mmol L}^{-1}$ bzw. $0,0016 \text{ mmol L}^{-1}$ und $0,0058 \text{ mmol L}^{-1}$ bei der gewählten MsP1-Aktivität beschränkt.

K_m FSEE > o. Mediator > Coniferylalkohol

Effizienz Coniferylalkohol > FSEE > o. Mediator

Ward *et al.* untersuchten Mediatoren in der Oxidation von 4-Bromphenol (4-BP) durch LiP. Mit 4-BP allein war die Reaktion sehr langsam mit einem K_m von $600,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Zusätzlich trat eine Produkthemmung durch Bromphenoldimere auf. Diese konnte durch Zugabe von Gelatine verringert werden. Zur Mediation der Oxidation wurden Veratrol (VO) und 3,4-Dimethoxyzimtsäure (DMCA) sowie Ferulasäure, die auch ein Substrat darstellt, verwendet. Ferulasäure wurde vor Bromphenol oxidiert, so dass keine Oxidation von 4-BP wegen der kompetitiven Hemmung auftrat. Im Gegensatz dazu wurde bei der HRP die Oxidation von 4-BP beschleunigt, obwohl auch hier die Reaktion mit FA bevorzugt war. Im Vergleich zu HRP hat LiP ein höheres Redoxpotential. Bei beiden Enzymen wurde die Oxidation von 4-BP durch die Zugabe von Kaffeesäure und Catechol verlangsamt. Durch die Zugabe von Syringaldehyd wurde die Oxidation von 4-BP für beide Enzyme –bei LiP geringer als bei HRP– beschleunigt. Syringaldehyd wurde gleichzeitig oxidiert. Für Syringaldehyd wurde in einem Konzentrationsbereich von $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ bis $1250 \mu\text{mol L}^{-1}$ eine Beschleunigung der Oxidation von 4-BP gemessen. Danach sank die Rate wieder auf den Referenzwert ohne Mediator (Ward et al., 2002), wie es auch in dieser Arbeit mit den Mediatoren Coniferylalkohol und FSEE mit MsP1 zu beobachten war. Die verschiedenen Peroxidasen haben jeweils eine Spezifität bei der Polymerisation von Ligninmonomeren, wie z.B. gezeigt für HRP mit Coniferylalkohol und CWPO-C aus der Pappel (*Populus alba* L.) mit Sinapylalkohol (Aoyama et al., 2002). Im Ligninaufbau von Mais wurde nachgewiesen, dass als Mediator Ethylferulat, Methyl-*p*-Coumarat und Sinapyl-*p*-Coumarat-Konjugate in der Sinapyl-Polymerisation mit der Maisperoxidase T8D1 agieren, da keine Peroxidase speziell für die Polymerisation von Sinapylalkohol gefunden wurde, jedoch eine für *p*-Coumarsäure. Die über die Mediation entstandenen Sinapylradikale reagieren nicht mit *p*-CA, sondern polymerisieren (Hatfield et al., 2008).

Die Nutzung von Mediatoren ermöglicht einen effizienteren Einsatz von Enzymen in industriellen Anwendungen. Da jedoch die Reaktion von Mediatoren nicht so spezifisch ist wie die von Enzymen, muss in jedem System überprüft werden, ob andere als die gewünschten Substrate oxidiert werden. Es könnten Systeme mit gleichzeitiger

Saccharifikation von Lignocellulosen und Hemicellulosen eingesetzt werden, wie auch in dieser Arbeit (Kapitel 3.2) beschrieben. Dabei müsste aber eine unerwünschte Interaktion der Mediatoren mit anderen eingesetzten Enzymen ausgeschlossen werden. Eine solche zeigte sich z.B. in dem Verlust an Xylanaseaktivität bei einer simultanen Anwendung des Laccase/Mediatorsystems mit Xylanase. Der Verlust der Xylanaseaktivität beruhte auf einer Oxidation von Trp 17 und Trp 18 mittels Mediator. Trp 18 ist an der Xylan-Bindung beteiligt (Bendl et al., 2008). Zu untersuchen wäre auch, in wie weit die Mediatoren selbst die Regulation des Ligninabbaus übernehmen, indem sie wie bei Coniferylalkohol sowohl eine Reaktion beschleunigen, als auch in höheren Konzentrationen hemmen können.

4.4 Immobilisierung

Ziel einer Immobilisierung ist es, ein Enzym unter Erhaltung der Aktivität auf einem festen Träger zu binden. Zusätzlich wird angestrebt, das Enzym stabiler (Mateo et al., 2007) zu machen. Ein wesentlicher Vorteil von immobilisierten Enzymen ist die Möglichkeit, diese aus dem Reaktionsgemisch wiederzugewinnen. Das Inverkehrbringen, die Verwendung und Kennzeichnung aller Lebensmittelenzyme, auch der als Verarbeitungshilfsstoffe verwendeten Enzyme, ist durch EU-Verordnungen einheitlich geregelt. Die Aufnahme in die Positivliste erfolgt unter anderem unter der Bedingung, dass ihre Verwendung bei der vorgeschlagenen Dosis für den Verbraucher gesundheitlich unbedenklich ist (Council of the European Union, 2009). Die Möglichkeit, ein Enzym nach dem Prozess aus dem Endprodukt entfernen zu können, wirkt sich somit positiv auf die Zulassung aus.

In dieser Arbeit wurde MsP1 immobilisiert, um das Enzym bei einem technischen Einsatz, z.B. zur Molkebleichung (Scheibner et al., 2008) (DSM Food Specialties, 2012), wiedergewinnen zu können.

Oft werden immobilisierte Enzyme in der Analytik als Biosensoren oder in enzymatischen Nachweisverfahren eingesetzt, z.B. zum Nachweis von Schadstoffen in Obst und Gemüse (Ribeiro et al., 2014). Ein Beispiel mit vielfältigen Einsatzgebieten ist die immobilisierte Glucoseoxidase (GOX) zum Glucosenachweis (Gaikwad et al., 2006). Es kann ein bei der Reaktion zu übertragendes Elektron mit Hilfe eines leitenden Trägers und einer Elektrode amperometrisch nachgewiesen werden (Zhao et al., 2013). GOX wird auch *co*-immobilisiert, um andere Substanzen nachweisen zu können, die nicht direkt als Substrat für GOX dienen, wie z.B. in einem Biosensor zum Nachweis von Stärke mit *co*-immobilisierter Glucoamylase (Lang et al., 2014). Bei der Bleichung von Molke mit MsP1 wurde GOX benutzt, um das zweite Substrat H_2O_2 für MsP1 zu liefern (Szweda et al., 2013), weswegen eine *co*-Immobilisierung von GOX und MsP1 erstrebenswert wäre. Bei der Verarbeitung von Molke werden immobilisierte Enzyme eingesetzt (Kosseva et al., 2009). In der Literatur finden sich viele Beispiele für die Immobilisierung von Enzymen, die wie MsP1 aus Basidiomyceten stammen. Da Phenole für Laccasen und Peroxidasen ein Substrat darstellen, wird oft das Ziel verfolgt, die immobilisierten Enzyme in der Wasseraufbereitung einzusetzen. Dort sollen diese dann zum Abbau von Phenolen (mit HRP) (Zhai et al., 2013), organischen Mikroverunreinigungen im Abwasser (mit Laccase) (Nair et al., 2013) und industriell genutzten Farbstoffen (mit Chlorperoxidase) (Guerrero et al., 2013) verwendet werden.

Die Immobilisierung von MsP1 wurde auf Kieselgel, welches mit einem Propylspacer mit endständiger Aminofunktion funktionalisiert wurde, durchgeführt. Die kovalente Kopplung von MsP1 an den Träger wurde mit Glutaraldehyd realisiert. Durch diese Kopplung wurde z.B. eine Peroxidase aus Papaya zum Nachweis von H_2O_2 in Milch erfolgreich eingesetzt (Chen et al., 2012). Bei der Immobilisierung von MsP1 konnte nachgewiesen werden, dass eine Bindung von MsP1 an das nicht funktionalisierte Kieselgel nicht stattfand. Eine Bindung von einem Enzym an Kieselgel entsteht über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Silanolgruppe. Erst wenn eine ausreichende Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen gleichzeitig gebildet wird, wird das Enzym so fest über diese an das Kieselgel gebunden, dass das Enzym nur aufgrund einer Änderung der

Bedingungen (z.B. pH) wieder desorbiert. Die Anzahl der nötigen Wasserstoffbrückenbindungen ist für jedes Enzym anders (Chukhrai et al., 2011) und muss empirisch herausgefunden werden. Nach der Aktivierung des funktionalisierten Kieselgels mit Glutaraldehyd wurde dieses gewaschen. Es sollte kein freies Glutaraldehyd mehr vorhanden sein, um nach Zugabe des Enzyms eine mögliche Quervernetzung zu verhindern. Nach der Kopplung von MsP1 mit dem Kieselgel-Glutaraldehyd wurde zur Reduktion mit NaBH_4 inkubiert, um die Zwischenstufen der Schiff'schen Base zu stabilisieren (Abb 4.7). Für diesen Zweck können verschiedene Reduktionsmittel eingesetzt werden, wie z.B. Natriumcyanoborhydrid (Mullersman und Preston III, James F., 1991), Natriumtriacetoxyborhydrid (Abdel-Magid et al., 1996) oder $\text{Zn}(\text{BH}_4)_2/\text{SiO}_2$ (Ranu et al., 1994). Der Aktivitätsverlust aufgrund der Behandlung mit NaBH_4 betrug bei MsP1 $\sim 64\%$, was im Vergleich zu anderen Enzymen sehr hoch ist (Isgrove et al., 2001). Durch NaBH_4 wurde der pH zu 10,5 verschoben. MsP1 könnte bei diesem pH-Wert zum Teil inaktiviert worden sein. In Probe 5 wurde eine mögliche kovalente Bindung durch die Reduktion des Imins zu einem Amin durch NaBH_4 stabiler. Die Bindung war dann nicht mehr durch Säuren spaltbar. In Probe 3 wurde keine Reduktion durchgeführt. Das Imin, das in wässriger Säure wieder in seine Ausgangssubstanzen zerfällt, bestand weiterhin.

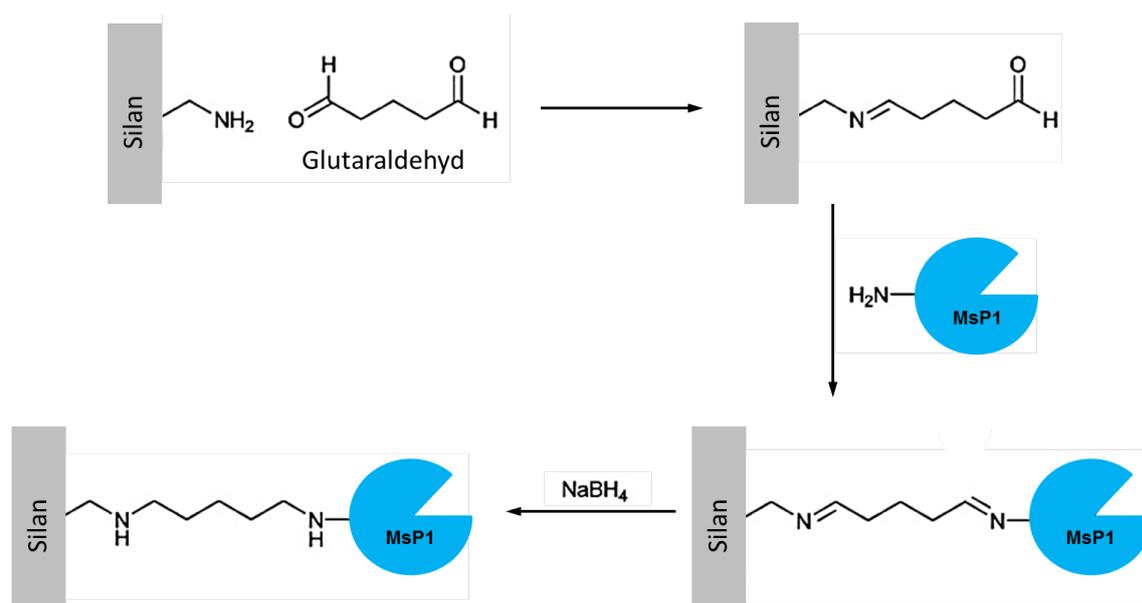


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der Immobilisierung von MsP1 an eine mit Aminofunktion modifizierte Kieselgeloberfläche. Die Kupplung wird über Glutaraldehyd realisiert und über eine Reduktion mit Natriumborhydrid stabilisiert. Modifiziert nach (Hanefeld et al., 2009).

Die höchste Ausbeute an Aktivität wurde bei der nur mit Glutaraldehyd behandelten Probe mit 23,4% erreicht. Der Aktivitätsverlust kann entweder durch die Lagerung entstanden sein, durch die Immobilisierungsagenzien oder durch die Immobilisierung selbst, so dass das immobilisierte MsP1 eine geringere Aktivität aufwies als das freie MsP1. Ein Aktivitätsverlust in gleicher Höhe ist auch bei anderen Enzymen bei einer Immobilisierung mit diesem Kupplungsreagenz aufgetreten. Nach der Immobilisierung

einer Ligninperoxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* mit Glutaraldehyd wurden nur $\sim 15\%$ (Hu et al., 2013), bei einer Peroxidase aus Sojabohnen 35 % der Anfangsaktivität erreicht (Marchis et al., 2012).

Die Ausbeute könnte noch durch ein optimales Verhältnis von MsP1 zu eingesetztem Glutaraldehyd erhöht werden. Bei einer Immobilisierung einer Lipase aus *Candida rugosa* zeigte sich, dass die Bindung der Enzyme an die Oberfläche mit steigender Glutaraldehydkonzentration erhöht wurde. Die Aktivität sank jedoch insbesondere bei sehr hohen Glutaraldehydkonzentration (25 w/w %). Dieser Aktivitätsverlust könnte durch das Entstehen von Mehrfachbindungsstellen zwischen Enzym und Oberfläche und dem damit verbundenen Verlust an Fähigkeit zur für die Katalyse wichtigen Konformationsänderung einhergehen (Zhu und Sun, 2012). Die Immobilisierung von Lipase mit Hilfe von Glutaraldehyd wurde von Barbosa *et al.* unter Zugabe von Salzen und nicht-ionischen Detergenzien durchgeführt, um eine kovalente Bindung gegenüber ionischen oder hydrophoben Wechselwirkungen zu bevorzugen (Barbosa et al., 2012). Inwieweit die Bindung von MsP1 kovalent oder über Wechselwirkungen zustande kam, wurde nicht untersucht. Die Reaktionen wurden bei einem pH-Wert von 7 durchgeführt, was deutlich über dem pI-Wert ($\sim 3,7$) (Scheibner et al., 2008) von MsP1 liegt. Somit lag MsP1 bei der Immobilisationsreaktion als ein negativ geladenes Molekül vor. Bei geringen Ionenstärken, wie hier durchgeführt, bindet das Enzym erst an die Aminogruppe der Oberflächenschicht, bevor es mit dem gebundenen Aldehyd eine kovalente Bindung eingeht (Betancor et al., 2006).

Die wiederholte Nutzung des immobilisierten MsP1 zeigte einen Verlust von 40 % bzw. 60 % im zweiten Zyklus und 60 % bzw. 70 % im dritten Zyklus bezogen auf die Anfangsaktivität, wobei die größeren Verluste bei der reduzierten Probe zu finden waren. Ein Grund dafür wäre, dass bei der Abnahme des Überstandes kleine Kieselgelpartikel mit aufgenommen wurden. Somit wäre der Verlust der Aktivität in der Messmethode zu sehen. Diese Aktivitätsverluste sind relativ hoch im Vergleich z.B. mit einer Ligninperoxidase, bei der nach einer Immobilisierung mit Cyanurchlorid für den wiederholten Einsatz in der Farbstoffbleichung bessere Ergebnisse erzielt wurden. Beim fünften Zyklus konnten noch 71 % der Anfangsaktivität (Zyklus 1) gefunden werden (Hu et al., 2013). Laccase zeigte einen sehr guten Aktivitätserhalt nach Immobilisierung auf Kieselgel mit Glutaraldehyd in mehreren Zyklen. Diese wies noch nach 10 Zyklen eine Restaktivität von über 60 % auf (Tavares et al., 2013). Die immobilisierte Nuclease P1 verlor je nach Immobilisierungsmethode im dritten Zyklus 40 % bis 70 % der Anfangsaktivität. Dieser Verlust blieb jedoch fast konstant bis zum siebten Zyklus (Li et al., 2012a). Das mit MsP1 beladene Kieselgel verfärbte sich im Laufe des ersten Zyklus in der Reaktion mit ABTS dunkelgrün bis schwarz. Diese Verfärbung, welche vom Produkt herrührt, konnte nicht durch Waschen mit Wasser entfernt werden. Dies könnte zu einer Produkthemmung und dem damit verbundenen Aktivitätsverlust geführt haben.

Darüber hinaus gibt es noch andere Möglichkeiten, Enzyme auf Kieselgel zu immobilisieren. Beispielsweise kann ein Polymer auf die Oberfläche des Kieselgels platziert werden. HRP wurde mit einer guten Haftung und geringen Enzymverlusten auf einem mit Polypyrrol überzogenem Kieselgel adsorbiert (Kwon et al., 2012). Eine andere Möglichkeit bietet der Sol-Gel-Prozess, bei dem die Enzyme in eine Kieselgelmatrix

eingeschlossen werden (Li et al., 2011). Hierbei muss jedoch gewährleistet sein, dass sowohl das Substrat als auch das Produkt die Matrix passieren können. Um das Enzym bei der Immobilisierung vor Änderungen der Tertiärstruktur zu schützen, kann BSA als Additiv während des Immobilisierungsprozesses eingesetzt werden (Ni et al., 2013).

Qui *et al.* immobilisierten LiP und GOX gleichzeitig auf nanoporösem Gold zur Generierung von H_2O_2 *in situ*. Es zeigte sich eine bessere Aktivität von LiP mit *in situ* generiertem als mit *batch*-weise zugegebenem H_2O_2 (Qiu et al., 2009). Dies wäre auch eine gute Möglichkeit, beim Einsatz von MsP1 die hohe H_2O_2 -Empfindlichkeit und die damit verbundene Hemmung zu umgehen. So könnte eine permanent niedrige und damit optimale H_2O_2 -Konzentration gehalten werden.

MsP1 bietet viele Möglichkeiten des industriellen Einsatzes, wie z. B. die Bleichung von Milchprodukten oder anderen carotinoidhaltigen Produkten sowie bei der Reaktion mit Phenolen und Ligninen, weswegen eine Immobilisierung mit der Möglichkeit zur Rückgewinnung dieses Enzyms wünschenswert ist.

4.5 Bleichung von Milchprodukten

Die Eigenschaft der Pilzperoxidase MsP1, Carotine und Xanthophylle in einem wässrigen System abzubauen (Zelena et al., 2009), wurde erfolgreich für die Bleichung von gefärbter Molke und gefärbter Milch eingesetzt. Für Molke wurde ein 2-Enzym-System aus GOX und MsP1, für Milch ein 3-Enzym-System mit saurer Lactase, GOX und MsP1 verwendet (Abb. 4.8). Mit b-Werten von < 2 für β,β -Carotin und b-Werten von 4 für Annatto konnte eine fast vollständige Bleichung erreicht werden. Die Fähigkeit, nicht nur β,β -Carotin sondern auch weitere Carotine und Xanthophylle abzubauen (Zelena et al., 2009), erklärt den effizienten Abbau von Annatto, welches abgesehen von (*Z*)- und (*E*)-Bixin und Norbixin auch β,β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Lutein, und Zeaxanthin beinhaltet (Tirimanna, 1981).

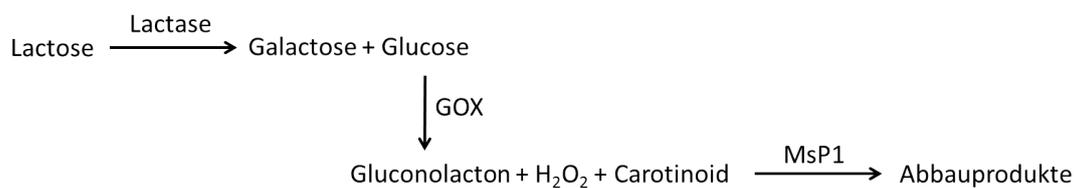


Abbildung 4.8: Reaktionsschema des Drei-Enzym-Systems zur Bleichung von Molke und Milch.

In der Industrie wird Käsemolke zurzeit chemisch gebleicht. Dazu werden entweder Wasserstoffperoxid oder Benzoylperoxid verwendet, wobei letzteres in manchen Ländern außerhalb der EU eingesetzt wird. Überschüssiges Wasserstoffperoxid muss nach der Bleichung mit Hilfe von Catalase entfernt werden. Die Wasserstoffperoxidkonzentration darf einen Wert von 0,05 Gewichtsprozent der Milch nicht überschreiten. Die Konzentration der Catalase sollte 20 ppm bezogen auf die behandelte Milch nicht überschreiten (U.S. Food and Drug Administration, 2014c) (U.S. Food and Drug Administration, 2014b). In den Vereinigten Staaten von Amerika darf Benzoylperoxid nach den gängigen GMP-Richtlinien eingesetzt werden (U.S. Food and Drug Administration, 2014a). Die FAO (*Food and Agriculture Organisation of the United Nations*) gibt an, dass eine maximale Konzentration von 100 mg kg^{-1} Benzoylperoxid keine Sicherheitsbedenken aufwirft (JECFA, 2004). Im Gegensatz dazu werden in asiatischen und europäischen Ländern Sicherheitsbedenken laut, da während der Bleichung Benzoylperoxid zum Teil in Benzoesäure (E 210) umgewandelt wird (Kang et al., 2010). Mit Benzoylperoxid gebleichte Molke weist eine höhere Benzoesäurekonzentration als ungebleichte oder mit Wasserstoffperoxid gebleichte Molke auf (Listiyani et al., 2011).

Campbell *et al.* verglichen die gängige Peroxidbleichung mit H_2O_2 (250 mg kg^{-1}) und zwei enzymatischen Systemen zur Bleichung von Molkeprodukten. Für die Untersuchungen wurden das Lactoperoxidase-System mit Lactoperoxidase und den beiden Substraten Thiocyanat und H_2O_2 , alle von Natur aus in Milch enthalten, sowie das MsP1-System mit dem Enzym und H_2O_2 eingesetzt. Flüssige Cheddarmolke und Molkeretentate (80 % Protein) wurden bei 4°C enzymatisch wesentlich effizienter gebleicht als mit H_2O_2 (250 mg kg^{-1}) allein. Die beste Bleichung wurde für beide enzymatischen Systeme mit

10 mg H₂O₂/kg Molke erreicht, was $\sim 0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ entspricht und mit den hier erzielten Ergebnissen für MsP1 übereinstimmt. Mit MsP1 war eine Bleichung über einen breiteren Konzentrationsbereich an H₂O₂ möglich als mit Lactoperoxidase. Zudem konnten sie mit MsP1 eine Bleichung von $>80\%$ bei 4 °C innerhalb einer Stunde erreichen. Das Lactoperoxidase-System benötigte für das gleiche Ergebnis 6 bis 24 h (Campbell und Drake, 2013). Lactoperoxidase ist lagerstabil in Milch, Molke und Molkeretentat. Eine Verringerung der Aktivität nach Lagerung bei 4 oder -20 °C über 0, 24, 48 oder 72 h wurde nicht gemessen (Campbell et al., 2014). Die Lactoperoxidaseaktivität ist jedoch in verschiedenen Milchprodukten variabel und somit nicht reproduzierbar. Eine gute Reproduzierbarkeit der Bleichung in verschiedenen Molkereiprodukten kann nur durch Zugabe von MsP1 erreicht werden. Außerdem kann durch Zugabe von MsP1 zu dem Lactoperoxidase-System der pH-Bereich für die Bleichung erweitert werden, da das Lactoperoxidase-System mit steigendem pH und das MsP1-System mit sinkendem pH bessere Bleichungsergebnisse lieferte. Der pH hatte einen größeren Einfluss auf die Bleichung als die Temperatur (Campbell und Drake, 2014).

Die hier durchgeführten Bleichungen, sowohl im 2- als auch im 3-Enzym-System, wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die chemische Bleichung werden typischerweise Temperaturen von 70 °C bis 74 °C benötigt (McDonough et al., 1968). Listiyani *et al.* konnten zeigen, dass Wasserstoffperoxid die Gelbfärbung, also den b-Wert, bei 68 °C deutlich verringerte, bei 4 °C jedoch fast keine Bleichung stattfand. Im Vergleich zu Benzoylperoxid war Wasserstoffperoxid weniger effektiv, so dass die ursprüngliche weiße Farbe der ungefärbten Molke nicht erreicht werden konnte (Listiyani et al., 2012). In den hier durchgeführten Bleichungen konnte mit den Systemen sowohl in der Milch als auch in der Molke eine weiße Farbe, mit fast vollständiger Entfärbung erreicht werden. Die in der chemischen Bleichung benötigten höheren Temperaturen können eine Denaturierung der Molkeproteine hervorrufen (Law und Leaver, 2000), wobei hier α -Lactalbumin (Denaturierung bei 58,6 °C - 61,5 °C) temperaturlabiler als β -Lactoglobulin ist (Bernal und Jelen, 1985). Bezogen auf das Gesamtprotein der Molke wurde eine 38 %ige Denaturierung mit 2 % Wasserstoffperoxid (w/w) bei 50 °C und 4 Stunden Inkubation hervorgerufen (Cooney und Morr, 1972).

Zusätzlich bedingt eine längere Erwärmung bei 70 °C von Annatto gefärbten Milchprodukten einen pinken Ton (Shumaker und Wendorff, 1998) und die Entstehung von unerwünschten Fehlparomen. Croissant *et al.* charakterisierten den Einfluss einer chemischen Bleichung auf die Aromen von flüssiger und sprühgetrockneter Cheddarmolke. Eingesetzt wurden 250 mg kg⁻¹ bis 500 mg kg⁻¹ Wasserstoffperoxid bzw. 10 mg kg⁻¹ bis 20 mg kg⁻¹ Benzoylperoxid. Sie erreichten b-Werte von 13,6 für Wasserstoffperoxid und 13,5 für Benzoylperoxid als Bleichungsergebnis für Molkenproteinkonzentrate, ausgehend von einem b-Wert von 15,0 für die ungebleichten Präparate (Croissant et al., 2009).

Mit den hier verwendeten Enzymen wurde für die Bleichung von Annatto ein wesentlich besserer b-Wert von 4,6 erreicht. Nachteilig fanden Croissant *et al.* in den gebleichten Produkten Fehlparomen. In der mit Wasserstoff gebleichten flüssigen Molke und Molkenproteinkonzentraten konnten sie höhere Konzentrationen von Oxidationsprodukten wie Hexanal, Heptanal, Octanal und Nonanal nachweisen. In der gebleichten Molke wurden zusätzlich kartonartige Aromen sowie der Verlust an süßlichen Aromen

und Kocharomen beobachtet. Ein gefundenes fruchtig-, grün-, erdig- und bohliges Fehl-
aroma mit gemüseähnlichen Nuancen konnte dem 2-Pentylfuran, dessen Konzentration
in der chemischen Bleichung anstieg, zugewiesen werden (Croissant et al., 2009; Kris-
hnamurthy et al., 1967). Ähnliche Effekte wurden auch für Molkenproteinkonzentrate
gezeigt. Ungebleichte Molkenproteinkonzentrate zeigten im Vergleich zu gebleichten
intensivere Koch- und Milcharomen (Listiyani et al., 2011). Mit steigender Konzentration
an chemischen Bleichmitteln stieg auch die Konzentration der Oxidationsprodukte
von Fetten (Listiyani et al., 2012). Sprühgetrocknete Molkekonzentrate aus mit dem
Lactoperoxidase-System bzw. MsP1-System gebleichter Molke wiesen ein Fehlen an
süßen und buttrig/milchigen Aromen. Zusätzlich wurde ein kartonartiges Aroma über-
einstimmend mit höheren Vorkommen an 1-Octen-3-ol and 1-Octen-3-on detektiert. Die
mit dem Lactoperoxidase-System gebleichten Milchprodukte wiesen höhere Mengen an
2,3-Octadienon und 2-Pentylfuran auf. Die Konzentration von Hexanal, einem Schlüs-
selaroma für grüne Noten, welches auf Lipidoxidation zurückzuführen ist, war bei der
Behandlung mit H_2O_2 alleine und dem Lactoperoxidase-System wesentlich höher als bei
der Bleichung mit dem MsP1-System (Campbell und Drake, 2013). Die enzymatische
Bleichung von Proteinretentaten (80 % und 34 % Protein) war bei 34°C zwar schneller
als bei 4°C , dafür wurden bei 4°C jedoch weniger Fehleraromen produziert (Campbell
und Drake, 2014). Um eine mögliche hitzeinduzierte Entstehung von Fehleraromen zu
unterbinden, wurde die Bleichung in dieser Arbeit bei Raumtemperatur durchgeführt.
Ein zusätzlicher Vorteil der enzymatischen Bleichung mit dem 2- und 3-Enzym-System
ergibt sich aus den sehr geringen Wasserstoffperoxidkonzentrationen, wodurch die oben
genannten chemischen Veränderungen der Milch bzw. Molkebestandteile minimiert
werden.

Eine Mindestkonzentration von $0,2\text{ mmol L}^{-1}$ Wasserstoffperoxid wird für die schnelle
Bleichung von gefärbter Molke und gefärbter Milch benötigt, wobei eine Konzentration
von $0,6\text{ mmol L}^{-1}$ möglichst nicht überschritten werden sollte. In Puffer (Kapitel 3.3.6)
wurde der Abbau von β,β -Carotin auch unter $0,2\text{ mmol L}^{-1}$ Wasserstoffperoxid beob-
achtet. Möglicherweise verbrauchen andere Peroxidasen, die in Molke vorhanden sind,
wie Lactoperoxidasen das Wasserstoffperoxid (Kussendrager und van Hooijdonk, 2000).
MsP1 könnte aber auch zusätzlich andere in Molke vorhandene Substrate vor dem
Carotinabbau oxidieren. Mögliche Substrate für MsP1 sind Phenole, was auch den
Tyrosinrest in Proteinen einschließt (Otte und Qvist, 1998).

Um fast weiße Produkte nach der Bleichung zu bekommen, muss ein b-Wert von
 ~ 4 erreicht werden. Hierfür mussten die beiden Bleichungssysteme in dieser Arbeit so
abgestimmt werden, dass eine ausreichende aber nicht-inhibierende Konzentration des
zweiten Substrats Wasserstoffperoxid über den gesamten Bleichungszeitraum eingestellt
war. Der erste Reaktionsschritt in dem 3-Enzym-System ist die Hydrolyse der Lactose
zu D-Galactose und D-Glucose mittels Lactase. D-Glucose dient GOX als Substrat, um
im zweiten Schritt H_2O_2 neben D-Glucono-1,5-lacton zu generieren (Keilin und Hartree,
1948). Schließlich kann MsP1 aufgrund des vorhandenen H_2O_2 die Carotinoide oxidativ
abbauen (Zelena et al., 2009) (Abb. 4.8). Die Steuerung der Reaktion wurde über die
GOX-Aktivität angepasst, wobei hier zu beachten war, dass die Lactaseaktivität die
GOX-Aktivität nicht überschreitet, um eine Akkumulation der D-Glucose zu verhindern.
Da in dem 3-Enzym-System die Lactase für die GOX D-Glucose als Substrat herstellt

und die GOX das entstandene Substrat direkt weiter umsetzen soll, wird die Substratkonzentration für die GOX in dem System immer sehr gering sein.

Der Ablauf der Bleichung kann in drei Phasen unterteilt werden (Abb. 3.81). Am Anfang (a) war die H_2O_2 -Konzentration noch gering, weswegen auch die Geschwindigkeit der Reaktion gering war. Im vorherigen Versuch (Kapitel 3.6.1) wurde gezeigt, dass MsP1 ab einer H_2O_2 -Konzentration von $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ schneller arbeitet. In Phase b der Kinetik war diese Konzentration von H_2O_2 erreicht, so dass die Reaktion wesentlich schneller ablief. Die Reaktionsgeschwindigkeit blieb bis zu einem b-Wert von ca. 10 hoch, was einer β,β -Carotin-Konzentration von $0,0037 \text{ mmol L}^{-1}$ entspricht. Nun war der limitierende Faktor die geringe Konzentration des zweiten Substrates β,β -Carotin, weswegen die Reaktionsgeschwindigkeit in der Phase c wieder sank. Zusätzlich war die H_2O_2 -Konzentration nach diesem Zeitraum weiter gestiegen, was wiederum einen hemmenden Effekt auf die Reaktion hatte. Für die Auswahl der GOX-Aktivität ist die Geschwindigkeit in der Phase c wichtig. Da hier MsP1 auf Grund der geringen β,β -Carotin-Konzentration langsamer arbeitete, musste die Aktivität der GOX auch so klein gewählt werden, dass bis zur vollständigen Bleichung (b-Wert < 2) die H_2O_2 -Konzentration nicht den Wert erreichte ($> 2 \text{ mmol L}^{-1}$), der zur Hemmung von MsP1 führt. Dann wäre eine vollständige Bleichung nicht mehr möglich. Die geringe Bleichung in der Negativkontrolle könnte auf eine nicht vollständige Hitzeinaktivierung (100°C , 2 h) von MsP1, beruhend auf der hohen Hitzestabilität (Kapitel 3.3.1), zurückzuführen sein.

Je nach Bleichungsgrad kann die Reaktion über eine Temperaturerhöhung und der damit verbundenen Denaturierung der Enzyme gestoppt werden, wobei Temperaturen über 60°C benötigt werden, um MsP1 zu inaktivieren (Pühse et al., 2009). Wenn eine hitzeempfindliche Lactase zum Einsatz käme, könnte die Reaktion der Lactase in der Milch nach Erreichen von $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ bis $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ D-Glucose durch Erhöhung der Temperatur gestoppt werden, wobei die beiden temperaturstabilen Enzyme GOX und MsP1 (Pühse et al., 2009) die Reaktion bis zur vollständigen Bleichung weiter fortführen würden.

Als alternative Enzyme für die Bleichung von Molke wurden Lipoxigenasen und Lactoperoxidasen vorgeschlagen (Kang et al., 2010). Das in Milch natürlich vorkommende Lactoperoxidasesystem dient als antimikrobielles Mittel (Çankaya et al., 2010). Dieses System konnte über die *in situ* Herstellung von H_2O_2 mit immobilisierter GOX aktiviert werden (Zhou und Lim, 2009). Da hier aber keine Bleichung mit inaktiviertem MsP1 beobachtet wurde, kann eine Reaktion einer unter Umständen vorhandenen Lactoperoxidase mit dem in der Molke vorhandenem Farbstoff ausgeschlossen werden. Lipoxygenase aus Sojabohnen wurde für die Bleichung von Weizenmehl verwendet (Frazier et al., 1973). Das Enzym beeinflusst die Eigenschaften von Brot und Mehl (Addo et al., 1993) (Cumbee et al., 1997).

Lipoxygenasen katalysieren die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, welche ein (Z),(Z)-1,4-Pentadien beinhalten. Die Fettsäuren werden zu einer konjugierten Hydroperoxidiensäure oxidiert (Ben Aziz et al., 1971) (Aziz et al., 1999). Der Mechanismus dieses so genannten *co*-oxidativen Carotinabbaus produziert über ein durch das

Enzym generiertes Peroxyradikal ein Carotinoidradikal, aus welchem abschließend ein Peroxycarotinoidradikal entsteht (Waché et al., 2001). Der größte Nachteil der Bleichung mittels Lipoxygenase ist die Entstehung von grünen und bohnenartigen Fehlparfums, die sich von den Fettsäuren ableiten. Davon abgesehen besitzen aus Pflanzen stammende LOX ein pH-Optimum nahe des neutralen pH, so dass ihr Einsatz in der Bleichung von Sauermolke eingeschränkt ist. Z.B. besitzt eine Avocado-LOX ihr Aktivitätsmaximum bei pH 6,5 (Jacobo-Velázquez et al., 2010). Sehr hohe pH-Optima wurden für die LOX aus dem Endosperm von Weizensamen bei pH 10,2 und pH 6,6 für die verschiedenen Isoenzyme beobachtet (Hsieh und McDonald, 1984).

Eine alternative Strategie für die Bleichung von Molke präsentierten Zhu and Damodaran. Sie entwickelten einen Prozess zur Herstellung von fettfreien Molkenproteinkonzentraten, da sich Norbixin vornehmlich in der Fettmicellfraktion befindet (Damodaran, 2011). Dabei konnten sie bis zu 60 % des Annattos aus der Molke mit Hilfe der Diafiltration entfernen (Zhu und Damodaran, 2012).

Durch den Einsatz von MsP1 in Verbindung mit GOX bzw. GOX und Lactase können Milchprodukte unter milden Bedingungen, wie z.B. niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen, niedrigen Temperaturen und ohne zusätzlichen apparativen Aufwand gebleicht werden. Im Vergleich zu den anderen genannten chemischen und physikalischen Methoden stellen somit die 2- und 3-Enzym-Systeme mit MsP1 eine sehr effiziente Methode zur Bleichung von Milchprodukten dar.

Literaturverzeichnis

- Abdel-Magid, A. F., K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff, und R. D. Shah
1996. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures1. *Journal of Organic Chemistry*, 61(11):3849–3862.
- Addo, K., D. Burtron, M. R. Stuart, H. R. Burton, und D. F. Hildebrand
1993. Soybean Flour Lipoxygenase Isozyme Mutant Effects on Bread Dough Volatiles. *Journal of Food Science*, 58(3):583–585.
- Adediran, S.
1996. Kinetics of the Formation of p-670 and of the Decay of Compound III of Horseradish Peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 327(2):279–284.
- Adediran, S. A.
1984. Effect of pH on the Formation of Compounds II and III of Horseradish Peroxidase. *Journal of Protein Chemistry*, 3(5-6):437–444.
- Adediran, S. A. und A.-M. Lambeir
1989. Kinetics of the Reaction of Compound-II of Horseradish-Peroxidase with Hydrogen-Peroxide to Form Compound-III. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 186(3):571–576.
- Aguiar, A., D. Gavioli, und A. Ferraz
2013. Extracellular Activities and Wood Component Losses During *Pinus Taeda* Biodegradation by the Brown-rot Fungus *Gloeophyllum Trabeum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82:187–191.
- Alfaifi, M. S. und C. E. Stathopoulos
2009. Effect of Egg Yolk Substitution by Sweet Whey Protein Concentrate on some Gelato Ice Cream Physical Properties During Storage. *Journal of Food and Nutrition Research*, 48(4):183–188.
- Alfaro, M., J. A. Oguiza, L. Ramirez, und A. G. Pisabarro
2014. Comparative Analysis of Secretomes in Basidiomycete Fungi. *Journal of Proteomics*, 102:28–43.
- An, E. S., D. H. Cho, J. W. Choi, Y. H. Kim, und B. K. Song
2010. Peroxidase-catalyzed Copolymerization of Syringaldehyde and Bisphenol A. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3–4):287–291.
- Ander, P. und K. Messner
1998. Oxidation of 1-Hydroxybenzotriazole by Laccase and Lignin Peroxidase. *Biotechnology Techniques*, 12(3):191–195.

- Aoyama, W., S. Sasaki, S. Matsumura, T. Mitsunaga, H. Hirai, Y. Tsutsumi, und T. Nishida
2002. Sinapyl Alcohol-Specific Peroxidase Isoenzyme Catalyzes the Formation of the Dehydrogenative Polymer from Sinapyl Alcohol. *Journal Of Wood Science*, 48(6):497–504.
- Aristidou, A. und M. Penttilä
2000. Metabolic Engineering Applications to Renewable Resource Utilization. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(2):187–198.
- Arnao, M. B., M. Acosta, J. A. Delrio, R. Varon, und F. Garciacanovas
1990. A Kinetic-Study on the Suicide Inactivation of Peroxidase by Hydrogen-Peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1041(1):43–47.
- Arora, D. S., M. Chander, und P. K. Gill
2002. Involvement of Lignin Peroxidase, Manganese Peroxidase and Laccase in Degradation and Selective Ligninolysis of Wheat Straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(2):115–120.
- Arora, D. S. und P. K. Gill
2005. Production of Ligninolytic Enzymes by *Phlebia floridensis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21(6-7):1021–1028.
- Arora, D. S. und R. K. Sharma
2009. Enhancement in *in vitro* Digestibility of Wheat Straw Obtained from Different Geographical Regions During Solid State Fermentation by White Rot Fungi. *Bioresource Technology*, 4(3):909–920.
- Asgher, M., Y. Sharif, und H. N. Bhatti
2010. Enhanced Production of Ligninolytic Enzymes By *Ganoderma lucidum* IBL-06 Using Lignocellulosic Agricultural Wastes. *International journal of chemical reactor engineering*, 8(A59):1–17.
- Aziz, S., Z. Wu, und D. S. Robinson
1999. Potato Lipoxygenase Catalysed Co-Oxidation of β -Carotene. *Food Chemistry*, 64(2):227–230.
- Bacocchi, E., M. F. Gerini, O. Lanzalunga, und S. Mancinelli
2002. Lignin Peroxidase Catalysed Oxidation of 4-Methoxymandelic Acid. The Role of Mediator Structure. *Tetrahedron*, 58(40):8087–8093.
- Bagger, S. und R. J. P. Williams
1971. Intermediates in Reaction between Hydrogen Peroxide and Horseradish Peroxidase. *Acta Chemica Scandinavica*, 25(3):976–982.
- Bagirova, N. A. und T. N. Shekhovtsova
1999. Kinetics and Chemistry of *o*-Dianisidine and 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Oxidation Reactions with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Peanut and Horseradish Peroxidases. *Kinetics and Catalysis*, 40(2):241–247.

- Bailey, M. J.
1988. A Note on the Use of Dinitrosalicylic Acid for Determining the Products of Enzymatic Reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(5):494–496.
- Bak, J. S., J. K. Ko, I.-G. Choi, Y.-C. Park, J.-H. Seo, und K. H. Kim
2009. Fungal Pretreatment of Lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to Produce Ethanol from Rice Straw. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(3):471–482.
- Baldwin, D. A., H. M. Marques, und J. M. Pratt
1987. Hemes and Hemoproteins: 5. Kinetics of The Peroxidatic Activity of Microperoxidase-8-Model for the Peroxidase Enzymes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 30(3):203–217.
- Barbosa, O., R. Torres, C. Ortiz, und R. Fernandez-Lafuente
2012. Versatility of Glutaraldehyde to Immobilize Lipases: Effect of The Immobilization Protocol on The Properties of Lipase B from *Candida antarctica*. *Process Biochemistry*, 47(8):1220–1227.
- Barnicoat, C. R.
1937. 151. The Reactions and Properties of Annatto as a Cheese Colour, with Particular Reference to the Chemistry of Cheese Discoloration. *Journal of Dairy Research*, 8(01):61.
- Barrasa, J. M., A. Gutierrez, V. Escaso, F. Guillen, M. J. Martinez, und A. T. Martinez
1998. Electron and Fluorescence Microscopy of Extracellular Glucan and Aryl-Alcohol Oxidase During Wheat-Straw Degradation by *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1):325–332.
- Barth, A.
2007. Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767:1073–1101.
- Bauer, S., H. Sorek, V. D. Mitchell, A. B. Ibanez, und D. E. Wemmer
2012. Characterization of *Miscanthus giganteus* Lignin Isolated by Ethanol Organosolv Process under Reflux Condition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(33):8203–8212.
- Baynton, K., J. Bewtra, N. Biswas, und K. Taylor
1994. Inactivation of Horseradish Peroxidase by Phenol and Hydrogen Peroxide: A Kinetic Investigation. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1206(2):272–278.
- Bec, N., A. Villa, P. Tortora, V. V. Mozhaev, C. Balny, und R. Lange
1996. Enhanced Stability of Carboxypeptidase from *Sulfolobus solfataricus* at High Pressure. *Biotechnology Letters*, 18(4):483–488.
- Belova, O. V., A. V. Lisov, N. G. Vinokurova, A. A. Kostenevich, L. I. Sapunova, A. G. Lobanok, und A. A. Leontievsky
2014. Xylanase and Cellulase of Fungus *Cerrena unicolor* VKM F-3196: Production, Properties, and Applications for the Saccharification of Plant Material. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(2):148–153.

- Ben Aziz, A., S. Grossmann, I. Ascarelli, und P. Budowski
1971. Carotene-Bleaching Activities of Lipoxygenase and Heme Proteins as Studied by a Direct Spectrophotometric Method. *Phytochemistry*, 10(7):1445–&.
- Bendl, R. F., J. M. Kandel, K. D. Amodeo, A. M. Ryder, und E. M. Woolridge
2008. Characterization of the Oxidative Inactivation of Xylanase by Laccase and a Redox Mediator. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2):149–156.
- Benoit, I., D. Navarro, N. Marnet, N. Rakotomanomana, L. Lesage-Meessen, J.-C. Sigoillot, M. Asther, und M. Asther
2006. Feruloyl Esterases as a Tool for the Release of Phenolic Compounds from Agro-Industrial By-Products. *Carbohydrate Research*, 341(11):1820–1827.
- Berlin, A., M. Balakshin, N. Gilkes, J. Kadla, V. Maximenko, S. Kubo, und J. Saddler
2006. Inhibition of Cellulase, Xylanase and beta-Glucosidase Activities by Softwood Lignin Preparations. *Journal of Biotechnology*, 125(2):198–209.
- Bernal, V. und P. Jelen
1985. Thermal-Stability of Whey Proteins - A Calorimetric Study. *Journal of Dairy Science*, 68(11):2847–2852.
- Betancor, L., F. Lopez-Gallego, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, Dellamora-Ortiz Cesar Mateo, Gisela, R. Fernandez-Lafuente, und J. M. Guisan
2006. Different Mechanisms of Protein Immobilization on Glutaraldehyde Activated Supports: Effect of Support Activation and Immobilization Conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4):877–882.
- Biely, P., M. Vrsanska, M. Tenkanen, und D. Kluepfel
1997. Endo-beta-1,4-Xylanase Families: Differences in Catalytic Properties. *Journal of Biotechnology*, 57(1-3):151–166.
- Biskup, I., I. Golonka, A. Gamian, und Z. Sroka
2013. Antioxidant Activity of Selected Phenols Estimated by ABTS and FRAP Methods. *Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 67:958–963.
- Bisswanger, H.
1994. *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*, 2 edition. Weinheim und New York: VCH.
- Bogolitsyn, K. G., M. A. Aizenshtadt, A. N. Pryakhin, V. V. Lunin, und S. A. Pokryshkin
2010. Kinetics of the Catalytic Oxidation of Model Compounds of Lignin With Hydrogen Peroxide in the Presence of Peroxidase from Horse-Radish. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 84(9):1511–1515.
- Bohlin, C., K. Lundquist, und L. J. Jönsson
2009. Oxidation of the Erythro and Threo Forms of the Phenolic Lignin Model Compound 1-(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)-2-(2-Methoxyphenoxy)-1,3-Propanediol by Laccases and Model Oxidants. *Bioorganic Chemistry*, 37(5):143–148.
- Boonyaratanakornkit, B. B., C. B. Park, und D. S. Clark
2002. Pressure Effects on Intra- and Intermolecular Interactions within Proteins.

- Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1-2):235–249.
- Bosse, A. K., M. A. Fraatz, und H. Zorn
2013. Formation of Complex Natural Flavours by Biotransformation of Apple Pomace with Basidiomycetes. *Food Chemistry*, 141(3):2952–2959.
- Bourbonnais, R. und M. G. Paice
1990. Oxidation of Non-Phenolic Substrates. An Expanded Role for Laccase in Lignin Biodegradation. *FEBS Letters*, 267(1):99–102.
- Bouws, H., A. Wattenberg, und H. Zorn
2008. Fungal Secretomes - Nature's Toolbox for White Biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(3):381–388.
- Bradford, M. M.
1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
- Broda, P., P. R. Birch, P. R. Brooks, und P. F. Sims
1996. Lignocellulose Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: Gene Families and Gene Expression for a Complex Process. *Molecular Microbiology*, 19(5):923–932.
- Bundesministerium für Gesundheit
21.05.2012. Zusatzstoff-Zulassungsverordnung vom 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230, 231), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 21. Mai 2012 (BGBl. I S. 1201) geändert worden ist.
- Byler, D. M. und H. Susi
1986. Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers*, 25(3):469–487.
- Cai, Y., H. Wu, X. Liao, Y. Ding, J. Sun, und D. Zhang
2010. Purification and Characterization of Novel Manganese Peroxidase from *Rhizoctonia* sp SYBC-M3. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(6):1016–1021.
- Camarero, S., A. I. Canas, P. Nousiainen, E. Record, A. Lomascolo, M. J. Martinez, und A. T. Martinez
2008. *p*-Hydroxycinnamic Acids as Natural Mediators for Laccase Oxidation of Recalcitrant Compounds. *Environmental Science & Technology*, 42(17):6703–6709.
- Camarero, S., D. Ibarra, A. T. Martinez, J. Romero, A. Gutierrez, und J. C. del Rio
2007. Paper Pulp Delignification Using Laccase and Natural Mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5):1264–1271.
- Camarero, S., S. Sarkar, F. J. Ruiz-Duenas, M. J. Martinez, und Á. T. Martinez
1999. Description of a Versatile Peroxidase Involved in the Natural Degradation of Lignin that has Both Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidase Substrate Interaction Sites. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15):10324–10330.

- Campbell, R. E. und M. A. Drake
2013. Cold Enzymatic Bleaching of Fluid Whey. *Journal of Dairy Science*, 96(12):7404–7413.
- Campbell, R. E. und M. A. Drake
2014. Enzymatic Bleaching in Commercial Colored Cheddar Whey Retentates. *International Dairy Journal*, 38(2):148–153.
- Campbell, R. E., P. D. Gerard, und M. A. Drake
2014. Characterizing Endogenous and Exogenous Peroxidase Activity for Bleaching of Fluid Whey and Retentate. *Journal of Dairy Science*, 97(3):1225–1232.
- Canas, A. I., M. Alcalde, F. Plou, M. J. Martinez, A. T. Martinez, und S. Camarero
2007. Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase is Strongly Enhanced by Phenolic Compounds Present in Soil. *Environmental Science & Technology*, 41(8):2964–2971.
- Çankaya, M., M. Şişecioglu, Ö. Barış, M. Güllüce, und H. Özdemir
2010. Effects of Bovine Milk Lactoperoxidase System on Some Bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(1):57–60.
- Cantarella, M., L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera, und F. Alfani
2004. Effect of Inhibitors Released During Steam-Explosion Treatment of Poplar Wood on Subsequent Enzymatic Hydrolysis and SSF. *Biotechnology Progress*, 20(1):200–206.
- Caramelo, L., M. J. Martinez, und A. T. Martinez
1999. A Search for Ligninolytic Peroxidases in the Fungus *Pleurotus eryngii* Involving alpha-keto-gamma-Thiomethylbutyric Acid and Lignin Model Dimers. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3):916–922.
- Carrie, M. S.
1938. 179. Annatto as a cheese colour. *Journal of Dairy Research*, 9(01):72.
- Castanares, A., S. I. McCraes, und T. M. WOOD
1992. Purification and Properties of a Feruloyl *Para*-Coumaroyl Esterase from the Fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(11):875–884.
- Castro, C. E., R. S. Wade, und N. O. Belser
1978. Conversion of Oxyhemoglobin to Methemoglobin by Organic and Inorganic Reductants. *Biochemistry*, 17(2):225–231.
- Caufrier, F., A. Martinou, C. Dupont, und V. Bouriotis
2003. Carbohydrate Esterase Family 4 Enzymes: Substrate Specificity. *Carbohydrate Research*, 338(7):687–692.
- Chance, B.
1949. The Enzyme-Substrate Compounds of Horseradish Peroxidase and Peroxides: 2. Kinetics of Formation and Decomposition of the Primary and Secondary Complexes. *Archives of biochemistry*, 22(2):224–252.

Chance, B.

1952. The Kinetics and Stoichiometry of the Transition from the Primary to the Secondary Peroxidase Peroxide Complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 41(2):416–424.

Chance, B.

1999. The Kinetics of the Enzyme-substrate Compound of Peroxidase. 1943. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 73:3–23.

Chen, L.-C., Y.-C. Chung, und C.-T. Chang

2012. Characterisation of an Acidic Peroxidase from Papaya (*Carica papaya* L. Cv Tainung No. 2) Latex and its Application in the Determination of Micromolar Hydrogen Peroxide in Milk. *Food Chemistry*, 135(4):2529–2535.

Chen, Y.-r. und S. Sarkanen

2003. Macromolecular Lignin Replication: A Mechanistic Working Hypothesis. *Phytochemistry Reviews*, 2(3):235–255.

Childs, J. L., M. D. Yates, und M. A. Drake

2007. Sensory Properties of Meal Replacement Bars and Beverages Made from Whey and Soy Proteins. *Journal of Food Science*, 72(6):S425–S434.

Childs, R. E. und W. G. Bardsley

1975. Steady-State Kinetics of Peroxidase with 2,2'-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulphonic Acid) as Chromogen. *Biochemical Journal*, 145(1):93–103.

Christian, V., R. Shrivastava, D. Shukla, H. Modi, und B. R. Vyas

2005. Mediator Role of Veratryl Alcohol in the Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidative Decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4):426–431.

Chukhrai, E. S., L. F. Atyaksheva, und O. S. Pilipenko

2011. The Special Features of Protein Adsorption Isotherms on Silica Adsorbents. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 85(5):890–896.

Colpa, D. I., M. W. Fraaije, und E. van Bloois

2014. DyP-Type Peroxidases: a Promising and Versatile Class of Enzymes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(1):1–7.

Commission Internationale de l'Éclairage

1988. Colorimetry. *Color Research & Application*, 13(1):65–66.

Cooney, C. M. und C. V. Morr

1972. Hydrogen-Peroxide Alteration of Whey Proteins in Whey and Concentrated Whey Systems. *Journal of Dairy Science*, 55(5):567–&.

Council of the European Union

16.12.2008. Verordnung (EG) Nr. 1331/2008: Über ein einheitliches Zulassungsverfahren für Lebensmittelzusatzstoffe, -enzyme und -aromen.

Council of the European Union

20.1.2009. Verordnung (EG) Nr. 1332/2008: Über Lebensmittelenzyme.

- Croissant, A. E., E. J. Kang, R. E. Campbell, E. Bastian, und M. A. Drake
2009. The Effect of Bleaching Agent on the Flavor of Liquid Whey and Whey Protein Concentrate. *Journal of Dairy Science*, 92(12):5917–5927.
- Cumbee, B., D. F. Hildebrand, und K. Addo
1997. Soybean Flour Lipoxygenase Isozymes Effects on Wheat Flour Dough Rheological and Breadmaking Properties. *Journal of Food Science*, 62(2):281–283.
- Cybulska, I., G. Brudecki, K. Rosentrater, J. L. Julson, und H. Lei
2012. Comparative Study of Organosolv Lignin Extracted from Prairie Cordgrass, Switchgrass and Corn Stover. *Bioresource Technology*, 118:30–36.
- Daassi, D., S. Rodriguez-Couto, M. Nasri, und T. Mechichi
2014. Biodegradation of Textile Dyes by Immobilized Laccase from *Coriolopsis gallica* into Ca-Alginate Beads. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90:71–78.
- D'Alfonso, C., O. Lanzalunga, A. Lapi, und R. Vadala
2014. Comparing the Catalytic Efficiency of Ring Substituted 1-Hydroxybenzotriazoles as Laccase Mediators. *Tetrahedron*, 70(18):3049–3055.
- Damodaran, S.
2011. Straightforward Process for Removal of Milk Fat Globule Membranes and Production of Fat-free Whey Protein Concentrate from Cheese Whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, P. 110824132628054.
- Daniel, I., P. Oger, und R. Winter
2006. Origins of Life and Biochemistry under High-Pressure Conditions. *Chemistry Society Reviews*, 35(10):858–875.
- Davin, L. B. und N. G. Lewis
2005. Lignin Primary Structures and Dirigent Sites. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(4):407–415.
- Dekker, R. F. und A. M. Barbosa
2001. The Effects of Aeration and Veratryl Alcohol on the Production of two Laccases by the *Ascomycete botryosphaeria* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(1):81–88.
- Delgenes, J. P., R. Moletta, und J. M. Navarro
1996. Effects of Lignocellulose Degradation Products on Ethanol Fermentations of Glucose and Xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3):220–225.
- Demirer, R., A. M. Kutan, und F. Shen
2012. The Effect of Ethanol Listing on Corn Prices: Evidence from Spot and Futures Markets. *Energy Economics*, 34(5):1400–1406.
- Dias, A. A., G. S. Freitas, G. S. Marques, A. Sampaio, I. S. Fraga, M. A. Rodrigues, D. V. Evtuguin, und R. M. Bezerra
2010. Enzymatic Saccharification of Biologically Pre-Treated Wheat Straw with White-Rot Fungi. *Bioresource Technology*, 101(15):6045–6050.

- Diaz-Gonzalez, M., T. Vidal, und T. Tzanov
2011. Phenolic Compounds as Enhancers in Enzymatic and Electrochemical Oxidation of Veratryl Alcohol and Lignins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(6):1693–1700.
- Ding, Z., L. Peng, Y. Chen, L. Zhang, ZhenghuaGu, G. Shi, und K. Zhang
2012. Production and Characterization of Thermostable Laccase from the Mushroom, *Ganoderma lucidum*, Using Submerged Fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 6(6):1147–1157.
- Dippe, M., M. Q. Mueller, A. Sinz, und R. Ulbrich-Hofmann
2012. Phospholipases A(1) from *Armillaria ostoyae* Provide Insight into the Substrate Recognition of alpha/beta-Hydrolase Fold Enzymes. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89(8):1435–1448.
- Doddapaneni, H., V. Subramanian, B. Fu, und D. Cullen
2013. A Comparative Genomic Analysis of the Oxidative Enzymes Potentially Involved in Lignin Degradation by *Agaricus bisporus*. *Fungal genetics and biology*, 55:22–31.
- Dodson, P. J., C. S. Evans, P. J. Harvey, und J. M. Palmer
1987. Production and Properties of an Extracellular Peroxidase from *Coriolus Versicolor* which Catalyzes C-Alpha-C-Beta Cleavage in a Lignin Model-Compound. *FEMS Microbiology Letters*, 42(1):17–22.
- Dolphin, D.
1979. *The Porphyrins V7: Biochemistry, Part B*. Oxford: Elsevier Science.
- Dong, Y.-C., Y.-N. Dai, T.-Y. Xu, J. Cai, und Q.-H. Chen
2014. Biodegradation of Chestnut Shell and Lignin-Modifying Enzymes Production by the White-Rot Fungi *Dichomitus squalens*, *Phlebia radiata*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(5):755–764.
- DSM Food Specialties
2012. https://www.dsm.com/content/dam/dsm/foodandbeverages/en_US/documents/Whey%20portfolio.pdf: abgerufen am: 05.05.2015: Whey Portfolio.
- D'Souza, T. M., C. S. Merrit, und C. A. Reddy
1999. Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12):5307–5313.
- Dunford, H. B. und J. S. Stillman
1976. On the Function and Mechanism of Action of Peroxidases. *Coordination chemistry reviews*, 19(3):187–251.
- Dzwolak, W., R. Ravindra, J. Lendermann, und R. Winter
2003. Aggregation of Bovine Insulin Probed by DSC/PPC Calorimetry and FTIR Spectroscopy. *Biochemistry*, 42(38):11347–11355.
- Elisashvili, V., E. Kachlishvili, und M. Penninckx
2008. Effect of Growth Substrate, Method of Fermentation, and Nitrogen Source

- on Lignocellulose-Degrading Enzymes Production by White-Rot Basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11):1531–1538.
- Eriksson, T., J. Börjesson, und F. Tjerneld
2002. Mechanism of Surfactant Effect in Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3):353–364.
- Evans, C. S.
1985. Laccase Activity in Lignin Degradation by *Coriolus versicolor* *in vivo* and *in vitro* Studies. *FEBS Letters*, 27(3):339–343.
- Faraco, V., A. Piscitelli, G. Sannia, und P. Giardina
2007. Identification of a New Member of the Dye-Decolorizing Peroxidase Family from *Pleurotus ostreatus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23(6):889–893.
- Fernández-Fueyo, E., R. Castanera, F. J. Ruiz-Dueñas, M. F. López-Lucendo, L. Ramírez, A. G. Pisabarro, und A. T. Martínez
2014a. Ligninolytic Peroxidase Gene Expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential Regulation in Lignocellulose Medium and Effect of Temperature and pH. *Biomass Degradation by Fungi*, 72(0):150–161.
- Fernández-Fueyo, E., F. J. Ruiz-Duenas, M. Jesus Martinez, A. Romero, K. E. Hammel, F. Javier Medrano, und A. T. Martinez
2014b. Ligninolytic Peroxidase Genes in the Oyster Mushroom Genome: Heterologous Expression, Molecular Structure, Catalytic and Stability Properties, and Lignin-Degrading Ability. *Biotechnology for Biofuels*, 7.
- Fernández-Fueyo, E., F. J. Ruiz-Duenas, und A. T. Martinez
2014c. Engineering a Fungal Peroxidase that Degrades Lignin at very Acidic pH. *Biotechnology for Biofuels*, 7.
- Ferreira, L., C. Afonso, H. Vila-Real, A. Alfaia, und M. H. Ribeiro
2008. Evaluation of the Effect of High Pressure on Naringin Hydrolysis in Grapefruit Juice with Naringinase Immobilised in Calcium Alginate Beads. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2):146–150.
- Ferreira, P., A. Hernandez-Ortega, B. Herguedas, A. T. Martinez, und M. Medina
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. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37):24840–24847.
- Foegeding, E. A., J. P. Davis, D. Doucet, und M. K. McGuffey
2002. Advances in Modifying and Understanding Whey Protein Functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13(5):151–159.
- Fournand, D., B. Cathala, und C. Lapiere
2003. Initial Steps of the Peroxidase-Catalyzed Polymerization of Coniferyl Alcohol and/or Sinapyl Aldehyde: Capillary Zone Electrophoresis Study of pH-Effect. *Phytochemistry*, 62(2):139–146.

- Fraatz, M. A., Riemer, Stephanie J. L., R. Stöber, R. Kaspera, M. Nimtz, R. G. Berger, und H. Zorn
2009. A Novel Oxygenase from *Pleurotus sapidus* Transforms Valencene to Nootkatone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61(3–4):202–207.
- Frazier, P. J., F. A. Leigh-Dugmore, N. W. R. Daniels, P. W. Russell Eggitt, und J. B. M. Coppock
1973. The Effect of Lipoxygenase Action on the Mechanical Development of Wheat Flour Doughs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24(4):421–436.
- Frigon, J.-C., P. Mehta, und S. R. Guiot
2012. Impact of Mechanical, Chemical and Enzymatic Pre-Treatments on the Methane Yield from the Anaerobic Digestion of Switchgrass. *Biomass & Bioenergy*, 36:1–11.
- Gaikwad, P. D., D. J. Shirale, V. K. Gade, P. A. Savale, H. J. Kharat, K. P. Kakde, und M. D. Shirsat
2006. Immobilization of GOD on Electrochemically Synthesized PANI Film by Cross-Linking via Glutaraldehyde for Determination of Glucose. *International Journal of Electrochemical Science*, 1(8):425–434.
- Galbe, M. und G. Zacchi
2007. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Biofuels*, 108:41–65.
- Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser, und D. Haltrich
2002. Increased Production of Laccase by the Wood-Degrading Basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4):529–536.
- George, P.
1953. The third Intermediate Compound of Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 201(1):427–434.
- Ghaffar, S. H. und M. Fan
2014. Lignin in Straw and its Applications as an Adhesive. *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 48:92–101.
- Gharpuray, M. M., Y.-H. Lee, und L. T. Fan
1983. Structural Modification of Lignocellulosics by Pretreatments to Enhance Enzymatic-Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(1):157–172.
- Ghosh, A. und B. C. Bhattacharyya
1999. Biomethanation of White Rotted and Brown Rotted Rice Straw. *Bioprocess Engineering*, 20(4):297–302.
- Ghosh, M., R. Mukherjee, und B. Nandi
1998. Production of Extracellular Enzymes by two *Pleurotus* Species Using Banana Pseudostem Biomass. *Acta Biotechnologica*, 18(3):243–254.
- Gil-Rodriguez, P., C. Ferreira-Batista, R. Vazquez-Duhalt, und B. Valderrama
2008. A Novel Heme Peroxidase from *Raphanus sativus* Intrinsically Resistant to Hydrogen Peroxide. *Engineering in Life Sciences*, 8(3):286–296.

- Glenn, J. K. und M. H. Gold
1985. Purification and Characterization of an Extracellular Mn(II)-Dependent Peroxidase from the Lignin-Degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 242(2):329–341.
- Gold, M. H., H. L. Youngs, und M. D. Sollewijn Gelpke
2000. Manganese Peroxidase. In *Manganese and its Role in Biological Processes*, A. Sigel und H. Sigel, eds., volume 37 of *Metal Ions in Biological Systems*, Pp. 559–586. New York: Dekker.
- Gomes, E., A. P. Aguiar, C. C. Carvalho, Bonfa, Maricy Raquel B., R. da Silva, und M. Boscolo
2009. Ligninases Production by Basidiomycetes Strains on Lignocellulosic Agricultural Residues and their Application in the Decolorization of Synthetic Dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1):31–39.
- Goodwin, D. C., S. D. Aust, und T. A. Grover
1995. Evidence for Veratryl Alcohol as a Redox Mediator in Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation. *Biochemistry*, 34(15):5060–5065.
- Gosselink, R. J. A., A. Abächerli, H. Semke, R. Malherbe, P. Käuper, A. Nadif, und J. E. G. van Dam
2004. Analytical Protocols for Characterisation of Sulphur-Free Lignin. *Industrial Crops and Products*, 19(3):271–281.
- Grabber, J. H., J. Ralph, und R. D. Hatfield
2000. Cross-Linking of Maize Walls by Ferulate Dimerization and Incorporation into Lignin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12):6106–6113.
- Grishutin, S. G., A. V. Gusakov, A. V. Markov, B. B. Ustinov, M. V. Semenova, und A. P. Sinityn
2004. Specific Xyloglucanases as a New Class of Polysaccharide-Degrading Enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 1674(3):268–281.
- Guerrero, E., P. Aburto, E. Terres, O. Villegas, E. Gonzalez, T. Zayas, F. Hernandez, und E. Torres
2013. Improvement of Catalytic Efficiency of Chloroperoxidase by its Covalent Immobilization on SBA-15 for Azo Dye Oxidation. *Journal of Porous Materials*, 20(2):387–396.
- Gutfinger, T.
1981. Polyphenols in Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58(11):966–968.
- Haase-Aschoff, P., D. Linke, M. Nimtz, L. Popper, und R. G. Berger
2013. An Enzyme from *Auricularia auricula-judae* Combining both Benzoyl and Cinnamoyl Esterase Activity. *Process Biochemistry*, 48(12):1872–1878.
- Hallac, B. B., Y. Pu, und A. J. Ragauskas
2010. Chemical Transformations of *Buddleja davidii* Lignin During Ethanol Organosolv Pretreatment. *Energy & Fuels: an American Chemical Society Journal*, 24:2723–2732.

- Hammel, K. E. und M. A. Moen
1991. Depolymerization of a Synthetic Lignin *in vitro* by Lignin Peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(1):15–18.
- Hanefeld, U., L. Gardossi, und E. Magner
2009. Understanding Enzyme Immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38(2):453–468.
- Hatfield, R., J. Ralph, und J. H. Grabber
2008. A Potential Role for Sinapyl *p*-Coumarate as a Radical Transfer Mechanism in Grass Lignin Formation. *Planta*, 228(6):919–928.
- Heinfling, A., F. J. Ruiz-Duenas, M. J. Martinez, M. Bergbauer, U. Szewzyk, und A. T. Martinez
1998. A Study on Reducing Substrates of Manganese-Oxidizing Peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Letters*, 428(3):141–146.
- Henriksson, G., A. Nutt, H. Henriksson, B. Pettersson, J. Stahlberg, G. Johansson, und G. Pettersson
1999. Endoglucanase 28 (cel12A), a New *Phanerochaete chrysosporium* Cellulase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 259(1-2):88–95.
- Herberhold, H., S. Marchal, R. Lange, C. H. Scheyhing, R. F. Vogel, und R. Winter
2003. Characterization of the Pressure-Induced Intermediate and Unfolded State of Red-Shifted Green Fluorescent Protein - A Static and Kinetic FTIR, UV/VIS and Fluorescence Spectroscopy Study. *Journal of Molecular Biology*, 330(5):1153–1164.
- Herberhold, H., C. A. Royer, und R. Winter
2004. Effects of Chaotropic and Kosmotropic Cosolvents on the Pressure-Induced Unfolding and Denaturation of Proteins: An FT-IR Study on Staphylococcal Nuclease. *Biochemistry*, 43(12):3336–3345.
- Hidalgo-Cuadrado, N., P. Pérez-Galende, T. Manzano, C. G. d. Maria, V. L. Shnyrov, und M. G. Roig
2012. Screening of Postharvest Agricultural Wastes as Alternative Sources of Peroxidases: Characterization and Kinetics of a Novel Peroxidase from Lentil (*Lens culinaris* L.) Stubble. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19):4765–4772.
- Hilden, K., T. K. Hakala, P. Majjala, T. K. Lundell, und A. Hatakka
2007. Novel Thermotolerant Laccases Produced by the White-Rot Fungus *Physisporinus rivulosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2):301–309.
- Hofrichter, M., T. Vares, M. Kalsi, S. Galkin, K. Scheibner, W. Fritsche, und A. Hatakka
1999. Production of Manganese Peroxidase and Organic Acids and Mineralization of ¹⁴C-Labelled Lignin (¹⁴C-DHP) During Solid-State Fermentation of Wheat Straw with the White Rot Fungus *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5):1864–1870.
- Hong, J.-Y., Y.-S. Kim, und K.-K. Oh
2013. Fractionation and Delignification of Empty Fruit Bunches with Low Reaction Severity for High Sugar Recovery. *Bioresource Technology*, 146:176–183.

- Hori, C., T. Ishida, K. Igarashi, M. Samejima, H. Suzuki, E. Master, P. Ferreira, F. J. Ruiz-Duenas, B. Held, P. Canessa, L. F. Larrondo, M. Schmoll, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, J. A. Gaskell, P. Kersten, F. St John, J. Glasner, G. Sabat, S. S. BonDurant, K. Syed, J. Yadav, A. C. Mgbeahuruike, A. Kovalchuk, F. O. Asiegbu, G. Lackner, D. Hoffmeister, J. Rencoret, A. Gutierrez, H. Sun, E. Lindquist, K. Barry, R. Riley, I. V. Grigoriev, B. Henrissat, U. Kuees, R. M. Berka, A. T. Martinez, S. F. Covert, R. A. Blanchette, und D. Cullen
2014. Analysis of the *Phlebiopsis gigantea* Genome, Transcriptome and Secretome Provides Insight into Its Pioneer Colonization Strategies of Wood. *PLoS Genetics*, 10(12).
- Hsieh, C. C. und C. E. McDonald
1984. Isolation of Lipoxygenase Isoenzymes from Flour of Durum-Wheat Endosperm. *Cereal Chemistry*, 61(5):392–398.
- Hu, G., C. Cateto, Y. Pu, R. Samuel, und A. J. Ragauskas
2012. Structural Characterization of Switchgrass Lignin after Ethanol Organosolv Pretreatment. *Energy & Fuels: an American Chemical Society Journal*, 26(1):740–745.
- Hu, Z., L. Xu, und X. Wen
2013. Mesoporous Silicas Synthesis and Application for Lignin Peroxidase Immobilization by Covalent Binding Method. *Journal of Environmental Sciences-China*, 25(1):181–187.
- Hu, Z. C., R. A. Korus, C. R. Venkataramu, und R. L. Crawford
1993. Deactivation Kinetics of Lignin Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(7):567–574.
- Huijgen, W. J. J., A. T. Smit, P. J. d. Wild, und H. den Uil
2012. Fractionation of Wheat Straw by Prehydrolysis, Organosolv Delignification and Enzymatic Hydrolysis for Production of Sugars and Lignin. *Bioresource Technology*, 114:389–398.
- Ibrahim, M. F., S. Abd-Aziz, Yusoff, Mohd Ezreeza Mohamed, L. Y. Phang, und M. A. Hassan
2015. Simultaneous Enzymatic Saccharification and ABE Fermentation Using Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch as Substrate to Produce Butanol and Hydrogen as Biofuel. *Renewable Energy*, 77:447–455.
- Iketani, A., M. Nakamura, Y. Suzuki, K. Awai, und Y. Shioi
2013. A Novel Serine Protease with Caspase- and Legumain-like Activities from Edible Basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Fungal Biology*, 117(3):173–181.
- Isci, A., J. N. Himmelsbach, A. L. PomettoIII, D. R. D. Raj Raman, und R. P. Anex
2007. Aqueous Ammonia Soaking of Switchgrass Followed by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
- Isgrove, F. H., R. J. H. Williams, G. W. Niven, und A. T. Andrews
2001. Enzyme Immobilization on Nylon-Optimization and the Steps used to Prevent Enzyme Leakage from the Support. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(2–3):225–232.

Ishii, T.

1997. Structure and Functions of Feruloylated Polysaccharides. *Plant Science*, 127(2):111–127.

Jacobo-Velázquez, D. A., C. Hernández-Brenes, L. Cisneros-Zevallos, und J. Benavides
2010. Partial Purification and Enzymatic Characterization of Avocado (*Persea americana* Mill, cv. Hass) Lipoxygenase. *Food research international*, 43(4):1079–1085.

Jamal, F., S. Singh, T. Qidwai, P. K. Pandey, und D. Singh

2012. Optimization of Internal Conditions for Biocatalytic Dye Color Removal and a Comparison of Redox Mediator's Efficiency on Partially Purified *Trichosanthes dioica* Peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1-2):116–124.

JECFA

2004. Benzoyl peroxide <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-054.pdf>: aufgerufen am 11.05.2015.

Jeoh, T., C. I. Ishizawa, M. F. Davis, M. E. Himmel, W. S. Adney, und D. K. Johnson
2007. Cellulase Digestibility of Pretreated Biomass is Limited by Cellulose Accessibility. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1):112–122.

Johannson, T. und P. O. Nyman

1993. Isozymes of Lignin Peroxidase and Manganese(II) Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Trametes versicolor* I. Isolation of Enzyme Forms and Characterization of Physical and Catalytic Properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1):49–56.

Joseleau, J. P., S. Gharibian, J. Comatat, A. Lefebvre, und K. Ruel

1994. Indirect Involvement of Ligninolytic Enzyme-Systems in Cell-Wall Degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3):255–264.

Kamal, S., M. Asgher, K. ur Rehman, und Z. A. Zahir

2011. Hyperproduction of Laccase by *Pleurotus ostreatus* Ibl-02 during Decolorization of Drimarene Brilliant Red K-4bl. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(6A):1478–1486.

Kang, E. J., R. E. Campbell, E. Bastian, und M. A. Drake

2010. Invited Review: Annatto Usage and Bleaching in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 93(9):3891–3901.

Kang, S.-O., K.-S. Shin, Y.-H. Han, H.-D. Youn, und Y. C. Hah

1993. Purification and Characterisation of an Extracellular Peroxidase from White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1163(2):158–164.

Katahira, S., M. Ito, H. Takema, Y. Fujita, T. Tanino, T. Tanaka, H. Fukuda, und A. Kondo

2008. Improvement of Ethanol Productivity During Xylose and Glucose Co-Fermentation by Xylose-Assimilating *S. cerevisiae* via Expression of Glucose Transporter Sut1. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2):115–119.

- Kato, M., T. Maki, und R. Hayashi
2003. Fluorescence Spectroscopy of N-acetyl-L-tryptophan-amide and Proteins under High Pressure: Effects of Pressure, Temperature, and Organic Additives. In *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*, R. Winter, ed., Pp. 37–41. Springer Berlin Heidelberg.
- Kawai, S., Y. Kobayashi, M. Nakagawa, und H. Ohashi
2006. Degradation of a Nonphenolic Beta-O-4 Lignin Model Dimer by Horseradish Peroxidase with 1-Hydroxybenzotriazole. *Journal Of Wood Science*, 52:363–366.
- Keilin, D. und E. F. Hartree
1948. Properties of Glucose Oxidase (Notatin). *Biochemical Journal*, 42(2):221–229.
- Keilin, D. und E. F. Hartree
1951. Purification of Horse-Radish Peroxidase and Comparison of its Properties with those of Catalase and Methaemoglobin. *Biochemical Journal*, 49(1):88–0.
- Khosraneh, M., A. Mahmoudi, H. Rahimi, K. Nazari, und A. A. Moosavi-Movahedi
2007. Suicide-Peroxide Inactivation of Microperoxidase-11: A Kinetic Study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(6):677–684.
- Kim, I., M. S. U. Rehman, und J.-I. Han
2014. Enhanced Glucose Yield and Structural Characterization of Corn Stover by Sodium Carbonate Pretreatment. *Bioresource Technology*, 152(0):316–320.
- Kim, S. J. und M. Shoda
1999. Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3):1029–1035.
- Kim, S. J., N. Suzuki, Y. Uematsu, und M. Shoda
2001. Characterization of Aryl Alcohol Oxidase Produced by Dye-Decolorizing Fungus, *Geotrichum candidum* Dec1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2):166–172.
- Kim, T. H. und Y. Y. Lee
2005. Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 124(1-3):1119–1131.
- Kirk, T. K. und R. L. Farrell
1987. Enzymatic Combustion - The Microbial-Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41:465–505.
- Knezevic, A., I. Milovanovic, M. Stajic, N. Loncar, I. Brceski, J. Vukojevic, und J. Cilerdzic
2013. Lignin Degradation by Deleted Fungal Species. *Bioresource Technology*, 138:117–123.
- Koo, B.-W., B.-C. Min, K.-S. Gwak, S.-M. Lee, J.-W. Choi, H. Yeo, und I.-G. Choi
2012. Structural Changes in Lignin During Organosolv Pretreatment of *Liriodendron tulipifera* and the Effect on Enzymatic Hydrolysis. *Biomass & Bioenergy*, 42:24–32.

- Kosikowski, F. V.
1979. Whey Utilization and Whey Products 1. *Journal of Dairy Science*, 62(7):1149–1160.
- Kosseva, M. R., P. S. Panesar, G. Kaur, und J. F. Kennedy
2009. Use of Immobilised Biocatalysts in the Processing of Cheese Whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(5):437–447.
- Kötter, P. und M. Ciriacy
1993. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(6):776–783.
- Kouassi, G. K., R. C. Anantheswaran, S. J. Knabel, und J. D. Floros
2007. Effect of High-Pressure Processing on Activity and Structure of Alkaline Phosphatase and Lactate Dehydrogenase in Buffer and Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:9520–9529.
- Krings, U., N. Lehnert, M. A. Fraatz, B. Hardebusch, H. Zorn, und R. G. Berger
2009. Autoxidation versus Biotransformation of α -Pinene to Flavors with *Pleurotus sapidus*: Regioselective Hydroperoxidation of α -Pinene and Stereoselective Dehydrogenation of Verbenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21):9944–9950.
- Krishnamurthy, R. G., T. H. Smouse, B. D. Mookherjee, B. R. Reddy, und S. S. Chang
1967. Identification of 2-Pentyl Furan in Fats and Oils and Its Relationship to the Reversion Flavor of Soybean Oil. *Journal of Food Science*, 32(4):372–374.
- Kristensen, J. B., J. Börjesson, M. H. Bruun, F. Tjerneld, und H. Jørgensen
2007. Use of Surface Active Additives in Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4):888–895.
- Krügener, S., U. Krings, H. Zorn, und R. G. Berger
2010. A Dioxygenase of *Pleurotus sapidus* Transforms (+)-Valencene Regio-Specifically to (+)-Nootkatone via a Stereo-Specific Allylic Hydroperoxidation. *Bioresource Technology*, 101(2):457–462.
- Kudryavtseva, O. A., Y. E. Dunaevsky, O. V. Kamzolkina, und M. A. Belozersky
2008. Fungal Proteolytic Enzymes: Features of the Extracellular Proteases of Xylophilic Basidiomycetes. *AIBS Microbiology*, 77(6):643–653.
- Kumar, L., V. Arantes, R. Chandra, und J. Saddler
2012. The Lignin Present in Steam Pretreated Softwood Binds Enzymes and Limits Cellulose Accessibility. *Bioresource Technology*, 103(1):201–208.
- Kumar, R., S. Singh, und O. V. Singh
2008. Bioconversion of Lignocellulosic Biomass: Biochemical and Molecular Perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(5):377–391.
- Kussendrager, K. D. und A. C. van Hooijdonk
2000. Lactoperoxidase: Physico-Chemical Properties, Occurrence, Mechanism of Action and Applications. *British Journal of Nutrition*, 84:19–25.

- Kuwahara, M., J. K. Glenn, M. A. Morgan, und M. H. Gold
1984. Separation and Characterization of 2 Extracellular H₂O₂-Dependent Oxidases from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, 169(2):247–250.
- Kwon, S. W., B. O. Jeong, E. H. Lee, Y. S. Kim, und Y. Jung
2012. Conducting Polymer-Silica Composites for Immobilization of Enzymes. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(5):1593–1596.
- Laemmli, U. K.
1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lang, Q., L. Yin, J. Shi, L. Li, L. Xia, und A. Liu
2014. Co-Immobilization of Glucoamylase and Glucose Oxidase for Electrochemical Sequential Enzyme Electrode for Starch Biosensor and Biofuel Cell. *Biosensors & Bioelectronics*, 51:158–163.
- Lauber, S., I. Krause, H. Klostermeyer, und T. Henle
2003. Microbial Transglutaminase Crosslinks β -Casein and β -Lactoglobulin to Heterologous Oligomers under High Pressure. *European Food Research and Technology*, 216(1):15–17.
- Law, A. J. R. und J. Leaver
2000. Effect of pH on the Thermal Denaturation of Whey Proteins in Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3):672–679.
- Lee, S. B., I. H. Kim, D. D. Y. Ryu, und H. Taguchi
1983. Structural Properties of Cellulose and Cellulase Reaction Mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(1):33–51.
- Lee, S. K., S. D. George, W. E. Antholine, B. Hedman, K. O. Hodgson, und E. I. Solomon
2002. Nature of the Intermediate Formed in the Reduction of O₂ to H₂O at the Trinuclear Copper Cluster Active Site in Native Laccase. *Journal of the American Chemical Society*, 124(21):6180–6193.
- Lewin, M., ed.
1991. *Wood Structure and Composition*, volume 11 of *International Fiber Science and Technology Series*. New York: Dekker.
- Li, B., Y. Chen, X. Chen, D. Liu, H. Niu, J. Xiong, J. Wu, J. Xie, J. Bai, und H. Ying
2012a. A Novel Immobilization Method for Nuclease P-1 on Macroporous Absorbent Resin with Glutaraldehyde Cross-Linking and Determination of its Properties. *Process Biochemistry*, 47(4):665–670.
- Li, J., C. Liu, B. Li, H. Yuan, J. Yang, und B. Zheng
2012b. Identification and Molecular Characterization of a Novel DyP-Type Peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa* PKE117. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(3):774–785.

- Li, M., M. Tu, D. Cao, P. Bass, und S. Adhikari
2013. Distinct Roles of Residual Xylan and Lignin in Limiting Enzymatic Hydrolysis of Organosolv Pretreated Loblolly Pine and Sweetgum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3):646–654.
- Li, M.-F., S.-N. Sun, F. Xu, und R.-C. Sun
2012c. Sequential Solvent Fractionation of Heterogeneous Bamboo Organosolv Lignin for Value-Added Application. *Separation and Purification Technology*, 101:18–25.
- Li, Y., H. Zhang, und F. Cao
2011. Analysis of Phenolic Compounds Catalyzed by Immobilized Horseradish Peroxidase in Silica Glass. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 58(1):156–161.
- Liers, C., C. Bobeth, M. Pecyna, R. Ullrich, und M. Hofrichter
2010. Dyp-Like Peroxidases of the Jelly Fungus *Auricularia auricula-judae* Oxidize Nonphenolic Lignin Model Compounds and High-Redox Potential Dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6):1869–1879.
- Liers, C., M. J. Pecyna, H. Kellner, A. Worrlich, H. Zorn, K. T. Steffen, M. Hofrichter, und R. Ullrich
2013. Substrate Oxidation by Dye-Decolorizing Peroxidases (DyPs) From Wood- and Litter-Degrading *Agaricomycetes* Compared to other Fungal and Plant Heme-Peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(13):5839–5849.
- Lim, W.-S. und J.-W. Lee
2013. Influence of Pretreatment Condition on the Fermentable Sugar Production and Enzymatic Hydrolysis of Dilute Acid-Pretreated Mixed Softwood. *Bioresource Technology*, 140:306–311.
- Linke, D., R. Matthes, M. Nimtz, H. Zorn, M. Bunzel, und R. G. Berger
2013. An Esterase from the Basidiomycete *Pleurotus sapidus* Hydrolyzes Feruloylated Saccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(16):7241–7251.
- Listiyani, M. A. D., R. E. Campbell, R. E. Miracle, D. M. Barbano, P. D. Gerard, und M. A. Drake
2012. Effect of Temperature and Bleaching Agent on Bleaching of Liquid Cheddar whey. *Journal of Dairy Science*, 95(1):36–49.
- Listiyani, M. A. D., R. E. Campbell, R. E. Miracle, L. O. Dean, und M. A. Drake
2011. Influence of Bleaching on Flavor of 34 % Whey Protein Concentrate and Residual Benzoic Acid Concentration in Dried Whey Proteins. *Journal of Dairy Science*, 94(9):4347–4359.
- Liu, J., M. L. Wang, B. Tonnis, M. Habteselassie, X. Liao, und Q. Huang
2013. Fungal Pretreatment of Switchgrass for Improved Saccharification and Simultaneous Enzyme Production. *Bioresource Technology*, 135:39–45.
- Liu, X. und S. Ding
2009. Molecular Characterization of a New Acetyl Xylan Esterase (AXEII) from Edible Straw Mushroom *Volvariella volvacea* with both De-O-Acetylation and De-N-Acetylation Activity. *FEBS Letters*, 295(1):50–56.

- Lobos, S., J. Larrain, L. Salas, D. Cullen, und R. Vicuna
1994. Isoenzymes of Manganese-Dependent Peroxidase and Lactase Produced by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Microbiology*, 140:2691–2698.
- Lomascolo, A., E. Uzan-Boukhris, I. Herpoel-Gimbert, J.-C. Sigoillot, und L. Lesage-Meessen
2011. Peculiarities of *Pycnoporus* Species for Applications in Biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(6):1129–1149.
- López-Abelairas, M., M. Álvarez Pallín, D. Salvachúa, T. Lú-Chau, M. J. Martínez, und J. M. Lema
2013. Optimisation of the Biological Pretreatment of Wheat Straw with White-Rot Fungi for Ethanol Production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36(9):1251–1260.
- Lottspeich, F.
2012. *Bioanalytik*, 3. edition. Heidelberg: Spektrum.
- Louzada, Paulo Roberto F., J., M. E. Scaramello, C. Maya-Monteiro, A. W. Rietveld, und S. T. Ferreira
1996. Effect of Hydrostatic Pressure on the Fluorescence of Indole Derivatives. *Journal of Fluorescence*, 6(4):231–236.
- Lu, X. B., Y. M. Zhang, J. Yang, und Y. Liang
2007. Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover after Pretreatment with Dilute Sulfuric Acid. *Chemical Engineering & Technology*, 30(7):938–944.
- Lv, S., Q. Yu, X. Zhuang, Z. Yuan, W. Wang, Q. Wang, W. Qi, und X. Tan
2013. The Influence of Hemicellulose and Lignin Removal on the Enzymatic Digestibility from Sugarcane Bagasse. *BioEnergy Research*, 6(4):1128–1134.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, und I. S. Pretorius
2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3):506–577.
- Mackulak, T., J. Prousek, E. Švorc, und M. Drtil
2012. Increase of Biogas Production from Pretreated Hay and Leaves Using Wood-Rotting Fungi. *Chemical Papers*, 66(7):649–653.
- Majcherczyk, A. und A. Hüttermann
1997. Size-Exclusion Chromatography of Lignin as Ion-Pair Complex. *Journal of Chromatography. A*, 764(2):183–191.
- Marchis, T., G. Cerrato, G. Magnacca, V. Crocellà, und E. Laurenti
2012. Immobilization of Soybean Peroxidase on Aminopropyl Glass Beads: Structural and Kinetic Studies. *Biochemical Engineering Journal*, 67(0):28–34.
- Martinez, A. T., F. J. Ruiz-Duenas, A. Gutierrez, del Ro, Jose C., M. Alcalde, C. Liers, R. Ullrich, M. Hofrichter, K. Scheibner, L. Kalum, J. Vind, und H. Lund
2014. Search, Engineering, and Applications of New Oxidative Biocatalysts. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(6):819–835.

- Mate, D. M. und M. Alcalde
2015. Laccase Engineering: From Rational Design to Directed Evolution. *Biotechnology Advances*, 33(1):25–40.
- Mateo, C., J. M. Palomo, G. Fernandez-Lorente, J. M. Guisan, und R. Fernandez-Lafuente
2007. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6):1451–1463.
- McDonough, F. E., R. E. Hargrove, und R. P. Tittsler
1968. Decolorization of Annatto in Cheddar Cheese Whey. *Journal of Dairy Science*, 51(3):471–472.
- Meersman, F., L. Smeller, und K. Heremans
2006. Protein Stability and Dynamics in the Pressure–Temperature Plane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764(3):346–354.
- Mendonca Maciel, Marcia Jaqueline, Castro e Silva, Ademir, und Telles Ribeiro, Helena Camarao
2010. Industrial and Biotechnological Applications of Ligninolytic Enzymes of the Basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(6).
- Menendez, O., H. Rawel, U. Schwarzenbolz, und T. Henle
2006. Structural Changes of Microbial Transglutaminase During Thermal and High-Pressure Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5):1716–1721.
- Michaelis, L. und M. L. Menten
1913. Die Kinetik der Invertin-Wirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49:333–369.
- Mie, G.
1908. Beiträge zur Optik Trüber Medien, Speziell Kolloidaler Metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3):377–445.
- Moen, M. A. und K. E. Hammel
1994. Lipid-Peroxidation by the Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the Basis for Phenanthrene Oxidation by the Intact Fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6):1956–1961.
- Morais, H., C. Ramos, N. Matos, E. Forgacs, T. Cserhati, V. Almeida, J. Oliveira, Y. Darwish, und Z. Illes
2002. Liquid Chromatographic and Electrophoretic Characterisation of Extracellular beta-Glucosidase of *Pleurotus ostreatus* Grown in Organic Waste. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 770(1-2):111–119.
- Mosier, N. S., R. Hendrickson, M. Brewer, N. Ho, M. Sedlak, R. Dreshel, G. Welch, B. S. Dien, A. Aden, und Ladisch
2005. Industrial Scale-Up Of ph-Controlled Liquid Hot Water Pretreatment Of Corn Fiber For Fuel Ethanol Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 125(2):77–97.

- Mullersman, J. E. und Preston III, James F.
1991. Conjugation of N-Acylated Amino Sugars to Protein by Reductive Alkylation Using Sodium Cyanoborohydride: Application to an Azo Derivative of α -Amanitin. *Biochemistry and Cell biology*, 69(7):418–427.
- Munk, L., A. K. Sitarz, D. C. Kalyani, Mikkelsen, J. Dalgaard, und A. S. Meyer
2015. Can Laccases Catalyze Bond Cleavage in Lignin? *Biotechnology Advances*, 33(1):13–24.
- Mussatto, S. I., M. Fernandes, A. M. Milagres, und I. C. Roberto
2008. Effect of Hemicellulose and Lignin on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose from Brewer's Spent Grain. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2):124–129.
- Muthangya, M., A. M. Mshandete, und A. K. Kivaisi
2009. Two-Stage Fungal Pre-Treatment for Improved Biogas Production from Sisal Leaf Decortication Residues. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(11):4805–4815.
- Nair, R. R., P. Demarche, und S. N. Agathos
2013. Formulation and Characterization of an Immobilized Laccase Biocatalyst and its Application to Eliminate Organic Micropollutants in Wastewater. *New Biotechnology*, 30(6):814–823.
- Nakagame, S., R. P. Chandra, und J. N. Saddler
2010. The Effect of Isolated Lignins, Obtained from a Range of Pretreated Lignocellulosic Substrates, on Enzymatic Hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 105(5):871–879.
- Nakajima, R. und I. Yamazaki
1987. The Mechanism of Oxyperoxidase Formation from Ferryl Peroxidase and Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 262(6):2576–2581.
- Nakanishi, K. und N. Soga
1991. Phase Separation in Gelling Silica-Organic Polymer Solution: Systems Containing Poly(sodium styrenesulfonate). *Journal of the American Ceramic Society*, 74(10):2518–2530.
- National Agricultural Statistics Service
27.04.2015. Dairy Products 2014 Summary 04/27/2015:
<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/DairProdSu/DairProdSu-04-29-2015.pdf>: abgerufen am 30.04.2015.
- Neuman, R. C., W. Kauzmann, und A. Zipp
1973. Pressure Dependence of Weak Acid Ionization in Aqueous Buffers. *The Journal of Physical Chemistry*, 77(22):2687–2691.
- Ni, Y., J. Li, Z. Huang, K. He, J. Zhuang, und W. Yang
2013. Improved Activity of Immobilized Horseradish Peroxidase on Gold Nanoparticles in the Presence of Bovine Serum Albumin. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(11).

- Nicell, J. A. und H. Wright
1997. A Model of Peroxidase Activity with Inhibition by Hydrogen Peroxide. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(4):302–310.
- Nichols, N. N., B. S. Dien, und M. A. Cotta
2010. Fermentation of Bioenergy Crops into Ethanol Using Biological Abatement for Removal of Inhibitors. *Bioresource Technology*, 101(19):7545–7550.
- Nichols, N. N., L. N. Sharma, R. A. Mowery, K. C. Chambliss, P. G. van Walsum, B. S. Dien, und L. B. Iten
2008. Fungal Metabolism of Fermentation Inhibitors Present in Corn Stover Dilute Acid Hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(7):624–630.
- Nikolic, S., L. Mojovic, M. Rakin, und D. Pejin
2009. Bioethanol Production from Corn Meal by Simultaneous Enzymatic Saccharification and Fermentation with Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel*, 88(9):1602–1607.
- Nonaka, H., A. Kobayashi, und M. Funaoka
2013. Lignin Isolated from Steam-Exploded Eucalyptus Wood Chips by Phase Separation and its Affinity to *Trichoderma reesei* Cellulase. *Bioresource Technology*, 140:431–434.
- Northrop, D. B.
2002. Effects of High Pressure on Enzymatic Activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595(1-2):PII S0167–4838(01)00335–1.
- Obama, P., G. Ricochon, L. Muniglia, und N. Brosse
2012. Combination of Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Organosolv Pretreatments: Effect on Lignin Structures, Delignification Yields and Cellulose-to-Glucose Conversion. *Bioresource Technology*, 112:156–163.
- Ogola, H. J. O., N. Hashimoto, S. Miyabe, H. Ashida, T. Ishikawa, H. Shibata, und Y. Sawa
2010. Enhancement of Hydrogen Peroxide Stability of a Novel *Anabaena* sp. DyP-type Peroxidase by Site-Directed Mutagenesis of Methionine Residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5):1727–1736.
- Ogola, H. J. O., T. Kamiike, N. Hashimoto, H. Ashida, T. Ishikawa, H. Shibata, und Y. Sawa
2009. Molecular Characterization of a Novel Peroxidase from the *Cyanobacterium anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23):7509–7518.
- Ohgren, K., O. Bengtsson, M. F. Gorwa-Grauslund, M. Galbe, B. Hahn-Hagerdal, und G. Zacchi
2006. Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Glucose and Xylose in Steam-Pretreated Corn Stover at High Fiber Content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*, 126(4):488–498.

- Ohgren, K., J. Vehmaanpera, M. Siika-Aho, M. Galbe, L. Viikari, und G. Zacchi
2007. High Temperature Enzymatic Prehydrolysis Prior to Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam Pretreated Corn Stover for Ethanol Production. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4):607–613.
- Otte, J. und K. B. Qvist
1998. Cross-Linking of Whey Proteins by Enzymatic Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4):1326–1333.
- Pakarinen, A., J. Zhang, T. Brock, P. Maijala, und L. Viikari
2012. Enzymatic Accessibility of Fiber Hemp is Enhanced by Enzymatic or Chemical Removal of Pectin. *Bioresource Technology*, 107:275–281.
- Palmqvist, E. und B. Hahn-Hägerdal
2000. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. II: Inhibitors and Mechanisms of Inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1):25–33.
- Palmqvist, E., B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M. Larsson, K. Stenberg, Z. Szengyel, C. Tengborg, und G. Zacchi
1996. Design and Operation of a Bench-Scale Process Development Unit for the Production of Ethanol From Lignocellulosics. *Bioresource Technology*, 58(2):171–179.
- Panick, G., R. Malessa, R. Winter, G. Rapp, K. J. Frye, und C. A. Royer
1998. Structural Characterization of the Pressure-Denatured State and Unfolding/Refolding Kinetics of Staphylococcal Nuclease by Synchrotron Small-Angle X-Ray Scattering and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 275(2):389–402.
- Panneerselvam, A., R. R. Sharma-Shivappa, P. Kolar, D. A. Clare, und T. Ranney
2013a. Hydrolysis of Ozone Pretreated Energy Grasses for Optimal Fermentable Sugar Production. *Bioresource Technology*, 148:97–104.
- Panneerselvam, A., R. R. Sharma-Shivappa, P. Kolar, T. Ranney, und S. Peretti
2013b. Potential of Ozonolysis as a Pretreatment for Energy Grasses. *Bioresource Technology*, 148(0):242–248.
- Perez, J. und T. W. Jeffries
1990. Mineralization of C-14 Ring-Labeled Synthetic Lignin Correlates with the Production of Lignin Peroxidase, not of Manganese Peroxidase or Laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6):1806–1812.
- Pettersson, G. und J. Porath
1963. Studies on Cellulolytic Enzymes. 2. Multiplicity of Cellulolytic Enzymes of *Polyporus versicolor*. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 67(1):9–&.
- Plácido, J., T. Imam, und S. Capareda
2013. Evaluation of Ligninolytic Enzymes, Ultrasonication and Liquid Hot Water as Pretreatments for Bioethanol Production from Cotton Gin Trash. *Bioresource Technology*, 139:203–208.

- Pühse, M., R. T. Szweda, Y. Ma, C. Jeworrek, R. Winter, und H. Zorn
2009. *Marasmius scorodoni* Extracellular Dimeric Peroxidase - Exploring its Temperature and Pressure Stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1794(7):1091–1098.
- Purdy, R. E. und P. E. Kolattukudy
1973. Depolymerization of a Hydroxy Fatty-Acid Biopolymer, Cutin, by an Extracellular Enzyme from *Fusarium solani f. pisi* - Isolation and some Properties of Enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 159(1):61–69.
- Pye, E. K. und J. H. Lora
1991. The Alcell Process a Proven Alternative to Kraft Pulping. *Technical Association of the Pulp and Paper Industry journal*, 74(3):113–118.
- Qiu, H., Y. Li, G. Ji, G. Zhou, X. Huang, Y. Qu, und P. Gao
2009. Immobilization of Lignin Peroxidase on Nanoporous Gold: Enzymatic Properties and *in situ* Release of H₂O₂ by Co-Immobilized Glucose Oxidase. *Bioresource Technology*, 100(17):3837–3842.
- Ragauskas, A. J., C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, und T. Tschaplinski
2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 311(5760):484–489.
- Rahikainen, J. L., U. Moilanen, S. Nurmi-Rantala, A. Lappas, A. Koivula, L. Viikari, und K. Kruus
2013. Effect of Temperature on Lignin-Derived Inhibition Studied with three Structurally Different Cellobiohydrolases. *Bioresource Technology*, 146(0):118–125.
- Ranu, B. C., A. Sarkar, und R. Chakraborty
1994. Reduction of Azides with Zinc Borohydride. *Journal of Organic Chemistry*, 59(15):4114–4116.
- Reinhold, G. und A. Mumdey
2012. *Inhaltsstoffe von Biogassubstraten und Gärresten (Datenblätter)*. Jena: Thüringer Landesanstalt für Landwirtschaft.
- Ribeiro, F. W. P., M. F. Barroso, S. Morais, S. Viswanathan, P. d. Lima-Neto, A. N. Correia, Oliveira, Maria Beatriz Prior Pinto, und C. Delerue-Matos
2014. Simple Laccase-Based Biosensor for Formetanate Hydrochloride Quantification in Fruits. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 95:7–14.
- Rotman, D.
2008. The Price of Biofuels. *Technology Review*, 111(1):42–51.
- Rumbold, K., P. Biely, M. Mastihubova, M. Gudelj, G. Gubitz, K. H. Robra, und B. A. Prior
2003. Purification and Properties of a Feruloyl Esterase Involved in Lignocellulose Degradation by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9):5622–5626.

- Ryabova, O. B., O. M. Chmil, und A. A. Sibirny
2003. Xylose and Cellobiose Fermentation to Ethanol by the Thermotolerant Methy-
lotrophic Yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Research*, 4(2):157–164.
- Salvachua, D., A. Prieto, A. T. Martinez, und M. J. Martinez
2013. Characterization of a Novel Dye-Decolorizing Peroxidase (DyP)-Type Enzyme
from *Irpex lacteus* and Its Application in Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw.
Applied and Environmental Microbiology, 79(14):4316–4324.
- Sammons, R. J., D. P. Harper, N. Labbe, J. J. Bozell, T. Elder, und T. G. Rials
2013. Characterization of Organosolv Lignins using Thermal and FT-IR Spectroscopic
Analysis. *Bioresources*, 8(2):2752–2767.
- Santi Junior, C., A. M. F. Milagres, A. Ferraz, und W. Carvalho
2013. The Effects of Lignin Removal and Drying on the Porosity and Enzymatic
Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. *Cellulose*, 20(6):3165–3177.
- Sarkanen, S., D. C. Teller, J. Hall, und J. L. McCarthy
1981. Lignin. 18. Associative Effects among Organosolv Lignin Components. *Macro-
molecules*, 14(2):426–434.
- Scheibner, M., B. Hulsdau, K. Zelena, M. Nimtz, L. d. Boer, R. G. Berger, und H. Zorn
2008. Novel Peroxidases of *Marasmius scorodonius* Degrade β -Carotene. *Applied
Microbiology and Biotechnology*, 77(6):1241–1250.
- Schüttmann, I., H. Bouws, R. T. Szweda, M. Suckow, P. Czermak, und H. Zorn
2014. Induction, Characterization, and Heterologous Expression of a Carotenoid
Degrading Versatile Peroxidase from *Pleurotus sapidus*. *Journal of Molecular Catalysis
B: Enzymatic*, 103(0):79–84.
- Shi, A., H. Hu, F. Zheng, L. Long, und S. Ding
2015. Biochemical Characteristics of an Alkaline Pectate Lyase PelA from *Volvariella
volvacea*: Roles of the Highly Conserved N-Glycosylation Site in its Secretion and
Activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8):3447–3458.
- Shindler, J. S., R. E. Childs, und W. G. Bardsley
1976. Peroxidase from Human Cervical Mucus. *European Journal of Biochemistry /
FEBS*, 65(2):325–331.
- Shumaker, E. K. und W. L. Wendorff
1998. Factors Affecting Pink Discoloration in Annatto-colored Pasteurized Process
Cheese. *Journal of Food Science*, 63(5):828–831.
- Silva, J. L., D. Foguel, und C. A. Royer
2001. Pressure Provides New Insights into Protein Folding, Dynamics and Structure.
Trends in Biochemical Sciences, 26(10):612–618.
- Silva, J. L., E. W. Miles, und G. Weber
1986. Pressure Dissociation and Conformational Drift of the beta Dimer of Tryptophan
Synthase. *Biochemistry*, 25(19):5780–5786.

- Singh, A. K. und M. Mukhopadhyay
2012. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(2):486–520.
- Singh, M. K., J. Singh, M. Kumar, und I. S. Thakur
2014a. Novel Lipase from Basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, Produced by Solid State Fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 110:92–99.
- Singh, S., H. Harms, und D. Schlosser
2014b. Screening of Ecologically Diverse Fungi for their Potential to Pretreat Lignocellulosic Bioenergy Feedstock. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(7):3355–3370.
- Songulashvili, G., V. Elisashvili, S. P. Wasser, E. Nevo, und Y. Hadar
2007. Basidiomycetes Laccase and Manganese Peroxidase Activity in Submerged Fermentation of Food Industry Wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1-2):57–61.
- Songulashvili, G., V. Elisashvili, S. P. W. Wasser, E. Nevo, und Y. Hadar
2006. Laccase and Manganese Peroxidase Activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* Grown on Food Industry Wastes in Submerged Fermentation. *Biotechnology Letters*, 28(18):1425–1429.
- Spanikova, S. und P. Biely
2006. Glucuronoyl Esterase - Novel Carbohydrate Esterase Produced by *Schizophyllum commune*. *FEBS Letters*, 580(19):4597–4601.
- Sugano, Y.
2009. Dyp-Type Peroxidases Comprise a Novel Heme Peroxidase Family. *Cellular And Molecular Life Sciences*, 66(8):1387–1403.
- Sugano, Y., Y. Matsushima, und M. Shoda
2006. Complete Decolorization of the Anthraquinone Dye Reactive Blue 5 by the Concerted Action of Two Peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(4):862–871.
- Sun, F. und H. Chen
2008. Organosolv Pretreatment by Crude Glycerol from Oleochemicals Industry for Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw. *Bioresource Technology*, 99(13):5474–5479.
- Szweda, R., K. Schmidt, und H. Zorn
2013. Bleaching of Colored Whey and Milk by a Multiple-Enzyme System. *European Food Research and Technology*, 237(3):377–384.
- Tagger, S., C. Perissol, G. Gil, G. Vogt, und J. Le Petit
1998. Phenoloxidases of the White-Rot Fungus *Marasmius quercophilus* Isolated from an Evergreen Oak Litter (*Quercus ilex* L.). *Enzyme and Microbial Technology*, 23(6):372–379.
- Taherzadeh, M. und K. Karimi
2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9):1621–1651.

- Tavares, A. P. M., O. Rodriguez, M. Fernandez-Fernandez, A. Dominguez, D. Moldes, M. A. Sanroman, und E. A. Macedo
2013. Immobilization of Laccase on Modified Silica: Stabilization, Thermal Inactivation and Kinetic Behaviour in 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Ethylsulfate Ionic Liquid. *Bioresource Technology*, 131:405–412.
- Tedjo, W., M. N. Eshtiaghi, und D. Knorr
2000. Impact of Supercritical Carbon Dioxide and High Pressure on Lipoxygenase and Peroxidase Activity. *Journal of Food Science*, 65(8):1284–1287.
- Theorell, H. und A. C. Maehly
1950. Untersuchungen an Künstlichen Peroxydasen. *Acta Chemica Scandinavica*, 4(3):422–434.
- Tien, M. und K. T. Kirk
1984. Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* - Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-Requiring Oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 81(8):2280–2284.
- Tien, M., T. K. Kirk, C. Bull, und J. A. Fee
1986. Steady-State and Transient-State Kinetic Studies on the Oxidation of 3,4-Dimethoxybenzyl Alcohol Catalyzed by the Ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Journal of Biological Chemistry*, 261(4):1687–1693.
- Tirimanna, A. S. L.
1981. Study of the Carotenoid-Pigments of *Bixa-orellana* L. Seeds by Thin-Layer Chromatography. *Mikrochimica acta*, 2(1-2):11–16.
- Tissieres, A.
1949. Constitution and Properties of Laccase. *Nature*, 163(4143):480.
- Tiwari, R., S. Rana, S. Singh, A. Arora, R. Kaushik, V. V. Agrawal, A. K. Saxena, und L. Nain
2013. Biological Delignification of Paddy Straw and *Parthenium sp.* Using a Novel Micromycete *Myrothecium roridum* LG7 for Enhanced Saccharification. *Bioresource Technology*, 135:7–11.
- Torre, J. d. l., A. Moral, D. Hernandez, E. Cabeza, und A. Tijero
2013. Organosolv Lignin for Biofuel. *Industrial Crops and Products*, 45:58–63.
- UniProt
26.02.2008. Dye-Decolorizing Peroxidase MsP1 EC=1.11.1.19:
<http://www.uniprot.org/uniprot/b0bk71>: abgerufen am 25.05.2014.
- U.S. Food and Drug Administration
01.04.2014a. Code of Federal Regulation: 21CFR184.1157
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=184.1157>:
abgerufen am 11.05.2015.

- U.S. Food and Drug Administration
01.04.2014b. Code of Federal Regulation: 21CFR184.1366
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=184.1366>:
abgerufen am 11.05.2015.
- U.S. Food and Drug Administration
01.04.2014c. Code of Federal Regulations: 21CFR133.113
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=133.113>:
abgerufen am 11.05.2015.
- U.S. Food and Drug Administration
01.04.2014d. Code of Federal Regulations: 21CFR184.1245
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=184.1245>:
abgerufen am 11.05.2015.
- U.S. Food and Drug Administration
01.04.2014e. Code of Federal Regulations: 21CFR73.30
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=73.30>:
abgerufen am 11.05.2015.
- Uzcategui, E., A. Ruiz, R. Montesino, G. Johansson, und G. Pettersson
1991. The 1,4- β -D-Glucan Cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*.
1. A System of Synergistically Acting Enzymes Homologous to *Trichoderma reesei*.
Journal of Biotechnology, 19(2-3):271–285.
- Vafiadi, C., E. Topakas, P. Biely, und P. Christakopoulos
2009. Purification, Characterization and mass Spectrometric Sequencing of a Ther-
mophilic Glucuronoyl Esterase from *Sporotrichum thermophile*. *FEMS Microbiology*
Letters, 296(2):178–184.
- Valderrama, B., M. Ayala, und R. Vazquez-Duhalt
2002. Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More
Robust Enzymes. *Chemistry & Biology*, 9(5):555–565.
- Vasudevan, P. T. und L. O. Li
1996. Kinetics of Phenol Oxidation by Peroxidase. *Applied Biochemistry and Bio-*
technology, 60(3):203–215.
- Viikari, L., M. Alapuranen, T. Puranen, J. Vehmaanperä, und M. Siika-aho
2007. Thermostable Enzymes in Lignocellulose Hydrolysis. In *Biofuels*, L. Olsson,
ed., volume 108 of *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Pp. 121–145.
Springer Berlin Heidelberg.
- Vincken, J. P., G. Beldman, und A. G. Voragen
1994. The Effect of Xyloglucans on the Degradation of Cell-Wall-Embedded Cellulose
by the Combined Action of Cellobiohydrolase and Endoglucanases from *Trichoderma-*
viride. *Plant Physiology*, 104(1):99–107.
- Waché, Y., A. Bossier-De Ratuld, und J.-M. Belin
2001. Production of Aroma Compounds by Enzymatic Cooxidation of Carotenoids.

- In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, volume 802 of *ACS Symposium Series*, Pp. 102–113. American Chemical Society.
- Wang, F.-Q., H. Xie, W. Chen, E.-T. Wang, F.-G. Du, und A.-D. Song
2013. Biological Pretreatment of Corn Stover with Ligninolytic Enzyme for High Efficient Enzymatic Hydrolysis. *Bioresource Technology*, 144:572–578.
- Ward, G., P. A. Belinky, Y. Hadar, I. Bilkis, und C. G. Dosoretz
2002. The Influence of Non-Phenolic Mediators and Phenolic Co-Substrates on the Oxidation of 4-Bromophenol by Lignin Peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4):490–498.
- Wariishi, H., K. Valli, und M. H. Gold
1991. *In vitro* Depolymerization of Lignin by Manganese Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176(1):269–275.
- Weiland, P.
2010. Biogas Production: Current State and Perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4):849–860.
- Whiting, P. und D. A. I. Goring
1982. Chemical Characterization of Tissue Fractions from the Middle Lamella and Secondary Wall of Black Spruce Tracheids. *Wood Science and Technology*, 16(4):261–267.
- Wildschut, J., A. T. Smit, J. H. Reith, und W. J. J. Huijgen
2013. Ethanol-Based Organosolv Fractionation of Wheat Straw for the Production of Lignin and Enzymatically Digestible Cellulose. *Bioresource Technology*, 135:58–66.
- Willick, G. E. und V. L. Seligy
1985. Multiplicity in Cellulases of *Schizophyllum commune* - Derivation Partly from Heterogeneity in Transcription and Glycosylation. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 151(1):89–96.
- Wilson, A. W. und D. E. Desjardin
2005. Phylogenetic Relationships in the Gymnopoid and Marasmioid Fungi (Basidiomycetes, Euagarics Clade). *Mycologia*, 97(3):667–679.
- Winter, R., ed.
2003. *Advances in High Pressure Bioscience and Biotechnology II*. Springer Berlin Heidelberg.
- Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan, und J. N. Saddler
1988. Multiplicity of Beta-1,4-Xylanase in Microorganisms - Functions and Applications. *Microbiological Reviews*, 52(3):305–317.
- Wong, P. T. T. und D. J. Moffat
1989. A New Internal Pressure Calibrant for High-Pressure Infrared Spectroscopy of Aqueous Systems. *Applied Spectroscopy*, 43(7):1279–1281.

- Xu, C., F. Ma, und X. Zhang
2009. Lignocellulose Degradation and Enzyme Production by *Irpeax lacteus* CD2 During Solid-State Fermentation of Corn Stover. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(5):372–375.
- Yamanaka, R., C. F. Soares, D. R. Matheus, und K. M. G. Machado
2008. Lignolytic Enzymes Produced by *Trametes villosa* CCB176 under Different Culture Conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1):78–84.
- Yehia, R. S.
2014. Aflatoxin Detoxification by Manganese Peroxidase Purified from *Pleurotus ostreatus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1):127–133.
- Yoon, J., B. D. Liboiron, R. Sarangi, K. O. Hodgson, B. Hedman, und E. I. Solomona
2007. The two Oxidized Forms of the Trinuclear Cu Cluster in the Multicopper Oxidases and Mechanism for the Decay of the Native Intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34):13609–13614.
- Yu, Q., X. Zhuang, Z. Yuan, W. Qi, W. Wang, Q. Wang, und X. Tan
2013. Pretreatment of Sugarcane Bagasse with Liquid Hot Water and Aqueous Ammonia. *Bioresource Technology*, 144:210–215.
- Zelena, K., B. Hardebusch, B. Hüllsdau, R. G. Berger, und H. Zorn
2009. Generation of Norisoprenoid Flavors from Carotenoids by Fungal Peroxidases: Journal of Agricultural and Food Chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21):9951–9955.
- Zeng, G.-M., M.-H. Zhao, D.-L. Huang, C. Lai, C. Huang, Z. Wei, P. Xu, N.-J. Li, C. Zhang, F.-L. Li, und M. Cheng
2013. Purification and Biochemical Characterization of two Extracellular Peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium* Responsible for Lignin Biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85:166–172.
- Zeng, Y., S. Zhao, S. Yang, und S.-Y. Ding
2014. Lignin Plays a Negative Role in the Biochemical Process for Producing Lignocellulosic Biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 27:38–45.
- Zhai, R., B. Zhang, Y. Wan, C. Li, J. Wang, und J. Liu
2013. Chitosan-Halloysite Hybrid-Nanotubes: Horseradish Peroxidase Immobilization and Applications in Phenol Removal. *Chemical Engineering Journal*, 214:304–309.
- Zhang, M., R. Su, W. Qi, und Z. He
2010. Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulose by Optimizing Enzyme Complexes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(5):1407–1414.
- Zhang, Y., M. A. Fraatz, F. Horlamus, H. Quitmann, und H. Zorn
2014a. Identification of Potent Odorants in a Novel Nonalcoholic Beverage Produced by Fermentation of Wort with Shiitake (*Lentinula edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18):4195–4203.

- Zhang, Y., Q. Wang, X. Fan, und J. Yuan
2014b. Structural Changes of Lignin in the Jute Fiber Treated by Laccase and Mediator System. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 101:133–136.
- Zhao, W., Y. Fang, Q. Zhu, K. Wang, M. Liu, X. Huang, und J. Shen
2013. A Novel Glucose Biosensor Based on Phosphonic Acid-Functionalized Silica Nanoparticles for Sensitive Detection of Glucose in Real Samples. *Electrochimica Acta*, 89:278–283.
- Zhao, X., K. Cheng, und D. Liu
2009. Organosolv Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Enzymatic Hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(5):815–827.
- Zhou, Y. und L.-T. Lim
2009. Activation of Lactoperoxidase System in Milk by Glucose Oxidase Immobilized in Electrospun Polylactide Microfibers. *Journal of Food Science*, 74(2):C170–C176.
- Zhu, D. und S. Damodaran
2012. Short Communication: Annatto in Cheddar Cheese-Derived Whey Protein Concentrate is Primarily Associated with Milk Fat Globule Membrane. *Journal of Dairy Science*, 95(2):614–617.
- Zhu, J. und G. Sun
2012. Lipase Immobilization on Glutaraldehyde-Activated Nanofibrous Membranes for Improved Enzyme Stabilities and Activities. *Reactive & Functional Polymers*, 72(11):839–845.
- Zilliox, C. und P. Debeire
1998. Hydrolysis of Wheat Straw by a Thermostable Endoxylanase: Adsorption and Kinetic Studies. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(1):58–63.
- Zorn, H., S. Langhoff, M. Scheibner, und R. G. Berger
2003. Cleavage of β,β -Carotene to Flavor Compounds by Fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(4):331–336.
- Zorn, H., T. Peters, M. Nimtz, und R. G. Berger
2005. The Secretome of *Pleurotus sapidus*. *Proteomics*, 5(18):4832–4838.
- Zorn, H., M. Scheibner, B. Huelsdau, R. G. Berger, D. L. Boer, und R. B. Meima
18. Jan. 2007. Novel Enzymes for Use in Enzymatic Bleaching of Food Products: PCT/EP2006/064132 eingetragen am 12. Juli 2006. (WO2007006792 A1).
- Zorn, H., R. T. Szweda, J. Wilms, und M. Kumar
29. Juni 2011. Method for Modifying Non-Starch Carbohydrate Material: PCT/EP2009/058871 eingetragen am 10. Juli 2009. (CN102112620 A).
- Zubieta, C., R. Joseph, S. S. Krishna, D. McMullan, M. Kapoor, H. L. Axelrod, M. D. Miller, P. Abdubek, C. Acosta, T. Astakhova, D. Carlton, H. J. Chiu, T. Clayton, M. C. Deller, L. Duan, Y. Elias, M. A. Elsliger, J. Feuerhelm, S. K. Grzechnik, J. Hale, G. W. Han, L. Jaroszewski, K. K. Jin, H. E. Klock, M. W. Knuth, P. Kozbial, A. Kumar, D. Marciano, A. T. Morse, K. D. Murphy, E. Nigoghossian, L. Okach,

- S. Oommachen, R. Reyes, C. L. Rife, P. Schimmel, C. V. Trout, H. van den Bedem, D. Weekes, A. White, Q. P. Xu, K. O. Hodgson, J. Wooley, Am Deacon, A. Godzik, S. A. Lesley, und I. A. Wilson
2007. Identification and Structural Characterization of Heme Binding in a Novel Dye-Decolorizing Peroxidase, TyrA. *Proteins*, 69:234–243.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aus dem β,β -Carotinabbau mittels MsP1 entstandene Norisoprenoide. 1: β -Ionon, 2: β -Ionon-5,6-Epoxid, 3: Dihydroactinidiolid, 4: β -Cyclocitral, 5: 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon (Zelena et al., 2009).	2
1.2	Die in Holz vorhandenen Polymere sind das schwer abzubauenende Lignin, Hemicellulose und Cellulose, modifiziert nach (Hori et al., 2014).	4
1.3	a) Die drei Monolignole des Holzes. b) Darstellung einer Koniferentracheide. <i>p</i> -Coumarylalkohol ist vorrangig in der Mittellamelle und Coniferylalkohol in der Sekundärwand der Zelle eingebaut, modifiziert nach (Lewin, 1991, S. 44) und (Whiting und Goring, 1982).	5
1.4	Ligninstruktur von Gymnospermen, modifiziert nach (Chen und Sarkanen, 2003)	6
3.1	Proteinkonzentration in Kulturüberständen der Hauptkulturen. Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B	39
3.2	Cellulaseaktivitäten in Kulturüberständen der Hauptkulturen. Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B	40
3.3	Xylanaseaktivitäten in Kulturüberständen der Hauptkulturen. Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B	40
3.4	Laccaseaktivität in Kulturüberständen der Hauptkulturen. Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B	41
3.5	Peroxidaseaktivität (gemessen mit β,β -Carotin/ H_2O_2) in Kulturüberständen der Hauptkulturen. Hellgrau: Kultur A, dunkelgrau: Kultur B	41
3.6	Proteinkonzentration gemessen nach Bradford. Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2, dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2, dunkelorange: m1, hellorange: m2	42
3.7	Phenolgehalt des Kulturmediums. Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2, dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2, dunkelorange: m1, hellorange: m2	43
3.8	Glucosekonzentration in den Kulturmedien. Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2, dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2, dunkelorange: m1, hellorange: m2	43
3.9	Laccaseaktivität (gemessen mit ABTS) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh. Dunkelblau:g0, blau: g1, hellblau: g2	44
3.10	Laccaseaktivität (gemessen mit ABTS) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh. Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2	44
3.11	Laccaseaktivität (gemessen mit ABTS) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage. Dunkelorange: m1, hellorange: m2	45
3.12	Peroxidaseaktivität (gemessen mit ABTS/ H_2O_2) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh. Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2	46
3.13	Peroxidaseaktivität (gemessen mit ABTS/ H_2O_2) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh. Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2	46

3.14	Peroxidaseaktivität (gemessen mit ABTS/H ₂ O ₂) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage. Dunkelorange: m1, hellorange: m2	47
3.15	Peroxidaseaktivität (gemessen mit β,β -Carotin/H ₂ O ₂) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh. Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2	47
3.16	Peroxidaseaktivität (gemessen mit β,β -Carotin/H ₂ O ₂) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh. Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2	48
3.17	Peroxidaseaktivität (gemessen mit β,β -Carotin/H ₂ O ₂) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage. Dunkelorange: m1, hellorange: m2	48
3.18	Mn-Peroxidaseaktivität (gemessen mit Syringol/H ₂ O ₂ /Mn) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh. Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2	49
3.19	Mn-Peroxidaseaktivität (gemessen mit Syringol/H ₂ O ₂ /Mn) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh. Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2	49
3.20	Mn-Peroxidaseaktivität (gemessen mit Syringol/H ₂ O ₂ /Mn) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage. Dunkelorange: m1, hellorange: m2	50
3.21	Esteraseaktivität (gemessen mit <i>p</i> -Nitrophenylacetat) in den Kulturen mit gewaschenem Stroh. Dunkelblau: g0, blau: g1, hellblau: g2	50
3.22	Esteraseaktivität (gemessen mit <i>p</i> -Nitrophenylacetat) in den Kulturen mit ungewaschenem Stroh. Dunkelgrün: u0, grün: u1, hellgrün: u2	51
3.23	Esteraseaktivität (gemessen mit <i>p</i> -Nitrophenylacetat) in den Kulturen mit Rückständen aus einer Biogasanlage. Dunkelorange: m1, hellorange: m2	51
3.24	Änderung der Partikeldurchmesser in Abhängigkeit der Inkubationszeit in den Nullproben 1 (A) und 2 (B) und der Probe 3 (C). Blau: 0 h; orange: 7 h; olivgrün: 23 h; pink: 29 h; braun (Strichpunktlinie): 46 h; hellblau: 6,5 d; hellgrün: 10 d	53
3.25	Nullprobe 1 ohne MsP1 nach 10 Tagen Inkubation und Zugabe von 0,3 mmol H ₂ O ₂	54
3.26	Nullprobe 2 mit inaktivem MsP1 nach 10 Tagen Inkubation und Zugabe von 0,3 mmol H ₂ O ₂	55
3.27	Probe 4 mit 250 U _{ABTS} MsP1 nach 7 Stunden Inkubation und Zugabe von 0,8 mmol H ₂ O ₂	55
3.28	Probe 4 mit 250 U _{ABTS} MsP1 nach 6 Tage Inkubation und Zugabe von 1,6 mmol H ₂ O ₂	56
3.29	Probe 3 mit 1000 U _{ABTS} MsP1 nach 23 Stunden Inkubation und Zugabe von 1,9 mmol H ₂ O ₂	56
3.30	Probe 3 mit 1000 U _{ABTS} MsP1 nach 10 Tagen Inkubation und Zugabe von 3,8 mmol H ₂ O ₂	57
3.31	Filtrerrückstand der Filtration von organosolv Lignin nach Inkubation mit MsP1 und H ₂ O ₂ . Links Probe mit aktivem MsP1, rechts Probe mit inaktivem MsP1	58
3.32	Elektromikroskopische Aufnahmen von organosolv Lignin bei verschiedenen Vergrößerungen. Links: inaktives MsP1, rechts: aktives MsP1	59

3.33	Vergleich der entstandenen Glucosemenge aus dem Strohabbau mittels Cellulase (nach rechnerischem Abzug der zugegebenen Glucosemenge). 1: Probe mit vorheriger Glucosezugabe, 2. ohne Glucosezugabe	60
3.34	Kinetik der Cellulase GC220 in Abhängigkeit der H_2O_2 -Konzentration. Raute: ohne H_2O_2 ; Viereck: mit $0,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$	60
3.35	Entstandene Glucose als Gewichtsprozent bezogen auf die Stroheinwaage. Schwarz: 0 h; dunkelgrau: 3,5 h; mittelgrau: 22 h; hellgrau: 48 h; schraffiert: 5 d	61
3.36	Prozentuale Abnahme der H_2O_2 -Konzentration bei Stroh als Substrat von MsP1. Dunkelgrau: 24,02 mg Stroh; mittelgrau: 45,81 mg Stroh; hellgrau: 78,92 mg Stroh	61
3.37	Entstandene Glucose aus Maisstroh als Gewichtsprozent des eingesetzten trockenen Strohs. (+): mit MsP1/ H_2O_2 vorbehandeltes Stroh; (-): mit MsP1 ohne H_2O_2 vorbehandeltes Stroh. 1: Hydrolyse des behandelten Strohs mit Cellulase. 2: Hydrolyse des behandelten Strohs mit Cellulase/Pectinase	62
3.38	Aufgetragen sind die Glucosemengen nach Hydrolyse von Maisstroh mit Cellulase und Xylanase in Prozent bezogen auf die Einwaage von trockenem Stroh. A: Stroh vorbehandelt mit MsP1/ H_2O_2 , B: Stroh vorbehandelt mit MsP1 ohne H_2O_2	63
3.39	(a) Entfaltetes und gefittetes Amid-I'-FT-IR-Spektrum von MsP1 bei 10°C . (b) Zweite Ableitung des Amid-I'-FT-IR-Spektrums von MsP1 bei 10°C	64
3.40	Temperaturabhängigkeit der relativen IR-Flächenanteile der Amid-I'-Teilbanden von MsP1. Quadrat: Zufallsknäuel; Dreieck: α -Helices; Punkt: Schleifen; leeres Quadrat: intramolekulare β -Faltblätter; offenes Dreieck: intermolekulare β -Faltblätter.	65
3.41	Druckabhängigkeit der Sekundärstrukturelemente von MsP1 bei 60°C . Quadrat: Zufallsknäuel; Dreieck: α -Helices; Punkt: Schleifen; leeres Quadrat: intramolekulare β -Faltblätter; offenes Dreieck: intermolekulare β -Faltblätter.	66
3.42	Temperaturabhängigkeit der Wärmekapazität einer MsP1-Lösung . . .	66
3.43	Temperaturabhängigkeit des spektralen Schwerpunktes der Trp-Fluoreszenz.	67
3.44	Druckabhängigkeit des spektralen Schwerpunktes der Trp-Fluoreszenz bei 30°C	68
3.45	Temperaturabhängigkeit der MsP1-Aktivität bei der Oxidation von ABTS	68
3.46	Druckabhängigkeit der MsP1-Aktivität bei der Oxidation von ABTS (hellgrau) und β,β -Carotin (dunkelgrau)	69
3.47	MsP1-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes und des verwendeten Puffers. Viereck: Glycinpuffer; Raute: Acetatpuffer	69
3.48	Vergleich der Aktivitäten im ABTS/ H_2O_2 -Assay von MsP1 in den verschiedenen Lösungsmitteln. Dunkelgrau: Dioxan/1,2 % PEG; schraffiert: Aceton/1,2 % PEG; grau: Ethanol/1,2 % PEG; gepunktet: Dioxan; hellgrau: Aceton; kariert: Ethanol (100 %: Aktivität in $0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaAc}$ -Puffer, pH 3,5).	70

3.49	Lagerungsstabilität von MsP1 in verschiedenen Lösungsmitteln (25%ig in Wasser). Dunkelgrau: Wasser; mittelgrau: Dioxan; schraffiert: Aceton; hellgrau: Ethanol. Die prozentuale Aktivität ist bezogen auf die Startaktivität der MsP1-Lösungen (100%).	71
3.50	MsP1 Aktivität gegenüber ABTS in Abhängigkeit der H ₂ O ₂ -Konzentration. ABTS-Konzentrationen: Dreieck: 0,15 mmol L ⁻¹ ; Viereck: 0,2 mmol L ⁻¹ ; Punkt: 0,5 mmol L ⁻¹	72
3.51	MsP1-Aktivität in Abhängigkeit der H ₂ O ₂ - und ABTS-Konzentration. Der Test wurde bei verschiedenen Mischungsverhältnissen von H ₂ O ₂ zu ABTS durchgeführt. Raute: 1:4; Viereck: 1:2; Dreieck: 1:1; X: 2:1; Stern: 4:1; Punkt: 10:1.	72
3.52	MsP1-Aktivität in Abhängigkeit der H ₂ O ₂ -Konzentration und ABTS-Konzentration. A: [H ₂ O ₂]/[ABTS]=1:2; B: [H ₂ O ₂]/[ABTS]=10:1. Reaktionsgeschwindigkeit gemessen in folgenden Zeitabschnitten: Raute: 0 bis 8 min, Viereck: 8 bis 15 min, Dreieck: 15 bis 25 min.	73
3.53	SDS-PAGE der Fraktionen aus der Ammoniumsulfat-Fällung von MsP1. 1: Originalprobe MsP1 (1:400); 2: Sediment 45 % Fällung (1:30); 3: Überstand 70 % Fällung (1:10); 4: Sediment 70 % Fällung MsP1 (1:300)	74
3.54	Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie von MsP1 nach der Ammoniumsulfatfällung. Raute: Extinktion bei 280 nm; Dreieck: Aktivität; Viereck: spezifische Aktivität; X: Reinheitszahl	75
3.55	SDS-PAGE der Fraktionen aus der Größenausschlusschromatographie zu Reinigung von MsP1. 1: Fraktion 27; 2: Fraktion 28; 3: Fraktion 29 (1:2); 4: Fraktion 30 (1:3); 5: Fraktion 31 (1:4); 6: Fraktion 32 (1:7); 7: Fraktion 33 (1:10); 8: Fraktion 34 (1:10); 9: 70S, gefälltes MsP1(1:400); 10: original MsP1-Probe (1:400)	75
3.56	Kinetik von MsP1 (Fraktion 28) mit ABTS als Substrat mit einer H ₂ O ₂ -Konzentration von 0,5 mol L ⁻¹ . Punkt: Verdünnung I; Dreieck; Verdünnung II	77
3.57	Kinetik von MsP1 (Fraktion 28) mit β,β -Carotin als Substrat mit einer H ₂ O ₂ -Konzentration von 0,5 mol L ⁻¹ . Punkt: Verdünnung I; Dreieck; Verdünnung II	77
3.58	Auftragung der Extinktion bei der Reaktion von MsP1 mit Ferulasäureethylester, gemessen bei drei verschiedenen Wellenlängen. Raute: 212 nm; Viereck: 244 nm; Dreieck: 322 nm	79
3.59	UV/VIS-Spektrum der Proben 1 und 4 (blau), 2 und 5 (rot) und 3 und 6 (grün) vor Zugabe der Enzyme.	80
3.60	UV/VIS-Spektrum der Proben 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün) 5 min nach Zugabe von Laccase.	80
3.61	UV/VIS-Spektrum der Proben 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün) 40 min nach Zugabe von Laccase.	81
3.62	UV/VIS-Spektrum der Proben 1 (blau), 2 (rot) und 3 (grün) 20 h nach Zugabe von Laccase.	81
3.63	UV/VIS-Spektrum der Proben 4 (blau), 5 (rot) und 6 (grün) 10 min nach Zugabe von MsP1.	82
3.64	UV/VIS-Spektrum der Proben 4 (blau), 5 (rot) und 6 (grün) 135 min nach Zugabe von MsP1.	82

3.65	UV/VIS-Spektrum der Proben 4 (blau), 5 (rot) und 6 (grün) 20 h nach Zugabe von MsP1.	83
3.66	β,β -Carotinabbau mit nicht gereinigtem MsP1 (MsP1D) (rot) und gereinigtem MsP1 (MsP1S) (grün). Zugabe von Coniferylalkohol bei 155 s. .	83
3.67	Abbau von β,β -Carotin mittels MsP1/H ₂ O ₂ bei verschiedenen Coniferylalkohol-Konzentrationen. rot: 0,04 mmol l ⁻¹ ; grün: 0,02 mmol l ⁻¹ ; blau: 0,01 mmol l ⁻¹ ; schwarz: 0,004 mmol l ⁻¹ ; grau: 0,002 mmol l ⁻¹ ; rosa: 0 mmol l ⁻¹ ;	85
3.68	Aktivitätsänderung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit verschiedener Mediatoren und Mediatorkonzentrationen. Raute: Coniferylalkohol; Viereck: 4-Ethylphenol; Dreieck: Ferulasäureethylester; X: <i>p</i> -Coumarsäure	86
3.69	Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der <i>p</i> -Coumarsäure- (X) und 4-Ethylphenolkonzentration (Viereck)	87
3.70	Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der Coniferylalkoholkonzentration	87
3.71	Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der Ferulasäureethylesterkonzentration	88
3.72	Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der 4-Ethylphenolkonzentration	88
3.73	Aktivitätssteigerung von MsP1 beim β,β -Carotinabbau in Abhängigkeit von der <i>p</i> -Coumarsäurekonzentration	89
3.74	Lineweaver-Burk-Diagramm der MsP1-Kinetiken des β,β -Carotinabbaus mit und ohne Mediator. Punkt: ohne Mediator; Dreieck: Ferulasäureethylester; Raute: Coniferylalkohol	90
3.75	MsP1-Aktivität in % der Ausgangsaktivität in den Überständen bei der Immobilisierung von MsP1 auf Kieselgel. Schwarz: Gesamtverlust in allen Überständen, kariert: Überstand 1, schraffiert: Überstand 2, gepunktet: Überstand 3, grau: Überstand 4, hellgrau: Überstand 5	92
3.76	Proteinmenge in % der Ausgangsproteinmenge der MsP1-Lösung in den Überständen der Immobilisierung von MsP1 auf Kieselgel. Schwarz: Summe von Überstand 1-5 der jeweiligen Probe, kariert: Überstand 1, schraffiert: Überstand 2, gepunktet: Überstand 3, grau: Überstand 4, hellgrau: Überstand 5	92
3.77	Messung der Aktivität mittels ABTS-Assay des immobilisierten MsP1. Viereck: Probe 1, Dreieck: Probe 2, Kreuz: Probe 3, offenes Viereck: Probe 4, Kreis: Probe 5. Probenbezeichnung aus Tabelle 3.12	93
3.78	Aktivität von auf Kieselgel immobilisiertem MsP1 in Abhängigkeit der Einsatzzyklen Schwarz: Probe 2; grau: Probe 4	94
3.79	Visualisierung der Bleichung von mit β,β -Carotin gefärbter Milch mit Hilfe des 3-Enzym-Systems (MsP1 (5 mU mL ⁻¹), GOX (2,3 mU mL ⁻¹) und saurer Lactase (1 mU mL ⁻¹) im CIELab-System. Links: gefärbte Milch; mittig: ungefärbte Milch; rechts: gebleichte Milch.	95

3.80	Bleichung von mit β,β -Carotin gefärbter Molke mit MsP1 ($3,6 \text{ mU mL}^{-1}$) bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen. offene Raute: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$; schwarzes Rechteck: $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$; offenes Dreieck: $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$; offenes Rechteck: $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$; offener Kreis: $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$; schwarzes Dreieck: $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$; schwarze Raute: $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$; schwarzer Kreis: 1 mmol L^{-1} ; X: 2 mmol L^{-1}	96
3.81	Bleichung von mit β,β -Carotin gefärbter Molke mit Hilfe des 2-Enzym-Systems. graue Linie: Süßmolke; schwarze Linie: Sauermolke mit 5 mU mL^{-1} MsP1, $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX; Strich-Punkt-Linie: Negativkontrolle mit hitzeinaktiviertem MsP1 und $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX	97
3.82	Bleichung von mit Annatto gefärbter Süßmolke. graue Linie: mit 18 mU mL^{-1} MsP1, $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX; schwarze Linie; $3,6 \text{ mU mL}^{-1}$ MsP1, $2,3 \text{ mU mL}^{-1}$ GOX; Strich-Punkt-Linie: Negativkontrolle	97
3.83	Bleichung von mit β,β -Carotin gefärbter Milch mit dem 3-Enzym-System. Der Enzymmix beinhaltet MsP1 (5 mU mL^{-1}), GOX ($2,3 \text{ mU mL}^{-1}$) und saure Lactase (1 mU mL^{-1}) (schwarze Linie). Die Negativkontrolle beinhaltet keine saure Lactase (Strich-Punkt-Linie).	98
4.1	Stufen des Biogassyntheseweges nach (Weiland, 2010)	100
4.2	Ligninabbauprodukte, die von Laccase aus <i>M. quercophilus</i> transformiert werden. 1: Vanillylalkohol (4-Hydroxy-3-methoxybenzylalkohol), 2: Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure), 3: Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd), 4: Coumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure), 5: p-Coumarylalkohol (4-Hydroxy-Zimtalkohol), 6: Synapinsäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure), 7: Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure), 8: Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure), 9: Coniferylalkohol (4-Hydroxy-3-methoxyzimtalkohol). Nach (Tagger et al., 1998)	103
4.3	Esterbindung zwischen MeGlcA-Resten von Glucuronoxylan und den aromatischen Alkoholen des Lignins. * Angriffsort der Glucuronylesterasen. Nach (Spanikova und Biely, 2006).	107
4.4	Einige in Lignin vorkommende Bindungen. β -O-4'-Bindungen werden im Organosolv-Verfahren gespalten, β -5'- und β - β' -Bindungen dagegen nicht. Nach (Hallac et al., 2010).	109
4.5	Schematische Darstellung der vier Oxidationszustände der LiP und deren Zusammenhänge, wobei (S) das Substrat und ($\text{S}\bullet^+$) das Substratradikal ist. Modifiziert nach (Adediran, 1996)	120
4.6	Für die Erhöhung der Aktivität von MsP1 gegenüber β,β -Carotin eingesetzte Mediatoren: A: Coniferylalkohol; B: 4-Ethylphenol; C: Ferulasäureethylester; D: p-Coumarsäure	123
4.7	Schematische Darstellung der Immobilisierung von MsP1 an eine mit Aminofunktion modifizierte Kieselgeloberfläche. Die Kupplung wird über Glutaraldehyd realisiert und über eine Reduktion mit Natriumborhydrid stabilisiert. Modifiziert nach (Hanefeld et al., 2009).	128
4.8	Reaktionsschema des Drei-Enzym-Systems zur Bleichung von Molke und Milch.	131