

**Biochemische und molekularbiologische Studien zum  
Melaninabbau mittels versatiler Peroxidase aus *Irpex consors***

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

*doctor rerum naturalium*

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

**Maria Weiß geb. Förstner**

2017

Dekan: Prof. Dr. V. Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Zorn

Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie

Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Friedhoff

Institut für Biochemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Thesis selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Thesis angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß § 25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmungen für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Überprüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

---

Datum

---

Unterschrift

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten sieben Basidiomyceten identifiziert werden, welche in der Lage waren, Melanin in Agarplatten abzubauen. Der Basidiomycet mit der höchsten Peroxidaseaktivität, *Irpex consors*, wurde ausgewählt und in weiteren Studien untersucht. Durch Submerskultivierung von *Irpex consors* wurde Kulturüberstand gewonnen, welcher mehreren Reinigungsschritten unterzogen wurde. Nach Ammoniumsulfatfällung, Filtrierschritten und zweistufiger FPLC-Reinigung mit einem schwachen Anionentauscher sowie mit Größenausschlusschromatographie konnte das Zielenzym isoliert werden. Die molekulare Masse wurde mittels denaturierender SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung zu 47 kDa ermittelt. Der isoelektrische Punkt wurde mittels isoelektrischer Fokussierung mit nachfolgender Coomassie- und ABTS-Aktivitätsfärbung zu 3,5 bestimmt. In den Untersuchungen zur Enzymcharakterisierung wurde ein pH-Optimum von 3,6, eine optimale Umsetzungstemperatur von 50 °C, sowie eine optimale Wasserstoffperoxidkonzentration von 35 µM bestimmt. Durch tryptischen Verdau und anschließende MALDI-TOF-MS/MS wurde das Enzym identifiziert. Es wurde als eine beim Ligninabbau durch Imami *et al.* (2015) bereits untersuchte versatile Peroxidase identifiziert. Der N-Terminus der publizierten Aminosäuresequenz wurde mittels Edman-Abbau verifiziert.

Die Peroxidaseaktivität im Kulturüberstand von *Irpex consors* wurde mit verschiedenen Substraten wie Melanin, der Calcium-Sulfitablauge BretaxCl, Vanillin, Oxalsäure, Gallussäure, Dimethoxyphenol, Veratrylalkohol und Ferulasäure induziert. Die Induktion der Peroxidaseproduktion durch das Substrat Melanin wurde auf molekularbiologischer Ebene durch RT-*q*PCR über Berechnung anhand dreier Referenzgene nachgewiesen.

Ein 2-Enzym-System wurde etabliert, bei welchem Wasserstoffperoxid kontinuierlich *in-situ* durch eine Glucoseoxidase produziert wurde. Die Parameter des 2-Enzym-Systems wurden optimiert und erfolgreich auf Melaninabbau in einem Modellsystem übertragen. Durch dieses 2-Enzym-System wurde Melanin deutlich effektiver abgebaut als durch Zugabe von Wasserstoffperoxid.

Die Analyse des Substratspektrums der versatilen Peroxidase erfolgte mit den natürlichen Farbstoffen Bixin, Indigokarmin, Curcumin und  $\beta$ -Carotin, welche von der versatilen Peroxidase erfolgreich umgesetzt wurden. Die flüchtigen, aromarelevanten Abbauprodukte von  $\beta$ -Carotin wurden mittels *head-space solid phase micro extraction* (HS-SPME) sowie mittels *stir bar sorptive extraction* (SBSE) extrahiert und anschließend gaschromatographisch-massenspektrometrisch untersucht. Dabei wurden die Abbauprodukte  $\beta$ -Ionon,  $\beta$ -Cyclocitral, 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon und Dihydroactinidiolid identifiziert. Quantifizierungen der Abbauprodukte  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral erfolgten durch Ermittlung des Responsefaktors des verwendeten internen Standards Thymol.

## Abstract

In this study seven basidiomycetes were identified, which were capable of degrading melanin in solid-state fermentation. Due to the high activities in peroxidase assays, the basidiomycete *Irpex consors* was chosen for further analysis. The supernatant of *Irpex consors* was treated by various clean-up steps. After ammonium sulfate precipitation, filtration and a two-step fast protein liquid chromatography comprising weak anion exchange and size exclusion, the pure enzyme was isolated.

The molecular mass was determined via SDS-PAGE and Coomassie-staining and was determined to be 47 kDa. The isoelectric point was determined by isoelectric focusing with subsequent staining by either Coomassie or ABTS-activity-staining and was found to be 3,5.

The isolated peroxidase showed a pH-optimum of pH 3,6 as well as a temperature-optimum of 50 °C. The concentration of hydrogen peroxide was best at 35 µM.

By tryptic digestion with subsequent MALDI-TOF-MS/MS analysis, the enzyme was identified as a versatile peroxidase, which had previously been studied in a project on lignin-degradation (Imami *et al.* 2015). The N-terminus of the previously published amino acid sequence of this versatile peroxidase was confirmed by Edman-sequencing.

The peroxidase activity in the culture supernatant was enhanced significantly by addition of numerous substrates like melanin, vanillin, oxalic acid, gallic acid or ferulic acid.

The induction of peroxidase activity by melanin was studied on a molecular basis. By calculation with three reference genes, the enhanced expression of the mRNA encoding the versatile peroxidase by cultivation with melanin could be proven by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-*q*PCR).

A 2-enzyme-system was successfully established, where the essential hydrogen peroxide was produced *in-situ* by a glucose oxidase. The parameters of this system were optimized which then was used for melanin bleaching. It was shown that the degradation of melanin via the 2-enzyme-system was successful and significantly more efficient than directly adding hydrogen peroxide.

To study the degradation of other possible substrates, the versatile peroxidase was screened for its bleaching potential of the natural dyes bixin, curcumin, indigo carmine and  $\beta$ -carotene. All substrates were bleached successfully. The volatile degradation products of  $\beta$ -carotene were extracted by *head-space solid phase micro extraction* (HS-SPME) and *stir bar sorptive extraction* (SBSE) and subsequently analysed by gas chromatography coupled to mass-spectrometry. Four degradation products were identified:  $\beta$ -ionone,  $\beta$ -cyclocitral, 5,6-epoxy- $\beta$ -ionone and dihydroactinidiolide.

Quantitation was carried out by using the internal standard thymol. After determination of the response factors by construction of an external calibration curve, the degradation products  $\beta$ -ionone and  $\beta$ -cyclocitral were quantified.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Melanin – Struktur, Entstehung und Abbaumöglichkeiten .....	1
1.2	Zielsetzung .....	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1	Enzyme .....	10
2.2	Mikroorganismen.....	11
2.3	Molekularbiologische Materialien .....	13
2.3.1	Größenstandards .....	13
2.3.2	Kits .....	13
2.3.3	Oligonucleotide .....	14
2.4	Chemikalien .....	15
2.4.1	Referenzverbindungen und Substrate.....	15
2.4.2	Chemikalien und Lösungsmittel .....	16
2.4.3	Gase .....	18
2.5	Geräte .....	19
2.5.1	Fast Protein Liquid Chromatographie.....	19
2.5.1.1	Fast Protein Liquid Chromatographen.....	19
2.5.1.2	Verwendete Säulen .....	19
2.5.2	Gaschromatographen .....	20
2.5.2.1	HS-SPME-GC-MS .....	20
2.5.2.2	SBSE-TDU-CIS-GC-MS .....	20
2.5.2.3	Verwendete Säule und Zubehör .....	21
2.5.3	Geräte .....	21
2.6	Bioinformatiksoftware und Datenbanken .....	25
2.7	Kultivierung von Basidiomyceten .....	26
2.7.1	MEP-Medium .....	26
2.7.2	MEP-Agar .....	26
2.7.3	Hauptkultur-Medium mit Melanin.....	26
2.7.3.1	Melaninlösung mit synthetischem Melanin von Sigma-Aldrich .....	27
2.7.3.2	Melaninlösung mit synthetischem Melanin aus L-Dopa .....	27
2.7.4	Melanin-Agar.....	28
2.7.5	Hauptkultur-Medium mit Sulfitablauge BretaxCl.....	28
2.7.6	Weitere Hauptkulturmedien.....	29
2.7.7	Spurenelementlösung .....	30
2.7.8	Stammhaltung.....	30
2.7.9	Vorkultur.....	30
2.7.10	Hauptkultur .....	31

2.7.11	Probennahme.....	31
2.7.11.1	Probennahme Überstand.....	31
2.7.11.2	Probennahme Mycel.....	31
2.7.11.3	Kulturente.....	32
2.8	Proteinbiochemische Arbeiten .....	32
2.8.1	Ammoniumsulfat Fällung.....	32
2.8.2	Filtration mittels Ultrasette™.....	32
2.8.3	Konzentrierung und Umpufferung mittels Vivaflow.....	33
2.8.4	Konzentrierung und Umpufferung mittels Macrosep®, Microsep® oder Amicol Ultra-0.5.....	33
2.8.5	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	34
2.8.5.1	Schwache Anionenaustauschchromatographie.....	34
2.8.5.2	Größenausschlusschromatographie.....	35
2.8.6	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	35
2.8.7	UV/Vis-Spektroskopie .....	36
2.8.8	Reinheitszahl.....	36
2.8.9	Enzymassays.....	37
2.8.9.1	Verwendete Puffer und Lösungen .....	37
2.8.9.2	Peroxidaseaktivität .....	39
2.8.9.2.1	Bestimmung der Peroxidaseaktivität mittels ABTS .....	39
2.8.9.2.2	Bestimmung der Peroxidaseaktivität mittels DMP .....	40
2.8.9.3	Bestimmung des pH-Optimums.....	40
2.8.9.4	Bestimmung des Temperaturoptimums.....	41
2.8.9.5	Bestimmung der optimalen Wasserstoffperoxid-Konzentration .....	41
2.8.9.6	Untersuchung der Enzymstabilität .....	41
2.8.9.7	Untersuchung der Lagerstabilität.....	42
2.8.9.8	Enzymkinetik .....	42
2.8.9.9	Bestimmung der Glucoseoxidaseaktivität mittels ABTS .....	42
2.8.10	Enzymatischer Abbau verschiedener Substrate.....	44
2.8.10.1	Umsetzung von Melanin .....	44
2.8.10.1.1	Etablierung eines 2-Enzym-Systems mit Glucoseoxidase.....	44
2.8.10.1.2	Photometrische Messung des Melaninabbaus im 2-Enzym-System .....	45
2.8.10.2	Umsetzung weiterer natürlicher Farbstoffe.....	46
2.8.10.3	Umsetzung von $\beta$ -Carotin.....	47
2.8.10.3.1	Messung des $\beta$ -Carotinabbaus im L*a*b*-Farbraum .....	47
2.8.10.3.2	Gaschromatographische Analyse der flüchtigen $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte .....	49
2.8.10.3.3	Analyse der flüchtigen $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte mittels HS-SPME-GC-MS .....	49
2.8.10.3.4	Analyse der flüchtigen $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS.....	51
2.8.10.3.5	Identifizierung der Abbauprodukte mittels Kováts-Indices .....	53
2.8.10.3.6	Quantifizierung ausgewählter identifizierter Substanzen mittels Response-Faktor $R_f$ ....	54
2.9	Elektrophorese-Techniken .....	55
2.9.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	55
2.9.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	56

2.9.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	59
2.10	Gelfärbungen .....	61
2.10.1	Coomassie-Färbung.....	61
2.10.2	Kolloidale Coomassie-Färbung .....	62
2.10.3	ABTS-Aktivitätsfärbung .....	62
2.11	Molekularbiologische Arbeiten .....	63
2.11.1	Primerableitung .....	63
2.11.2	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren .....	64
2.11.3	Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff .....	64
2.11.4	Isolierung genomischer DNA.....	64
2.11.5	Isolierung der RNA .....	66
2.11.6	Überprüfung der RNA-Qualität .....	66
2.11.7	DNA-Verdau mit anschließender Phenol-Chloroform-Fällung.....	67
2.11.8	Reverse Transkription .....	68
2.11.9	Polymerasekettenreaktionn (PCR).....	68
2.11.9.1	Präparative PCR.....	70
2.11.9.2	Reverse-Transkription- <i>Real-time</i> -PCR (RT- <i>q</i> PCR) .....	70
2.11.9.3	Auswertung der RT- <i>q</i> PCR nach Pfaffl (2001).....	72
2.11.10	DNA-Sequenzierung .....	72
2.11.11	Proteinidentifizierung.....	73
2.11.12	Edman-Abbau .....	73
2.12	Sterilisation und Entsorgung .....	74
2.12.1	Entsorgung von Chemikalien.....	74
2.12.2	Sterilisation und Entsorgung von S1-Abfällen .....	74
2.12.3	Sterilisation von Arbeitsmaterialien .....	74
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
3.1	Screening von Basidiomyceten auf Melaninbleichung .....	75
3.1.1	Screening auf Melaninagarplatten.....	75
3.1.2	Screening in Submersmedium .....	77
3.1.3	Bleichung von Agarplättchen in Submersmedium.....	78
3.2	Kultivierung von <i>Irpex consors</i> und Untersuchung der Enzymaktivität.....	79
3.2.1	Enzymaktivität im Kulturüberstand bei Kultivierung in Melaninmedium.....	79
3.2.2	Auswirkungen weiterer Substrate auf die Peroxidaseaktiviät .....	81
3.3	Isolierung und Identifizierung einer Peroxidase aus <i>Irpex consors</i> .....	83
3.3.1	Isolierung einer Peroxidase aus <i>Irpex consors</i> .....	83
3.3.1.1	Vorreinigung Kulturüberstand .....	83
3.3.1.2	FPLC-Reinigung .....	85
3.3.1.2.1	Schwache Anionenaustauschchromatographie .....	85
3.3.1.2.2	Größenausschlusschromatographie .....	87
3.3.2	Bestimmung der molekularen Masse mittels SDS-PAGE .....	88

3.3.3	Bestimmung des isoelektrischen Punkts mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) .....	89
3.3.4	Proteinidentifizierung der isolierten Peroxidase mittels MALDI-TOF-MS/MS .....	91
3.3.5	Bestimmung des N-Terminus der Aminosäuresequenz mittels Edman-Abbau .....	93
3.4	Biochemische Charakterisierung der isolierten versatilen Peroxidase .....	94
3.4.1	UV/Vis-Spektrum der isolierten putativen versatilen Peroxidase .....	94
3.4.2	Reinheitszahl .....	94
3.4.3	Optimale Umsetzungsbedingungen .....	95
3.4.3.1	Bestimmung des pH-Optimum der versatilen Peroxidase .....	95
3.4.3.2	Bestimmung des Temperatur-Optimums .....	96
3.4.3.3	Bestimmung der optimalen Wasserstoffperoxid-Konzentration .....	97
3.4.4	Kinetische Parameter .....	98
3.4.5	Enzymstabilitätstests .....	99
3.4.5.1	Bestimmung der Stabilität bei variierenden pH-Werten .....	99
3.4.5.2	Bestimmung der Stabilität bei variierenden Temperaturen .....	100
3.4.5.3	Bestimmung der Lagerstabilität bei variierenden Temperaturen .....	101
3.5	Melaninabbau durch die isolierte versatile Peroxidase in einem 2-Enzym-System .....	102
3.5.1	Etablierung eines 2-Enzym-Systems .....	102
3.5.2	Anwendung des 2-Enzym-Systems zur Bleichung von Melanin .....	104
3.6	Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression der putativen versatilen Peroxidase (pVP) aus <i>Irpex consors</i> in Melaninmedium .....	107
3.6.1	Primerableitung .....	107
3.6.2	Referenzgene .....	112
3.6.3	Expressionssteigerung der putativen versatilen Peroxidase durch Kultivierung mit Melanin .....	114
3.6.3.1	Kinetik der Peroxidaseaktivität bei Kultivierung mit Melanin .....	114
3.6.3.2	RT-qPCR .....	115
3.7	Anwendungsansätze zur Bleichung weiterer natürlicher Farbstoffe .....	120
3.7.1	Enzymatische Umsetzung verschiedener natürlicher Farbstoffe .....	120
3.7.2	Umsetzung $\beta$ -Carotin .....	122
3.7.2.1	Analyse der Bleichungswirkung durch das 2-Enzym-System mittels Spektralphotometer ..	122
3.7.2.2	Identifizierung der Abbauprodukte von $\beta$ -Carotin durch pVP mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie .....	123
3.7.2.3	Quantifizierung der Abbauprodukte mittels HS-SPME-GC-MS .....	126
3.7.2.4	Quantifizierung der Abbauprodukte mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS .....	128
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>130</b>
4.1	Gewinnung und Identifizierung der versatilen Peroxidase .....	130
4.2	Enzymcharakterisierung .....	139
4.3	Melaninabbau durch ICO VP .....	141
4.4	Nachweis der Expressionssteigerung der pVP durch den Induktor Melanin .....	143
4.5	Weitere Applikationen der versatilen Peroxidase .....	147

4.5.1	Bleichung von natürlichen Farbstoffen .....	147
4.5.2	Identifizierung der $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte .....	148
4.5.3	Quantifizierungsansätze der $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte $\beta$ -Ionon und $\beta$ -Cyclocitral.....	151
<b>5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>154</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>157</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>176</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i>
cDNA	komplementäre DNA
cTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
CV	Säulenvolumen
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DHN	1,8-Dihydroxynaphthalin
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FF	<i>fast flow</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatograph
GFX	Gelfiltrationschromatographie
GOX	Glucoseoxidase
HGA	Homogenitinsäure
HS	<i>head space</i>
ICO	<i>Irpex consors</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>

---

kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KI	Kováts-Index
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
L-DOPA	3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin
$m/z$	Masse-Ladungsverhältnis
MALDI	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung
MEP	Malzextrakt Sojapepton
MS	Massenspektrometer
MWCO	Molekulargewichtsgrenze
NCBI	National Center for Biotechnology Information
$OD_{590}$	Optische Dichte bei 590 nm Wellenlänge
p.a	zur Analyse ( <i>pro analysi</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pH	pondus Hydrogenii
pVP	putative versatile Peroxidase
$R_f$	Responsefaktor
RNA	Ribonucleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	<i>rounds per minute</i>
RZ	Reinheitszahl
SBSE	<i>stir bar sorptive extraction</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPME	<i>solid phase micro extraction</i>
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin
$T_m$	Schmelztemperatur
TOF	<i>time of flight</i>
Tris	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween® 80	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
VE	vollentsalzt
$v_{max}$	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
w/v	Masse pro Volumen (bei Prozentangaben)
w/w	Masse pro Masse (bei Prozentangaben)

# 1 Einleitung

## 1.1 Melanin – Struktur, Entstehung und Abbaumöglichkeiten

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Abbau von Melanin durch eine versatile Peroxidase aus *Irpex consors*. Melanin ist ein ubiquitär vorkommendes, meist dunkelbraunes bis schwarzes, heterogenes Biopolymer. Als Pigment kommt es in fast allen Lebewesen vor. So gibt es tierisches und pflanzliches Melanin, Melanin in Bakterien, Pilzen und synthetisch hergestelltes Melanin (Prota 1992, Woo *et al.* 2004). Mit Strukturen, welche sehr unterschiedlich ausfallen und nicht klar definiert werden können, kann Melanin als eine Gruppe komplexer Polymere angesehen werden. Allgemein ist Melanin ein heterogenes Polymer, welches aus der Oxidation von Phenolen mit anschließender Polymerisation der entstehenden Chinone entsteht (Solano 2014). Die Funktionen von Melanin in den jeweiligen Organismen sind sehr vielfältig, ebenso wie die bisher aufgeklärten Synthesewege. Melanin ist das wichtigste Pigment für die Farbgebung von tierischer und menschlicher Haut, Haaren und Augen (Nicolaus & Piattelli 1962). Eine Hauptfunktion von Melanin ist der UV-Schutz: Melanin ist in der Lage, UVA- und UVB-Strahlung zu absorbieren (Kollias & Baqer 1985, Noonan *et al.* 2012) und kommt so in Melanozyten, den pigmententhaltenden Zellen in der Basalzellschicht der Epidermis vor. In Kaltblütern dient Melanin der Energiegewinnung, da es bis zu 90% der aus UV-Strahlung absorbierten Energie in Wärmeenergie abgeben kann (Goodman & Bercovich 2008). Eine weitere wichtige Funktion ist der Schutz vor reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) sowie die Bindung von Schwermetallen und anderen Molekülen wie z.B. Xenobiotika und Antibiotika (Hill 1992). Bei Vorkommen in der Iris sorgt Melanin für eine höhere Sehgenauigkeit (Hill 1992, Wang *et al.* 2006, Hosseini *et al.* 2010), weiter übernimmt Melanin wichtige Funktionen im Inneren des Hörapparates (Meyer zum Gottesberge 1988).

Melanin trägt maßgeblich zur Stabilität von Organismen bei, es ist in Insekten zur Bildung des Exoskeletts essentiell (Sugumaran 1991, 2002). Pilze und andere Organismen mit Melanin sind wesentlich widerstandsfähiger (Luther & Lipke 1980), so konnten zum Beispiel nach der Katastrophe von Tschernobyl diejenigen Pilze recht schnell wieder verseuchte Bereiche besiedeln, welche Melanin produzierten (Dadachova & Casadevall 2008). Auch als Verteidigungsmittel kann Melanin dienen, es wird von Tintenfischen im Gefahrenfall abgesondert, um dem Angreifer dadurch die Sicht zu nehmen.

Weiter kommt Melanin in pflanzlichen Produkten wie Obst und Gemüse vor, welches dort nach Verletzung der Zellen rasch zum Schutz vor Mikroorganismen wie zum Beispiel Pilzsporen gebildet wird (Hurrell & Finot 1984). Dieses Phänomen ist als Braunfärbung beim Anschneiden von Früchten weitläufig bekannt.

Die Funktionen von Melanin sind sehr vielfältig, ebenso wie dessen Strukturen und Farbnuancen. Allgemein kann man zwischen Eumelanin, Phäomelanin, Neuromelanin, Allomelanin und Pyromelanin unterscheiden. Eumelanin und Phäomelanin sind die hauptsächlich in tierischen Lebewesen vorkommenden Melanine. Eumelanin ist ein schwarz bis schwarzbräunliches Melanin, welches hauptsächlich aus der Vorstufe L-Tyrosin gebildet wird und vor allem in Haut und Haaren vorkommt (Abbildung 1.1). Phäomelanin hat oft rötliche bis gelbliche Einschläge (Simon & Peles 2010). Dessen Vorstufe ist, wie bei Eumelanin, zwar ebenfalls L-Tyrosin, jedoch werden in Phäomelanin auch schwefelhaltige Verbindungen eingebaut, wodurch es sich von Eumelanin unterscheidet (Prota & Nicolaus 1967, Prota & Thomson 1976, Prota 1988) (Abbildung 1.2). Neuromelanin ist ein Gemisch aus Eumelanin und Phäomelanin (Ito *et al.* 1986).

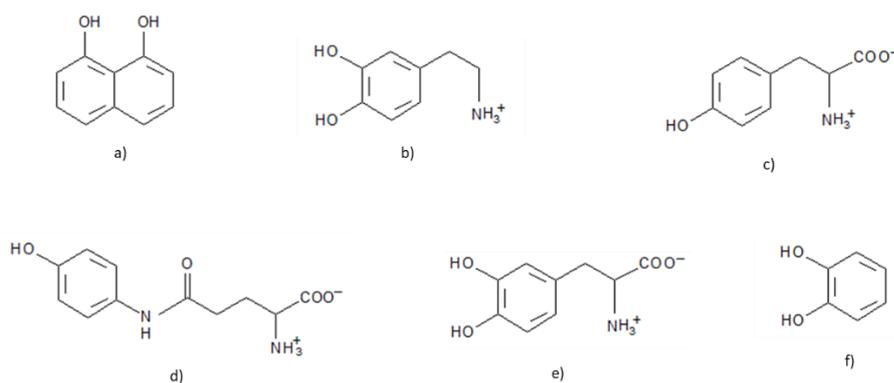


Abbildung 1.1 Strukturen von Vorstufen verschiedener Melaninarten: a) 1,8-Dihydroxynaphthalin b) Dopamin c) Tyrosin d) 4-Glutaminhydroxylbenzen e) Dopa f) Catechol

Das schwarzbraune Allomelanin kommt häufig in Pflanzen, Pilzen und Bakterien vor. Im Gegensatz zu anderen Melaninen enthält Allomelanin keinen Stickstoff, die häufigsten Vorstufen sind Catechole und Catecholsäuren, in Pilzen häufig 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN-Melanin) (Nicolaus 1986).

Die letzte Gruppe sind Pyromelanine, diese sind gelblich gefärbt und oft in Bakterien zu finden. Ein Vertreter ist hierbei HGA-Melanin, welches hauptsächlich aus der Vorstufe Homogenitinsäure (HGA) synthetisiert wird (Schmaler-Ripcke *et al.* 2009).

Neben den verschiedenen Untergruppen von Melaninen unterscheiden sich auch die Synthesewege und die bei der Bildung beteiligten Enzyme. Allgemein verläuft die Bildung von Melanin über eine Initialphase, eine enzym-katalysierte Oxidation von phenolischen Vorstufen zu Chinonen, und einer anschließenden finalen Phase, der unkontrollierten Polymerisation der Chinone zu Polymeren (Solano 2014).

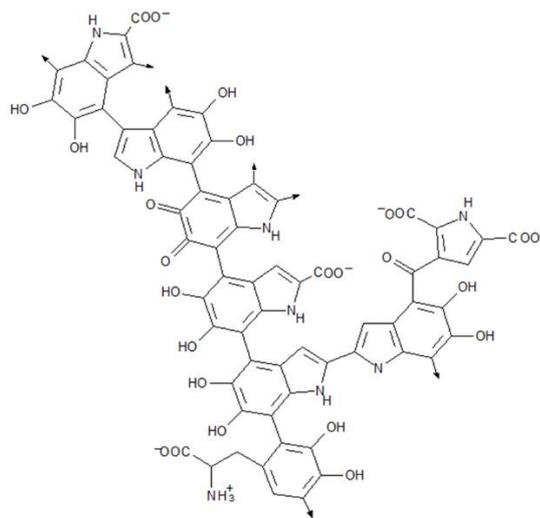


Abbildung 1.2 Beispielhafter Modellausschnitt aus einem Eumelanin-Polymer

Ein bekannter Syntheseweg der Eumelanine und Phäomelanine ist der Raper-Mason-Weg, welcher in der ersten Phase, der Bildung von L-Dopachinon aus L-Tyrosin durch Tyrosinase, für beide Arten gleich ist (Raper 1928, Mason 1948, Lerner & Fitzpatrick 1950). Anschließend kommt es in Anwesenheit von thiolhaltigen Verbindungen wie zum Beispiel L-Cystein zur Bildung von Phäomelanin, bei Abwesenheit der thiolhaltigen Verbindungen zu spontanen Cyclisierungsreaktionen zu L-Dopachrom und in weiteren Schritten zu Eumelanin (Prota 1980). Daneben sind mehrere Varianten des Raper-Mason-Wegs, wie zum Beispiel auch bei der Bildung von Neuromelanin durch Tyrosinhydroxylase (EC 1.14.16.2), bekannt.

Ein weiterer, bekannter Syntheseweg stellt der Pentaketid-Weg zur Bildung von DHN-Melanin, einer Variante des Allomelanins, dar. Dieser kommt häufig in Pilzen vor. Er verläuft über die ursprüngliche Vorstufe Acetyl-CoA, welche durch Acetyl-CoA-Carboxylase sowie Pentaketidsynthasen zuerst zu 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN) reagiert, bevor dieses anschließend mittels Polyphenoloxidasen oder Laccasen zu DHN-Melanin weiterreagiert (Bell & Wheeler 1986, Butler & Day 1998, Eisenman & Casadevall 2012).

Die Enzyme, welche für die Bildung von Melanin verantwortlich sind, sind als Phenolasen zusammengefasst. Diese sind verschiedene Oxygenasen, welche Kupfer in ihrem aktiven Zentrum tragen und in der Lage sind, Phenole wie *mono-*, *ortho-* und *para-*Phenole zu oxidieren (Mason *et al.* 1955). Die wichtigsten Vertreter sind Tyrosinasen (EC 1.14.18.1), welche in Tieren, Pilzen, Hefen und Bakterien vorkommen, sowie Catecholoxidasen (EC 1.10.3.1), auch als Polyphenoloxidasen bekannt, welche für die Bräunung in Pflanzen verantwortlich sind. Weiter können Enzyme wie Laccasen (EC 1.10.3.2) und tyrosinaseähnliche Proteine zum Einsatz kommen (Gessard 1903, Körner & Pawelek 1980, Eleftherianos & Revenis 2011).

Melanin hat nicht nur schützende Eigenschaften. Zwar dient die finale Polymerstruktur einer Vielzahl von Zwecken in Organismen, die Entstehung beinhaltet jedoch sehr reaktive Zwischenstufen. Bei der Bräunung von Obst und Gemüse können die Chinon-Zwischenstufen irreversibel mit Amino- und Schwefelgruppen von Proteinen reagieren. So binden sie in einer nucleophilen Additionsreaktion zum Beispiel an NH<sub>2</sub>-Gruppen von Lysin, an SCH<sub>3</sub>-Gruppen von Methionin oder an Indolringe von Tryptophan. Dadurch sinkt die Bioverfügbarkeit von essentiellen Aminosäuren wie Lysin oder Cystein, die Nährwertqualität der Früchte nimmt ab und es kann zur Bildung von toxischen Stoffen kommen (Dao & Friedman 1992, Sapers 1993). Weiter verlieren bräunlich gewordene Produkte an Attraktivität bei den Kunden und können in Folge dessen zu finanziellen Einbußen für die Produzenten führen.

Die Inhibierung oder Umkehr der enzymatischen Bräunung ist demnach wirtschaftlich von großem Interesse. Ein weiteres, großes Anwendungsfeld der Melaninbleichung stellt neben der Lebensmittel- auch die Kosmetikbranche dar. Hierbei sollen entsprechende Cremes der Behandlung von Hyperpigmentierung und anderen Pigmentstörungen dienen. Es gibt hierbei auch eine sehr große Nachfrage an hautaufhellenden Behandlungsmöglichkeiten, vor allem aus dem ostasiatischen Raum.

Auch in weiteren Gebieten wie der Unkrautbekämpfung, bei der bestimmte Schädlinge durch Abbau des zellwandstärkenden Melanins geschwächt werden sollen, oder im Restaurationsgewerbe, bei der die durch schwarzen Schimmel kontaminierten, kostbaren Güter möglichst schonend wieder von den schwarzen Pigmenten befreit werden sollen, besteht ein hohes Interesse daran, die Bildung von Melanin zu verhindern oder Melanin schonend abzubauen.

Viele Ansätze zur Verhinderung der enzymatischen Bräunung beschäftigen sich zum einen mit der Inhibierung der beteiligten Enzyme oder/und zum anderen mit der Eliminierung oder Transformation der Substrate (Vámos-Vigyázó 1995). Traditionelle, schon seit langem verwendete Verfahren in Lebensmitteln sind zum Beispiel physikalische Methoden wie Blanchieren, Autoklavieren oder Ultrafiltration, welche zu einer irreversiblen Inhibierung oder Abtrennung der Enzyme führen. Diese Verfahren gehen jedoch oft mit einer Minderung an Gewicht, Geschmack und Nährwerten einher (Konananayakam & Sastry 1988, Vámos-Vigyázó 1995). Zitronensäure und Ascorbinsäure, welche ebenfalls seit langem Anwendung finden, sind in ihrer Wirkung nur sehr kurzlebig. Sulfite wie Metabisulfit stellen sehr potente Inhibitoren dar. Zum einen reagieren Metabisulfite mit den Chinon-Intermediaten, zum anderen binden sie an die *Met*- und *Oxy*-Form des gebundenen Kupfers im aktiven Zentrum der Phenolasen (Friedman & Molnar-Perl 1990, Valero *et al.* 1992). Aufgrund gesundheitlicher Bedenken sind Sulfite jedoch nur in einem sehr begrenzten Bereich der Lebensmittelherstellung wie zum Beispiel bei der Konservierung von Wein oder Trockenfrüchten zugelassen.

Zu den moderneren Vertretern der Inhibierung der Melaninsynthese gehört Kojisäure, ein Metabolit aus einigen *Aspergillus*- und *Penicillium*-Spezies (Parrish *et al.* 1966), welcher ebenfalls Chelatkomplexe mit dem Kupfer im aktiven Zentrum der Phenolasen bildet (Hider & Lerch 1989, Chen *et al.* 1991, Tanaka *et al.* 2014). Weiter ist Kojisäure in der Lage, *o*-Chinone zu *o*-Diphenolen zu reduzieren und mit weiteren *o*-Chinonen zu einem gelben Produkt zu oxidieren (Kahn 1995). Kojisäure wird als Wirkstoff in kosmetischen Cremes zur Behandlung von Hyperpigmentierung eingesetzt.

4-Hexylresorcin, ein Resorcinderivat, wurde erfolgreich an Shrimps sowie frischen und getrockneten Fruchtscheiben eingesetzt (Frankos *et al.* 1991, Iyengar *et al.* 1991, McEvily *et al.* 1992). Es ist als Lebensmittelzusatzstoff E 586 zugelassen und findet bei Krebstieren Anwendung.

Bei Inhibitoren der enzymatischen Bräunung im Bereich der Lebensmittelbehandlung kommt es nicht nur auf die Einordnungen der Sicherheit des Stoffes an. Weiter ist auch die Marktfähigkeit des Produktes entscheidend, da Geschmack, Geruch und Textur der behandelten Produkte ebenfalls häufig beeinflusst werden. So läuft eine ständige Suche nach neuen Methoden zur Behandlung der enzymatischen Bräunung. Eine Möglichkeit stellt hier auch die Behandlung durch Enzyme dar. Die Verwendung von Enzymen ist bereits ein fester Bestandteil der Lebensmittelindustrie. Dazu zählen althergebrachte Verfahren wie zum Beispiel die Wein- und Käseherstellung ebenso wie der Einsatz bei der Stärkeverzuckerung oder dem Klären von Fruchtsäften. Auch die Herstellung von Aromen für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie durch Biokatalysatoren stellt ein immer wichtigeres Feld dar, da diese Aromen als „natürliche Aromastoffe“ einzuordnen sind und somit den immer höher sensibilisierten Verbrauchern entgegenkommen. Besonders der Einsatz von Enzymen aus submers kultivierten Pilzen findet in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie Anwendung, beispielsweise durch Proteasen bei der Herstellung von Geschmacksverstärkern (Wainwright 1992, Erjavec *et al.* 2012).

Dank ihrer Artenvielfalt von über 30.000 bekannten Spezies (Ainsworth & Kirk 2008) stellen Basidiomyceten die größte Gruppe der Pilze dar, deren Enzymvielfalt einzigartig ist. Weiß- und Braunfäulepilze sind in der Lage, durch ihre Vielfalt an unterschiedlichsten Enzymen, die polymeren Substanzen der Lignocellulose abzubauen (Müller & Loeffler 1992). Weißfäulepilze sind hierbei am Abbau von Hemicellulose und Lignin beteiligt (Eriksson *et al.* 1990, Schwarze *et al.* 2000), Braunfäulepilze sind in der Lage, Cellulose und Hemicellulose abzubauen. Zu den am Ligninabbau beteiligten Enzymen gehören unter anderem Peroxidasen, Hemicellulasen, Cellulasen, Peptidasen, Laccasen und Esterasen (Zorn *et al.* 2005).

Vor allem Peroxidasen und Laccasen sind beim Abbau essentiell, bei der Gruppe der Peroxidasen sind insbesondere Manganperoxidasen, Ligninperoxidasen und versatile Peroxidasen, welche die katalytischen Eigenschaften von Lignin- und Manganperoxidasen vereinen (Martinez *et al.* 1996, Mester & Field 1998, Martínez *et al.* 2005), beschrieben.

Die Struktur von Lignin zeigt Ähnlichkeiten zu den Strukturen von Melanin (Neumüller 1972). Wegen dieser strukturellen Ähnlichkeit wurde postuliert, dass Pilze, welche Lignin abbauen können, ebenfalls in der Lage sein müssten, Melanin abzubauen (Butler & Day 1998).

Diese These wurde zwar teilweise widerlegt (White & Traquair 2006), jedoch bestehen durchaus Parallelen zwischen lignolytischen und melanolytischen Aktivitäten, sodass bei ligninabbauenden Pilzen das Potential des Melaninabbaus nicht abwegig ist.

Tatsächlich wurden schon einige Pilze erfolgreich auf Melaninabbau getestet. Der Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* zeigte eine langsam bleichende Wirkung an tierischem, menschlichem und synthetischem Melanin sowie Melanin aus Insekten und Früchten (Luther & Lipke 1980). Auch einige Basidiomyceten mit melaninabbauenden Eigenschaften wurden bereits publiziert (Butler & Day 1998, Rättö *et al.* 2001, White & Traquair 2006). Hierbei unterscheiden sich bei den jeweiligen Veröffentlichungen die beschriebenen beteiligten Enzyme. Es wurden bereits Laccasen in Kombination mit Redoxmediatoren (Kaneko *et al.* 2009, Tavzes *et al.* 2009, Khammuang & Sarnthima 2013), Manganperoxidasen (Butler & Day 1998, Tavzes *et al.* 2009) und Ligninperoxidasen (Woo *et al.* 2004) als verantwortliche Enzyme postuliert. Eine wichtige Rolle spielt auch die Art des Melanins, so konnte zum Beispiel Melanin aus Pilzen erfolgreich durch eine Laccase umgesetzt werden, während synthetisches Melanin nicht abgebaut werden konnte (Kaneko *et al.* 2009, 2009). In anderen Arbeiten verlief die Bleichung von synthetischem Melanin wesentlich erfolgreicher als mit Melanin aus menschlichen Haaren (Nagasaki *et al.* 2008).

## 1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, einen Basidiomyceten zu finden, welcher in der Lage ist, Melanin abzubauen. Es wurde sich, aufgrund eventueller späterer Anwendungsmöglichkeiten in Fruchtzubereitungen, auf nicht-toxinbildende Organismen beschränkt. Von einem positiv getesteten Basidiomyceten sollte das verantwortliche Enzym möglichst bis zum Erhalt einer reinen Enzymfraktion aufgearbeitet werden. Nach erfolgreicher Reinigung sollte das Enzym identifiziert und charakterisiert werden. Weiter war es Ziel dieser Arbeit, das isolierte Enzym als *proof-of-concept* direkt zum Melaninabbau einzusetzen. Auch weitere Einsatzmöglichkeiten des isolierten Enzyms sollten untersucht werden. Der Abbau weiterer natürlicher Farbstoffe sollte untersucht und entstehende flüchtige, aromarelevanten Abbauprodukten identifiziert werden. Hierbei wurden auch erste Quantifizierungsansätze der entstehenden, aromarelevanten Abbauprodukte berücksichtigt.

Auch die Kultivierungsbedingungen, welche einen großen Einfluss auf Wachstum und Enzymsekretion haben können, sollten optimiert werden. Die Steigerung der Enzymaktivität im Kulturüberstand durch Kultivierung mit Melanin als Substrat sollte mittels RT-*q*PCR nachgewiesen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Enzyme

Die verwendete Katalase wurde zum Wasserstoffperoxid-Abbau zur Messung der Laccaseaktivität in Enzymassays benötigt und wurde von Sigma-Aldrich GmbH (München) bezogen.

Die Glucoseoxidase diente als *in-situ* Wasserstoffperoxid-Donor in 2-Enzym-Systemen und wurde von Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) erworben.

MsP1 ist eine rekombinante Peroxidase aus *Mycetinis scorodonius*, welche in *Aspergillus niger* überexprimiert wurde. Unter dem Handelsnamen MaxiBright® wurde es von DSM Food Specialties (Delft, NL) zur Verfügung gestellt. Weitere DNA- und RNA-modifizierende Enzyme für mikrobiologische Arbeiten sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1 Verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
M-MLV Reverse Transcriptase	cDNA-Synthese	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	PCR	New England BioLabs® GmbH, Frankfurt am Main
RNase-Free DNase	DNA-Verdau	Qiagen N.V., Hilden
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP	PCR, Bestandteil des Power-SYBR Green Kits	Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
ArrayScript™ UP Reverse Transcriptase	cDNA-Synthese, Bestandteil des Kits	Invitrogen™
RNase OUT	RNase Inhibitor	Invitrogen™

## 2.2 Mikroorganismen

Tabelle 2.2 Verwendete Mikroorganismen

Stammnummer	Organismus	Kürzel	Herkunft
9	<i>Wolfiporia cocos</i>	WCO-C	Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, NL
16	<i>Lentinula edodes</i>	LED	CBS
39	<i>Lentinus squarrosulus</i>	LSQU	Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig
43	<i>Panellus serotinus</i>	PSER	DSMZ
59	<i>Hypholoma capnoides</i>	HCA	DSMZ
60	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	KUM	DSMZ
61	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	LYP	DSMZ
67	<i>Fistulina hepatica</i>	FHE	DSMZ
87	<i>Armillaria bulbosa</i>	ABU	DSMZ
88	<i>Armillaria tabescens</i>	ATA	DSMZ
93	<i>Coprinus cineraea</i>	COCI	Friedrich-Schiller-Universität, Jena
100	<i>Pleurotus eryngii</i>	PER	DSMZ
106	<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	AFU	DSMZ
108	<i>Auricularia polytricha</i>	APO	DSMZ
111	<i>Irpex consors</i>	ICO	DSMZ
114	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PCI	DSMZ
115	<i>Pleurotus flabellatus</i>	PFLA	DSMZ

---

127	<i>Hericium cirrhatum</i>	HCI	CBS
128	<i>Hericium coralloides</i>	HCO	CBS
143	<i>Polyporus tuberaster</i>	PTU	CBS
164	<i>Agaricus arvensis</i>	AARV	CBS
166	<i>Agrocybe aegerita</i>	AAE	Sylvan Inc., Horst, NL
168	<i>Flammulina velutipes</i>	FVE-F	Falk Amelung (FAM), AG Prof. Dr. Zorn, Justus-Liebig- Universität Gießen
186	<i>Armillaria melea</i>	AMEL	DSMZ
187	<i>Pleurotus ostreatus</i>	POS-2	Yoichi Honda, Kyoto University
201	<i>Piptoporus betulinus</i>	PBE	FAM
202	<i>Macrolepiota procera</i>	MPR	FAM
221	<i>Phallus impudicus</i>	PIM	FAM
229	<i>Armillaria gallica</i>	AGAL	FAM

---

## 2.3 Molekularbiologische Materialien

### 2.3.1 Größenstandards

Tabelle 2.3 Verwendete Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
<b>Proteingrößenstandards</b>	
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher
IEF Marker 3-10, Liquid Mix	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Amersham™ IEF Calibration Kit Low Range pl (pH2.5-6.5)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
<b>DNA-Größenstandards</b>	
100 bp-DNA-Ladder	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
1 kbp-DNA-Ladder	Carl Roth

### 2.3.2 Kits

Tabelle 2.4 Verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
RNeasy® Plant Mini Kit	RNA Isolierung	Qiagen N.V., Hilden
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Isolierung und Reinigung aus Agarosegel-Banden	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Weilmünster
Power SYBR® Green	<i>Real-time</i> PCR	Applied Biosystems Thermo Fisher
RNA-to-C <sub>T</sub> ™ 1-Step Kit		Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
RNase-Free DNase Set	DNA Verdau	Qiagen

### 2.3.3 Oligonucleotide

Tabelle 2.5 Verwendete Oligonucleotide

Nummer	Name	Sequenz	T <sub>m</sub> [°C]	Hersteller
1473	ITS4	5'>TCCTCCGCTTATTGATATGC<3'	58	eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
1474	ITS5	5'>GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG<3'	58	eurofins
126	CUN_CytC_for	5'>CCTTTCGCTGCAGGTACGCTT<3'	62	eurofins
127	CUN_CytC_rev	5'>TTAAGCACACTACACAGTTGGC<3'	58	eurofins
141	CUN_actin1_for	5'>ATGGATGAAGAGGTCGCAGC<3'	59	Biomers.net GmbH, Ulm
142	CUN_actin1_rev	5'>TTAGAAGCATTTCGCGGTGGACAAT<3'	59	biomers
244	ICO_Phos_For	5'>ATGGCTGCAGAGCAAGGAAAC<3'	60	biomers
245	ICO_Phos_rev	5'>CTAGGCAAATACGTCCGGC<3'	57	biomers
RT 11	RT_ICO_MnP_for	5'>CTCAAACGGTGGTGGAGGT<3'	59	biomers
RT 12	RT_ICO_MnP_rev	5'>GCGAATTGAATGAAGTCACCAACC<3'	61	biomers
RT 7	RT_ICO_Actin1_for	5'>ACGAGACCACCTACAACCTCCAT<3'	60	biomers
RT 8	RT_ICO_Actin1_rev	5'>CGACGATCTTGACCTTCATGCTT<3'	61	biomers
RT 65	RT_ICO_CytC_for	5'>TAACCTCCATGGTGTCTTCG<3'	57	biomers
RT 10	RT_ICO_CytC_rev	5'>CGGGGATGTACTTTTTGGG<3'	57	biomers
RT 66	RT_ICO_Phos_for1	5'>CTCACATTCATTAAGCACGTC<3'	56	biomers
RT 67	RT_ICO_Phos_rev1	5'>GATGTTGGCTCGGGCTGGAAC<3'	63	biomers

## 2.4 Chemikalien

### 2.4.1 Referenzverbindungen und Substrate

Tabelle 2.6 Verwendete Referenzverbindungen und Substrate

Substrat	Reinheit	Hersteller
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz (ABTS)	-	AppliChem GmbH, Darmstadt
2,6-Dimethoxyphenol (DMP)	≥97,0%	Fluka Analytical (Sigma), Buchs
BretaxCl (Sulfitablauge mit Calcium-Lignosulfonat)	52% (w/w)	Burgo Group spa (Altavilla Vicentina, IT)
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	p.a.	AppliChem
Melanin	BioReagent für Zellkulturen	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Ferulasäure	≥98%	Fluka Analytical
Gallussäure-Monohydrat	p.a.	Acros Organics (Fisher), Schwerte
Veratrylalkohol	≥96%	Sigma-Aldrich
Oxalsäure-Dihydrat	p.a.	AppliChem
$\beta$ -Carotin	≥97,0%, purum	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Cyclocitral	90%	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Ionon	95%	Fluka Analytical
Vanillin	≥98%, purum	Fluka Analytical
Wasserstoffperoxid	≥30%, p.a.	Fluka Analytical

## 2.4.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 2.7 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalie	Reinheit	Hersteller
3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanin	≥98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Acrylamid-Bisacrylamid Rotiporesegel 40 (37,5:1)	40% in Wasser, 37,5:1	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Agar-Agar Kobe I	reinst	Carl Roth
Ameisensäure	98%, p.a.	VWR International GmbH, Darmstadt
Ammoniumnitrat	98% zur Analyse	Acros Organics (Fisher), Schwerte
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	für die Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumsulfat-Hydrat	≥99,5%, p.a.	Carl Roth
Bernsteinsäure	Zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	für die Gelelektrophorese	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Bromphenolblau Natriumsalz	für die Elektrophorese	Carl Roth
C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	PUFFERAN® ≥99%	Carl Roth
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	100%, pur	Carl Roth
Citronensäure	≥99,5%, Ph. Eur.	Carl Roth
Coomassie Blue G 250	-	AppliChem
Coomassie Blue R 250	-	AppliChem
D-(+)-Glucose-Monohydrat	für die Mikrobiologie	Carl Roth
Desoxynucleosidtriphosphat (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, cTTP)	≥99%	Sigma-Aldrich
Diammoniumperoxodisulfat	für die Molekularbiologie	AppliChem
Dichlormethan	≥99,5%	Carl Roth

Dikaliumhydrogenphosphat	≥99% p.a.	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	zur Analyse	Bernd Kraft GmbH, Duisburg
Dithiothreitol (DTT)	für die Mikrobiologie	AppliChem
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	p.a.	AppliChem
Essigsäure	Rotipuran®, 100% p.a.	Carl Roth
Ethanol	HPLC-Grade Rotipuran®	Carl Roth
	≥99,8% p.a.	
Ethanol	≥99,5%, reinst	Carl Roth
Ethidiumbromid	1% (w/v)	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure- Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	p.a.	Appllichem
Glycerol	100%	Merck
Glycin	≥99%, p.a.	Carl Roth
Isopropanol	≥99,8%, p.a.	Carl Roth
Kaliumacetat	reinst, Ph. Eur.	AppliChem
Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%, p.a., ACS	Carl Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	min. 99%	Alfa Aesar GmbH & Co K.G, Karlsruhe
L-Aspartat-Mononatriumsalz-Monohydrat	99%	Alfa Aesar
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	≥99%	Carl Roth
Malzextrakt	für die Mikrobiologie	Fluka Analytical (Sigma), Buchs
Methanol	≥99,8%, HPLC grade	VWR
Midori Green Direct	-	Nippon Genetics Europe GmbH
N,N,N,N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	≥99%	AppliChem
Natriumacetat, wasserfrei	≥99% p.a.	Carl Roth
Natriumchlorid	>99,8%	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	Ph. Eur.	Merck
Natriumhydroxid	≥99% p.a.	Carl Roth
Natriumhypochlorit	13% Technical Grade	AppliChem

Pepton aus Soja	für die Mikrobiologie	Fluka Analytical
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	100%, zur Extraktion von Nucleinsäuren	Carl Roth
Phenolrot	-	Merck
Phosphorsäure	Rotipuran® 85%, p.a., ACS, ISO	Carl Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	>98%, für die Molekularbiologie	Carl Roth
Roti-Nanoquant® 5x	5x Konzentrat	Carl Roth
Salzsäure	37% Rotipuran® p.a.	Carl Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	99%, p.a.	Sigma-Aldrich
Tris-Hydrochlorid	PUFFERAN® $\geq$ 99%	Carl Roth
Tween® 80	Ph. Eur.	Carl Roth
Zink(III)-sulfat-Heptahydrat	p.a.	AppliChem

### 2.4.3 Gase

Tabelle 2.8 Verwendete Gase

Gas	Qualität	Lieferant
Helium	5.0	Praxair, Düsseldorf
Sauerstoff	2.5	Praxair
Sauerstoff	4.0	Praxair
Stickstoff	5.0	Praxair
Wasserstoff	5.0	Praxair

## 2.5 Geräte

### 2.5.1 Fast Protein Liquid Chromatographie

#### 2.5.1.1 Fast Protein Liquid Chromatographen

Tabelle 2.9 Verwendete Chromatographen

<b>Gerät 1</b>	<b>NGC™ Chromatography System</b>
<b>Hersteller</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<b>Detektion</b>	UV-Detektion 280 nm
<b>Fraktionssammler</b>	BioRad BioLogic BioFrac Fraction Collector
<b>Datenaufnahme</b>	ChromLab 3.1
<b>Gerät 2</b>	<b>BioRad BioLogic Duo Flow</b>
<b>Hersteller</b>	Bio-Rad Laboratories GmbH
<b>Detektion</b>	UV-Detektion bei 280 nm
<b>Fraktionssammler</b>	BioRad BioLogic BioFrac Fraction Collector
<b>Datenaufnahme</b>	BioLogic Duo Flow

#### 2.5.1.2 Verwendete Säulen

Tabelle 2.10 Verwendete FPLC-Trennsäulen

<b>Säule/Zubehör</b>	<b>Funktion</b>	<b>Hersteller</b>
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade	Gelfiltration	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, S
XK 26 Column	Leersäule	GE Healthcare
DEAE Sepharose™ Fast Flow	Schwacher Anionentauscher	GE Healthcare

## 2.5.2 Gaschromatographen

### 2.5.2.1 HS-SPME-GC-MS

Tabelle 2.11 HS-SPME-GC-MS

<b>Gerät</b>	<b>Agilent 7890A</b>
<b>Hersteller</b>	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn
<b>Detektion</b>	Massenspektrometer Agilent Technologies 5975C VL MSD with triple-Axis Detector
<b>Bediensoftware</b>	MassHunter GC/MS Aquisition B.07.01.1805
<b>Auswertesoftware</b>	MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.06.00
<b>Datenbank</b>	NIST Mass Spectral Search Programm Version 2.0g
<b>Autosampler</b>	MPS Multi Purpose Sampler Gerstel, CTC Analytics AG Zwingen, CH
<b>Software Autosampler</b>	Maestro Configuration 1.4.4.19

### 2.5.2.2 SBSE-TDU-CIS-GC-MS

Tabelle 2.12 SBSE-TDU-CIS-GC-MS

<b>Gerät</b>	<b>Agilent 7890B</b>
<b>Hersteller</b>	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn
<b>Detektion</b>	Massenspektrometer Agilent Technologies 5977B MSD
<b>Bediensoftware</b>	MassHunter Data Analysis GC/MS Aquisition B.07.04.2260
<b>Auswertesoftware</b>	MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis Version B.07.00
<b>Datenbank</b>	NIST Mass Spectral Search Programm Version 2.0g
<b>Autosampler</b>	MPS Multi Purpose Sampler Gerstel, CTC Analytics AG Zwingen, CH
<b>Software Autosampler</b>	Maestro Configuration 1.4.5.0

### 2.5.2.3 Verwendete Säule und Zubehör

Tabelle 2.13 Verwendete GC-Trennsäule

Säule/Zubehör	Funktion	Hersteller
VF-WAXms	Polare	Agilent Technologies Deutschland GmbH &
30 m x 250 µm x 0,25 µm	Trennsäule	Co. KG, Waldbronn

Tabelle 2.14 Verwendete Festphasenextraktionseinheiten

Extraktionszubehör	Material	Hersteller
Stir Bar	10 mm mit 0,5 mm PDMS	Gerstel
SPME-Fiber	DVB/CAR/PDMS (grey)	Supelco

### 2.5.3 Geräte

Tabelle 2.15 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller	Zugehörige Software
Autoklav	Laboklav 160 MSL	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle	
Autoklav	Laboklav 25 B	SHP Steriltechnik	
Brutschrank	IPP 5000	Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach	
Dispergiergerät	T 25 digital Ultra-Turrax®	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen	
Feinwaage	BP 211D	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen	

Filtrationseinheit	Ultrasette™ tangential Flow Device	Pall Deutschland Holding GmbH & Co. KG, Dreieich	
Filtrationseinheit	Vivaflow 200	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen	
Filtrationseinheit	Macrosep® Advance Centrifugal Device 10 MWCO	Pall	
Filtrationseinheit	Microsep® Advance Centrifugal Device 10 MWCO	Pall	
Filtrationseinheit	Amicol Ultra-0.5 Ultracel-PL Membran, 10 kDa	Merck Chemikals GmbH, Darmstadt	
Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Mini S	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen	
Gelscanner	DeVision DBOX mit UV transilluminator	Decon Science Tec GmbH, Hohengandern	DeVision G
Gelscanner	Bio 5000 MICROTEK	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	ScanWizard Bio
Grobwaage	Atilon AccuLab	Sartorius	
Heizblock	Accublock™ Mini	Labnet International Inc., Edison, NJ, USA	
IEF- Gelelektrophoresekammer	multiphor II	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg	
Inkubationsschüttler	Multitron Version 2	Infors GmbH, Einsbach	
Inkubationsschüttler	gyro-rocker SSL3	Cole-Parmer GmbH, Wertheim	
Kälte-Umwälzthermostat	Minichiller®	Peter Huber Kältemaschinenbau	

		GmbH, Offenburg	
Magnetrührer	RH basic 2	IKA®	
Magnetrührer	LAB DISC	VWR International	
		GmbH, Darmstadt	
Mikroplattenleser	Biotek Synergy 2	BioTek Germany, Friedrichshall	Gen5 1.07; Gen5 2.01
Mikrowelle	MWG 1227CB	C. Bomann GmbH, Kempten	
Muffelofen	B 130	Nabertherm GmbH, Lilienthal	
Multipipette	Research pro 1200	Eppendorf AG, Hamburg	
Multipipette	Research pro 100	Eppendorf	
Nanophotometer	NanoPhotometerTM Pearl	Implen GmbH, München	
PCR-Cycler	T100TM Thermal Cycler	Bio-Rad	
PCR-Werkbank	Ultraviolet sterilizing PCR Workstation	PeqLab	
Peristaltikpumpe	Masterflex® L/STM easy- load ecolomy drive	Cole-Parmer	
pH-Meter	Seven Easy	Mettler-Toledo International Inc., Greifensee, CH	
Pipettensatz	PeqPette	PeqLab	
Pipettensatz		Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	
<i>Real-time</i> PCR Cycler	CFX Connect™	Bio-Rad	Bio-Rad CFX
Detektionssystem	<i>Real-Time</i> System		Manager 3.0
Reinstwasseranlage	Sartorius arium 611VF	Sartorius	
Rotationsverdampfer	CVC 3000	VWR	
Rotationsverdampfer-Pumpe	VP 2 autovac/Pump MD 10	VWR	
Rotationsverdampfer	HB 10 basic	VWR	

---

Wasserbad			
Spannungsquelle	Power Supply EV231	PeqLab	
Spannungsquelle	Power Supply EV262	PeqLab	
Spektrometer	AvaSpec-2048	Avantes BV, Apeldoorn, NL	AvaSoft 7.4 for AvaSpec- USB2
Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena AG, Jena	WinASPECT
Sterilwerkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific Life Tehnologies GmbH, Darmstadt	
Temperiereinheit für Spektralphotometer	Ministat 125	Peter Huber	
Tischzentrifuge	Mini centrifuge NG002R	Nippon Genetics Europe, Düren	
Tischzentrifuge	Mini centrifuge NG002G	Nippon	
Tischzentrifuge	Microfuge® 22R Microcentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld	
Tischzentrifuge	Allegra® X-15R Benchtop Centrifuge	Beckman Coulter	
Ultratiefkühlschrank	Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham	
Vakuum Controller	PC 3004 Vario, CVC 3000	Vacuubrand GmbH & Co.KG, Wertheim	
Vortexmixer	Mixer UZUSIO VTX- 3000L	LMS Laboratory&Medical Supplies GmbH & Co. KG, Brigachtal	

---

## 2.6 Bioinformatiksoftware und Datenbanken

Tabelle 2.16 Verwendete Software und Datenbanken

Name	Funktion	Internetadresse
NCBI BLAST	Datenbank	Blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.cgi
Primer Design Oligo Property Scan	Primerkonstruktion	eurofins.de
MultAlin	Nucleotid Alignments	<a href="http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/">http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/</a>
JGI BLAST	Datenbank	genome.jgi.doe.gov
CloneManager 9	Primerkonstruktion	scied.com
OriginPro 9.3	Datenvisualisierung	originlab.com
ExPASy SwissModel*	3-D-Modell Berechnung	swissmodel.expasy.org
PyMOL Molecular Graphic System	3-D-Modell	pymol.org
Version 1.8.6.0 Schrödinger, LLC.	Berechnung	

\*(Arnold *et al.* 2006, Bordoli *et al.* 2009, Biasini *et al.* 2014)

## 2.7 Kultivierung von Basidiomyceten

### 2.7.1 MEP-Medium

Tabelle 2.17 Zusammensetzung Malzextrakt-Pepton-Medium

Malzextrakt	20 g*L <sup>-1</sup>
Sojapepton	3 g*L <sup>-1</sup>

Die Bestandteile des Mediums (Tabelle 2.17) wurden in Reinstwasser gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 5,6 eingestellt, in Erlenmeyerkolben überführt und jeweils mit einem Cellulosestopfen und Aluminiumfolie verschlossen. Anschließend wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

### 2.7.2 MEP-Agar

Zu den Medienbestandteilen des MEP-Flüssigmediums (Tabelle 2.17) wurde zusätzlich Agar-Agar bis zu einer Endkonzentration von 15 g\*L<sup>-1</sup> zugegeben und bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

### 2.7.3 Hauptkultur-Medium mit Melanin

Tabelle 2.18 Zusammensetzung Hauptkultur-Medium mit Melanin

D-(+)-Glucose-Monohydrat	10,0 g*L <sup>-1</sup>
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g*L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g*L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,5 g*L <sup>-1</sup>
Ammoniumnitrat	2,4 g*L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung (2.7.7)	1 mL*L <sup>-1</sup>
Melanin (2.7.3.1) (2.7.3.2)	250 mg*L <sup>-1</sup>

Die Bestandteile des Mediums (Tabelle 2.18), ausgenommen der Melanin-Lösung, wurden in Reinstwasser gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt, in Erlenmeyerkolben überführt und jeweils mit einem Cellulosestopfen und Aluminiumfolie verschlossen. Anschließend wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die entsprechenden Volumina Melanin-Lösung wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde Melanin in einer Konzentration von 250 mg\*L<sup>-1</sup> eingesetzt.

### **2.7.3.1 Melaninlösung mit synthetischem Melanin von Sigma-Aldrich**

Melanin (Sigma-Aldrich) wurde durch schrittweises Erhöhen des pH-Wertes mit 1 M NaOH in Reinstwasser gelöst, mit 0,5 M HCl wieder auf pH 6,0 eingestellt und dem Hauptkulturmedium (2.7.3) nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben.

### **2.7.3.2 Melaninlösung mit synthetischem Melanin aus L-Dopa**

Die Methode zur Melaninsynthese wurde übernommen nach Felix *et al.* (1978). Zur Herstellung von Melanin wurden 1,0 g L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) in 200 mL Reinstwasser gelöst und mit 1 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Der Ansatz wurde in einem 500 mL Rundkolben für 96 h kräftig durchmischt. Anschließend wurde die Lösung mit 1 M HCl auf pH 2,0 eingestellt und für 10 min bei 4.000 x *g* zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und der schwarze Rückstand zwei Mal mit 0,01 M HCl sowie einmal mit Reinstwasser gewaschen, jeweils wieder zu gleichen Bedingungen zentrifugiert und die Überstände verworfen. Der schwarze Rückstand wurde anschließend für 14 h bei 55 °C getrocknet. Es wurden grobe, schwarze Kristalle erhalten.

Zur Herstellung der Lösung wurde das zuvor gefällte Melanin fein vermalen, durch Erhöhen des pH-Wertes im gleichen Volumen Reinstwasser gelöst, auf pH 6,0 eingestellt und sterilfiltriert.

### 2.7.4 Melanin-Agar

Zu den Medienbestandteilen des Melanin-Flüssigmediums (2.7.3) wurde zusätzlich Agar-Agar bis zu einer Endkonzentration von  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  gegeben und bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 min autoklaviert. Die aus L-Dopa synthetisierten Melaninlösungen (2.7.3.2) wurden nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben.

### 2.7.5 Hauptkultur-Medium mit Sulfitablauge BretaxCl

Tabelle 2.19 Zusammensetzung Hauptkultur-Medium mit BretaxCl

BretaxCl	$10 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$
Kaliumdihydrogenphosphat	$1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	$0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$
Spurenelementlösung (2.7.7)	$1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$

Die Bestandteile des Mediums (Tabelle 2.19) wurden in Reinstwasser gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt, in Erlenmeyerkolben überführt und jeweils mit einem Cellulosestopfen und Aluminiumfolie verschlossen. Anschließend wurde bei  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  für 20 min autoklaviert.

## 2.7.6 Weitere Hauptkulturmedien

**Tabelle 2.20 Zusammensetzung Hauptkulturmedien mit weiteren Substraten**

D-(+)-Glucose-Monohydrat	10,0 g*L <sup>-1</sup>
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g*L <sup>-1</sup>
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g*L <sup>-1</sup>
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,5 g*L <sup>-1</sup>
Ammoniumnitrat	2,4 g*L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung (2.7.7)	1 mL*L <sup>-1</sup>
Substrat (Tabelle 2.21)	10 mg*L <sup>-1</sup>

Folgende Substrate wurden zur Untersuchung auf eine induzierende Wirkung der Peroxidaseaktivität eingesetzt (Tabelle 2.21).

**Tabelle 2.21 Zusätzliche in Hauptkulturmedien getestete Substrate**

Substrat	Endkonzentration [mM]
Vanillin	10
DMP	10
Oxalsäure	10
Ferulasäure <sup>1</sup>	10
Gallussäure	10
Veratrylalkohol	10

<sup>1</sup>gelöst in Ethanol, Endkonzentration Ethanol im Medium 1% (v/v)

Die Bestandteile des Mediums wurden in Reinstwasser gelöst, mit 1 M NaOH auf pH 6,0 eingestellt, in Erlenmeyerkolben überführt und jeweils mit einem Cellulosestopfen und Aluminiumfolie verschlossen. Anschließend wurde bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

### 2.7.7 Spurenelementlösung

Tabelle 2.22 Zusammensetzung der Spurenelementlösung

Substrat	Endkonzentration [mg*L <sup>-1</sup> ]
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	80
Zink(III)-sulfat-Heptahydrat	90
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	30
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	5
EDTA-Natriumsalz	400

Die Bestandteile der Spurenelement-Lösung (Tabelle 2.22) wurden in Reinstwasser gelöst und anschließend sterilfiltriert.

### 2.7.8 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf MEPA-Platten (2.7.2). Aus einer zu ca. 80% bewachsenen Agarplatte wurde ein 1 cm<sup>2</sup> großes, homogen bewachsenes Agarstück steril ausgestochen und auf eine neue Agarplatte überimpft. Beimpfte Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 24 °C im Brutschrank unter Lichtausschluss inkubiert.

### 2.7.9 Vorkultur

Die Vorkulturen wurden angesetzt, indem je 1 cm<sup>2</sup> homogenes Pilzmycel einer zu ca. 80% bewachsenen Agarplatte (2.7.8) in einen 250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Vorkulturmedium (2.7.1) überführt wurde. Das Mycelstück wurde mittels Ultra-Turrax-Dispergiergerät für 30 Sekunden bei 10.000 U\*min<sup>-1</sup> homogenisiert und die Vorkultur je 7 Tage bei 24°C und 150 rpm unter Lichtausschluss kultiviert.

## **2.7.10 Hauptkultur**

Für die Hauptkulturführung wurden die Vorkulturen (2.7.9) nach 7 Tagen Wachstumsdauer mittels Ultra-Turrax-Dispergiergerät für 30 Sekunden bei  $10.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  homogenisiert und je 10 mL Inokulum in einen 250 mL Erlenmeyerkolben mit 100 mL Hauptkulturmedium überführt. Anschließend wurden die Kulturen bei  $24^\circ\text{C}$  und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

## **2.7.11 Probennahme**

### **2.7.11.1 Probennahme Überstand**

Die Entnahme von Kulturüberstand wurde mit autoklavierten Pipettenspitzen unter der Sterilbank durchgeführt. Dazu wurden 1-2 mL Überstand aus einer Hauptkultur (2.7.10) entnommen, 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $21.920 \times g$  zentrifugiert und bis zur zeitnahen Verwendung auf Eis gelagert.

### **2.7.11.2 Probennahme Mycel**

Die Entnahme von Pilzmycel für DNA- und RNA-Isolierungen wurde mit autoklavierten Pipettenspitzen unter der Sterilbank durchgeführt. Dazu wurden 2 mL Flüssigkultur (2.7.10) in zuvor autoklavierte Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $21.920 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert, das Mycel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.7.11.3 Kulturente**

Bei Abbruch der Kultivierung wurde das gesamte Kulturvolumen in Zentrifugenflaschen überführt und 10 min bei  $5.250 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Anschließend wurde der gewonnene Kulturüberstand abgetrennt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

## **2.8 Proteinbiochemische Arbeiten**

### **2.8.1 Ammoniumsulfat Fällung**

Der in (2.7.11.3) erhaltene Kulturüberstand wurde bei  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit Ammoniumsulfat unter stetigem Rühren schrittweise bis zu einer Sättigung von 80% versetzt. Anschließend wurde 30 min bei  $5.250 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in  $0,1\text{ M}$  Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 in gleichem Volumen resuspendiert und die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert.

### **2.8.2 Filtration mittels Ultrasette™**

Durch die Filtration mittels Pall Ultrasette™ wurden Bestandteile mit einem Molekulargewicht größer  $300\text{ kDa}$  abgetrennt. Dazu wurde Enzymlösung aus der Ammoniumsulfatfällung (2.8.1) unter Eiskühlung bei max. 2 bar Druck eingesetzt. Das erhaltene Filtrat wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

### **2.8.3 Konzentrierung und Umpufferung mittels Vivaflow**

Die Filtrationseinheit Sartorius Vivaflow 200 mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa wurde zur Volumenverringerung und Umpufferung bzw. Entsalzung vorgereinigter Kulturüberstände (2.8.2) bei Probenvolumina ab ca. 200 mL eingesetzt. Der angewendete Maximaldruck lag bei 1,5 bar, das Volumen wurde unter Eiskühlung auf etwa 50 mL reduziert.

Zur Umpufferung bzw. Entsalzung wurde das Volumen dreimal mit entsprechendem Puffer verdoppelt und auf das ursprüngliche Volumen eingeengt. Das entspricht einer Entsalzungsrate von 87,5%.

### **2.8.4 Konzentrierung und Umpufferung mittels Macrosep<sup>®</sup>, Microsep<sup>®</sup> oder Amicol Ultra-0.5**

Bei Probenvolumina kleiner 200 mL wurden Zentrifugiereinheiten geeigneter Größe mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Die Membran wurde durch dreimaliges Zentrifugieren mit Reinstwasser vorbereitet. Die Konzentrierung von Probenlösungen erfolgte bei 4 °C und 21.920 x *g* bis zum gewünschten Endvolumen.

Zur Umpufferung bzw. Entsalzung wurde das Volumen dreimal mit entsprechendem Puffer verdoppelt und auf das ursprüngliche Volumen eingeengt, das entspricht einer Entsalzungsrate von 87,5%.

## 2.8.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

### 2.8.5.1 Schwache Anionenaustauschchromatographie

Vorgereinigte Kulturüberstände (2.8.3) wurden im ersten Schritt über einen schwachen Anionenaustausch gereinigt. Folgende Parameter wurden dabei eingehalten (Tabelle 2.23).

Tabelle 2.23 Parameter der *Fast Protein Liquid Chromatographie* mit schwachem Anionenaustausch

<b>Gerät</b>	NGC Chromatography System mit BioFrac Fraction Collector und Interface ChromLab von BioRad	
<b>Trennsäule</b>	DEAE Sepharose™ Fast Flow 140 mL (Anion Exchange) GE Healthcare	
<b>Technik</b>	Anionenaustausch	
<b>Betriebstemperatur</b>	4°C	
<b>Eluent A</b>	0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH=6,0	
<b>Eluent B</b>	0,1 M Kaliumphosphatpuffer mit 1 M NaCl, pH=6,0	
<b>Flussrate</b>	3 mL*min <sup>-1</sup>	
<b>Modus</b>	Gradient	
<b>Gradient</b>	50 mL	Probenauftrag
	1 CV	Eluent A 100%
	2 CV	Eluent A 100%, Eluent B 0% → Eluent A 0%, Eluent B 100%
	1 CV	Eluent B 100%
	2 CV	Eluent A 100%
<b>Detektor</b>	UV-Detektor, 280 nm	
<b>Injektionsvolumen</b>	50 mL	
<b>Fraktionen</b>	24 Fraktionen à 30 mL ab Minute 12,5 gesammelt	

Es wurden 24 Fraktionen mit je 30 mL erhalten. Die Fraktionen wurden anschließend mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1) auf Peroxidaseaktivität untersucht. Die peroxidaseaktiven Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie wurden gepoolt, konzentriert, entsalzt, umgepuffert (2.8.4) und anschließend zur Größenausschlusschromatographie eingesetzt (2.8.5.2).

### 2.8.5.2 Größenausschlusschromatographie

Die gepoolten, peroxidaseaktiven Fraktionen aus 2.8.5.1 wurden in einem zweiten Aufarbeitungsschritt gemäß Tabelle 2.24 über eine Größenausschluss säule gereinigt.

Tabelle 2.24 Parameter der *Fast Protein Liquid Chromatographie* mit Größenausschluss

<b>Gerät</b>	BioRad BioLogic Duo Flow mit BioFrac Fraction Collector
<b>Trennsäule</b>	HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 prep grade (Gelfiltration) GE Healthcare (2.3.1)
<b>Technik</b>	Größenausschluss
<b>Betriebstemperatur</b>	4°C
<b>Eluent A</b>	50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH=6,0
<b>Eluent B</b>	50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 1 M NaCl, pH=6,0
<b>Flussrate</b>	0,8 mL*min <sup>-1</sup>
<b>Modus</b>	Isokratisch 85% Eluent A, 15% Eluent B
<b>Detektor</b>	UV-Detektor, 280 nm
<b>Injektionsvolumen</b>	1 mL
<b>Fraktionen</b>	86 Fraktionen mit jeweils 2 mL gesammelt

Es wurden 86 Fraktionen mit je 2 mL erhalten. Die Fraktionen wurden mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1) auf Peroxidaseaktivität untersucht. Die aktiven Fraktionen wurden konzentriert und entsalzt (2.8.4).

### 2.8.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Diese Proteinquantifizierung beruht auf dem Prinzip von Bradford (1976), hierbei bildet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau einen tiefblauen Komplex mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Aminosäuren, welche somit gut detektiert werden können. Eine modifizierte Version Roti-Nanoquant® der Firma Carl Roth wurde verwendet.

Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstelleranweisungen. Probelösungen wurden mit einer verdünnten Form der Roti-NanoQuant-Lösung versetzt und die Extinktionen bei den Wellenlängen 450 nm und 590 nm im Mikroplattenleser gegen Reinstwasser als Referenz gemessen. Über den Quotienten  $E_{590}/E_{450}$  wurde die Proteinkonzentration berechnet. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibriergerade mit verschiedenen Konzentrationen einer BSA-Lösung (Albumin Fraktion V, Carl Roth) in Reinstwasser.

### 2.8.7 UV/Vis-Spektroskopie

Das UV/Vis-Spektrum des isolierten Enzyms aus *Irpex consors* wurde in 50 mM Phosphatpuffer pH 6,0 mittels Spektralphotometer in einem Wellenlängenbereich von 250 - 550 nm aufgenommen.

### 2.8.8 Reinheitszahl

Die Bestimmung der Reinheitszahl beruht auf der Methode von Theorell & Maehly (1950). Hierbei wurden die Extinktionen bei den Wellenlängen 280 nm und 406 nm gemessen und deren Quotient gebildet.

$$RZ = \frac{E_{406}}{E_{280}}$$

$E_{406}$  Extinktion bei 406 nm

$E_{280}$  Extinktion bei 280 nm

RZ Reinheitszahl

Die Messung der Extinktionen erfolgte mittels Spektralphotometer.

## 2.8.9 Enzymassays

### 2.8.9.1 Verwendete Puffer und Lösungen

#### **Kaliumphosphatpuffer**

Der Puffer wurde mit Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat hergestellt. Je nach pH-Wert wurden die Bestandteile zu unterschiedlichen Anteilen gemischt. Verwendet wurden in dieser Arbeit Kaliumphosphatpuffer mit einer Molarität von 50 mM bzw. 100 mM.

#### **Natriumacetatpuffer**

Der Puffer wurde mit 1 M Natriumacetatlösung und 1 M Essigsäure zu unterschiedlichen Anteilen auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Anschließend wurde auf die gewünschte Pufferkonzentration von 150 mM mit Reinstwasser eingestellt.

#### **Citronensäure/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer nach McIlvaine (1921)**

Zur Herstellung dieses Puffers wurden Pufferkomponenten unterschiedlicher Konzentration verwendet, Citronensäure-Lösung mit einer Molalität von 0,1 und Dinatriumhydrogenphosphatlösung mit einer Molarität von 0,2. Der pH-Wert wurde durch Mischen der beiden Komponenten zu unterschiedlichen Anteilen eingestellt.

#### **ABTS-Lösung**

Verwendet wurde, wenn nicht abweichend beschrieben, eine 2 mM ABTS-Lösung in Reinstwasser.

### **DMP-Lösung**

Verwendet wurde, wenn nicht anders beschrieben, eine 10 mM DMP-Lösung in Ethanol.

### **Melanin-Lösung**

Eine Melanin-Stammlösung wurde mit  $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in Reinstwasser hergestellt, indem der pH-Wert schrittweise mit 1 M NaOH erhöht wurde, bis das Melanin vollständig gelöst wurde. Anschließend wurde mit 0,1 M HCl auf pH 6,0 eingestellt.

Für eine Konzentration von  $1,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  wurde der Melaninstock mit 150 mM Natriumacetatpuffer pH 3,5 verdünnt und im Assay eingesetzt.

### **$\beta$ -Carotin-, Curcumin- und Bixinlösung**

Zur Herstellung einer  $\beta$ -Carotinlösung mit einer Endkonzentration von  $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  wurden 5 mg  $\beta$ -Carotin unter Zugabe von 0,5 g Tween® 80 in 20 mL Dichlormethan gelöst. Das zugegebene Dichlormethan wurde bei 800 mbar und  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  für 10 min abrotiert und anschließend 30 mL Reinstwasser zugegeben. Durch erneutes Abrotieren bei 200 mbar und  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  für 15 min und anschließendes Austreiben unter Stickstofffluss wurden letzte Reste Dichlormethan aus der Lösung entfernt. Die erhaltene Lösung wurde quantitativ in einen 50 mL Messkolben überführt und *ad* Marke aufgefüllt. Die so hergestellte  $\beta$ -Carotinlösung wurde bei  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Lichtausschluss aufbewahrt und maximal 7 Tage verwendet. In gleicher Weise wurden die Farbstoffe Curcumin ( $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und Bixin ( $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in Lösung gebracht.

## 2.8.9.2 Peroxidaseaktivität

### 2.8.9.2.1 Bestimmung der Peroxidaseaktivität mittels ABTS

Zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität diente ein Enzymassay mit 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthioazolin-6-sulfonsäure)-diammoniumsalz (ABTS) als Substrat, modifiziert nach Eggert *et al.* (1996). Die verwendete Wasserstoffperoxidlösung wurde jeweils frisch angesetzt. Das Pipettierschema des ABTS-Assays ist in Tabelle 2.25 dargestellt.

**Tabelle 2.25 Allgemeines Pipettierschema ABTS-Assay zur Messung der Peroxidaseaktivität mittels Mikroplattenleser**

Lösung	Konzentration der Lösung	Eingesetztes Volumen	Konzentration final
Probe		20 µL	
Natriumacetatpuffer	150 mM, pH 3,6	80 µL	60 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 2 mM MnSO <sub>4</sub>	0,014 mM	50 µL	35 µM
ABTS	2 mM	50 µL	0,5 mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates ABTS gestartet und die Extinktion über 10 min bei 420 nm und 30 °C im Mikroplattenleser gemessen. Für die Korrektur der gegebenenfalls mitgemessenen Laccase wurde die Wasserstoffperoxidlösung durch eine wässrige Katalaselösung (6 U·L<sup>-1</sup>) ersetzt. Die gemessene Laccaseaktivität wurde von der Gesamtaktivität abgezogen. Die Aktivität berechnet sich anhand folgender Gleichung:

$$\text{Aktivität [U * L}^{-1}\text{]} = \frac{\Delta E_{420nm} * V_{ges} * F}{V_{Probe} * \epsilon_{ABTS(420nm)} * d}$$

$\Delta E_{420nm}$	Extinktionssteigung pro Minute
$V_{ges}$	Volumen gesamter Ansatz in [mL], hier 0,2 mL
F	Verdünnungsfaktor
$V_{Probe}$	Volumen Probe in [mL], hier 0,02 mL
$\epsilon_{ABTS(420nm)}$	Extinktionskoeffizient ABTS 0,0432 L·µmol <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>
d	Schichtdicke in [cm], hier 0,64 cm
1 U entspricht der Menge, die 1 µmol ABTS pro Minute umsetzt.	

### 2.8.9.2.2 Bestimmung der Peroxidaseaktivität mittels DMP

Die Peroxidaseaktivität wurde mit dem Substrat 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) bestimmt, modifiziert nach Wariishi *et al.* (1992). Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.26 dargestellt.

Tabelle 2.26 Allgemeines Pipettierschema DMP-Assay zur Messung der Peroxidaseaktivität mittels Mikroplattenleser

Lösung	Konzentration der Lösung	Eingesetztes Volumen	Konzentration final
Probe		20 $\mu$ L	
Natriumacetatpuffer	150 mM, pH 3,6	120 $\mu$ L	90 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 2 mM MnSO <sub>4</sub>	0,014 mM	50 $\mu$ L	35 $\mu$ M
DMP in EtOH	10 mM	10 $\mu$ L	0,5 mM

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates DMP gestartet und die Extinktion über einen Zeitraum von 10 min bei 30 °C und einer Wellenlänge von 468 nm mittels Mikroplattenleser gemessen. Die Berechnung erfolgte analog 2.8.9.2.1, der Extinktionskoeffizient betrug hierbei  $\epsilon_{\text{DMP}(468\text{nm})} = 0,0496 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 2.8.9.3 Bestimmung des pH-Optimums

Für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes der Peroxidase aus *Irpex consors* wurde eine reine Enzymlösung verwendet. Dazu wurden Peroxidaseassays mit den Substraten DMP (2.8.9.2.2) und ABTS (2.8.9.2.1) durchgeführt, wobei Natriumacetatpuffer mit variierenden pH-Werten von 3,0 bis 4,5 getestet wurden.

#### 2.8.9.4 Bestimmung des Temperaturoptimums

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde sowohl im ABTS-Assay (2.8.9.2.1) als auch im DMP-Assay (2.8.9.2.2) eine auf die entsprechende Temperatur vorgewärmte Pufferlösung verwendet und die Umsetzung ebenfalls bei entsprechender Temperatur gemessen. Der Temperaturbereich wurde von 25 °C bis 50 °C variiert.

#### 2.8.9.5 Bestimmung der optimalen Wasserstoffperoxid-Konzentration

Zur Untersuchung des Wasserstoffperoxid-Einflusses und zur Bestimmung der optimalen Wasserstoffperoxid-Konzentration wurden sowohl im ABTS-Assay (2.8.9.2.1) als auch im DMP-Assay (2.8.9.2.2) verschiedene Konzentrationen der Wasserstoffperoxid-Lösung verwendet. Die Konzentration wurde von 17,5 bis 700 µM (total) variiert, die Mangankonzentration der Lösung wurde stets konstant bei 2 mM (0,5 mM final) gehalten.

#### 2.8.9.6 Untersuchung der Enzymstabilität

Gereinigte Peroxidase in Lösung wurde mit Puffern verschiedener pH-Werte umgepuffert (Tabelle 2.27) (2.8.4).

**Tabelle 2.27** Verwendete Puffer bei der Untersuchung der Enzymstabilität

Verwendeter Puffer	pH-Wert
Natriumacetat 150 mM	3,0
Natriumacetat 150 mM	3,6
Natriumacetat 150 mM	4,0
Phosphatpuffer 150 mM	5,0
Phosphatpuffer 150 mM	6,0

Die Aktivität wurde mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2) nach 0 h, 1 h und 24 h bestimmt, die Lagerung zwischen den Untersuchungen erfolgte bei 4 °C.

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität wurde die gleiche Enzymlösung bei 30, 40 und 50 °C inkubiert und nach 0 h, 1 h und 24 h die Peroxidaseaktivität mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2) bestimmt.

### **2.8.9.7 Untersuchung der Lagerstabilität**

Zur Untersuchung der Lagerstabilität der Peroxidase wurde Enzymlösung bei 4 °C, -20 °C und -80 °C gelagert. Die Proben, welche bei -20 °C und -80 °C gelagert wurden, wurden zuvor mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Peroxidaseaktivität wurde nach 0 d, 20 d und 40 d mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2) überprüft.

### **2.8.9.8 Enzymkinetik**

Von der isolierten Peroxidase wurde die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  mit den Substraten ABTS und DMP bestimmt. Dazu wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen und gegen diese aufgetragen. Durch Anlegen einer Hyperbel konnten  $K_m$  und  $v_{max}$  direkt bestimmt werden.

### **2.8.9.9 Bestimmung der Glucoseoxidaseaktivität mittels ABTS**

Die verwendete Glucoseoxidase (GOX) wurde kommerziell über Serva (Heidelberg) für den Einsatz in 2-Enzym-Systemen mit der gereinigten Peroxidase aus *Irpex consors* erworben. Um die optimalen Verhältnisse der beiden Enzyme zu bestimmen, musste die Aktivität der Glucoseoxidase bei den angestrebten Umsetzungsbedingungen ermittelt werden.

Hierzu wurde ein gekoppelter ABTS-Assay mit MsP1 eingesetzt. Dabei wurde MsP1 im Überschuss eingesetzt und der Assay ohne Wasserstoffperoxidlösung durchgeführt. Die Durchführung erfolgte mit Glucose im Überschuss. Somit konnte die Aktivität der GOX indirekt berechnet werden. Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.28 dargestellt.

**Tabelle 2.28 Pipettierschema ABTS-Assay im 2-Enzym-System zur indirekten Messung der Glucoseoxidaseaktivität mittels Mikroplattenleser**

	Probe in [ $\mu$ L]	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
Glucoseoxidase 344 mg*L <sup>-1</sup>	25	-	25	25
MsP1 MaxiBright® 1:10	20	20	-	20
Natriumacetatpuffer 150 mM	80	80	80	80
ABTS 2 mM	50	50	50	50
Glucose 40 mM in Mangansulfat 4 mM	25	25	25	-
Reinstwasser	-	25	20	25

Da der pH-Bereich des angestrebten 2-Enzym-Systems im Sauren, möglichst am pH-Optimum der Peroxidase, liegen sollte, wurde die Glucoseoxidaseaktivität bei den pH-Werten 3,2; 3,6; 4,0 und 4,5 ermittelt.

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Glucoselösung gestartet und die Extinktion 15 min bei 420 nm und 30 °C mittels Mikroplattenleser aufgenommen. Die Berechnung der Aktivität erfolgte analog 2.8.9.2.1.

## 2.8.10 Enzymatischer Abbau verschiedener Substrate

### 2.8.10.1 Umsetzung von Melanin

#### 2.8.10.1.1 Etablierung eines 2-Enzym-Systems mit Glucoseoxidase

In diesem 2-Enzym-System sollte Wasserstoffperoxid, welches von der eingesetzten Peroxidase benötigt wird, *in-situ* durch GOX produziert werden. Die kontinuierliche Produktion von Wasserstoffperoxid sollte damit eine stetig optimale Konzentration gewährleisten. Als Substrat wurde in diesem Fall Glucose für die Glucoseoxidase benötigt.

Um die optimalen Verhältnisse der Glucoseoxidase-Aktivität und der Peroxidase-Aktivität zu ermitteln, wurden Vorversuche (2.8.9.9) durchgeführt.

Bei der Durchführung wurde die Peroxidase-Konzentration konstant gehalten, während die GOX-Konzentration variiert wurde. Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.29 dargestellt.

Tabelle 2.29 Pipettierschema DMP-Assay im 2-Enzym-System zur Optimierung der Enzymverhältnisse

	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Glucoseoxidase (variierend, siehe Tabelle 2.30)	20
Peroxidase <sup>1</sup> 5 U $\cdot$ L <sup>-1</sup>	20
Natriumacetatpuffer pH 3,6 150 mM	125
Glucose 40 mM in MnSO <sub>4</sub> 4 mM	25
2,6-Dimethoxyphenol 10 mM in Ethanol	10

<sup>1</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2)

Eine Kontrolle wurde mitgeführt, indem GOX und Glucose durch Wasserstoffperoxid (14  $\mu\text{M}$ ) ersetzt wurden.

Folgende Aktivitäten wurden gemäß Tabelle 2.30 eingesetzt.

**Tabelle 2.30** Verhältnisse der eingesetzten Aktivitäten der putativen versatilen Peroxidase (pVP) und der Glucoseoxidase (GOX) im 2-Enzym-System

Aktivität pVP <sup>1</sup> [U*L <sup>-1</sup> ]	Aktivität GOX [U*L <sup>-1</sup> ]	Verhältnis F
5	2,5	0,5
5	5	1
5	7,5	1,5
5	10	2
5	25	5
5	37,5	7,5
5	50	10
5	100	20

<sup>1</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2)

Die Umsetzung wurde über einen Zeitraum von 60 min bei 30 °C und 468 nm mittels Mikroplattenleser aufgenommen.

### 2.8.10.1.2 Photometrische Messung des Melaninabbaus im 2-Enzym-System

Bei der Umsetzung von Melanin im 2-Enzym-System wurden ebenfalls mehrere Aktivitätsverhältnisse getestet, das Pipettierschema war wie folgt (Tabelle 2.31).

**Tabelle 2.31** Pipettierschema Melanin-Assay im 2-Enzym-System

	Volumen [µL]
Glucoseoxidase	40
Peroxidase <sup>1</sup> 5 U*L <sup>-1</sup>	40
Melanin 1,5 mg*L <sup>-1</sup> in Natriumacetatpuffer pH 3,6 150 mM	95
Glucose 100 mM in MnSO <sub>4</sub> 4 mM	25

<sup>1</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2)

Ein Blindwert wurde mitgeführt, indem GOX und die putative versatile Peroxidase durch Puffer ersetzt wurden.

Folgende Aktivitäten wurden eingesetzt (Tabelle 2.32).

Tabelle 2.32 Verhältnisse der eingesetzten Aktivitäten der pVP und GOX im 2-Enzym-System zum Melaninabbau

Aktivität pVP <sup>1</sup> [U*L <sup>-1</sup> ]	Aktivität GOX <sup>2</sup> [U*L <sup>-1</sup> ]	Verhältnis F
150	3,75	0,025
150	18,75	0,125
150	37,5	0,25
150	150	1
150	750	5

<sup>1</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2)

<sup>2</sup>Glucoseoxidaseaktivität gemessen mittels ABTS-Assay (2.8.9.9)

Die Umsetzung wurde durch Zugabe der Glucoselösung gestartet und über einen Zeitraum von 6 h bei 30 °C und bei den Wellenlängen 475 nm und 540 nm mittels Mikroplattenleser aufgenommen.

### 2.8.10.2 Umsetzung weiterer natürlicher Farbstoffe

Das Screening zur Umsetzung der Farbstoffe Indigocarmin,  $\beta$ -Carotin, Bixin und Curcumin durch die isolierte Peroxidase wurde mit dem Pipettierschema nach Tabelle 2.33 umgesetzt. Dabei wurde von Indigocarmin direkt eine wässrige Lösung angesetzt. Die anderen Farbstoffe wurden analog 2.8.9.1 in wässrige Lösung gebracht. Die Konzentration des Farbstoffs Bixin betrug abweichend von den anderen Farbstofflösungen 0,2 g\*L<sup>-1</sup>.

Tabelle 2.33 Pipettierschema zur Untersuchung des Abbaus natürlicher Farbstoffe

	Volumen [ $\mu\text{L}$ ]
Farbstofflösung <sup>1</sup> 0,1 g*L <sup>-1</sup>	300
Peroxidase <sup>2</sup> 70 U*L <sup>-1</sup> *	40
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,14 mM in MnSO <sub>4</sub> 2 mM	375
Natriumacetatpuffer 150 mM pH 3,6	25

<sup>1</sup>Konzentration Bixinlösung 0,2 g\*L<sup>-1</sup>

<sup>2</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1)

Nach einer Umsetzungsdauer von 60 min bei 24 °C und 150 rpm wurden die Ansätze bei den Wellenlängen maximaler Extinktion im Spektralphotometer gemessen. Als Negativkontrollen dienten Ansätze, bei denen die Peroxidase durch gleiche Volumina Reinstwasser ersetzt wurden.

### 2.8.10.3 Umsetzung von $\beta$ -Carotin

#### 2.8.10.3.1 Messung des $\beta$ -Carotinabbaus im L\*a\*b\*-Farbraum

Die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin erfolgte im 2-Enzym-System, der Abbau wurde mittels AvaSpec Spektrometer verfolgt. Mittels L\*a\*b\*-Farbraumsystem können wahrnehmbare Farben gemessen werden. Das Farbsystem ist über EN ISO 11664-4:2012-06 „Farbmetrik-Teil 4: CIE 1976 L\*a\*b\* Farbenraum“ (ISO 11664-4:2008) (deutsche Fassung EN ISO 11664-4:2011) genormt, dabei können Farben geräteunabhängig ausgedrückt werden. Das Farbmodell besteht aus drei Dimensionen, welche jeweils auf der Gegenfarbentheorie beruhen. Die a-Koordinate verläuft von grün im negativen Bereich bis rot im positiven Bereich. Die b-Koordinate stellt blau im negativen und gelb im positiven Bereich dar und die L-Koordinate ist die Dimension für Helligkeit, welche im Negativen die Dunkelheit und im Positiven die Helligkeit ausdrückt.

Zu Beginn der Transformation von  $\beta$ -Carotin wurde ein positiver b-Wert nahe einem Wert von 100 gemessen, welcher einer optisch deutlich sichtbaren Gelbfärbung entspricht. Im Laufe der Umsetzung, also beim Abbau des Farbstoffes, sollte somit eine Abnahme des b-Wertes gemessen werden.

Das Pipettierschema ist in Tabelle 2.34 dargestellt.

**Tabelle 2.34 Pipettierschema  $\beta$ -Carotin-Abbau im 2-Enzym-System zur Messung mittels AvaSpec Spektrometer**

	2-Enzymsystem	pVP Kontrolle	Negativkontrolle
Natriumacetatpuffer pH 3,6 150 mM	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL
$\beta$ -Carotinlösung 0,1 g*L <sup>-1</sup> (2.8.9.1)	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Peroxidase <sup>1</sup> 100 U*L <sup>-1</sup>	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L	-
Glucoseoxidase 100 U*L <sup>-1</sup>	300 $\mu$ L	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,4 mM in 2 mM MnSO <sub>4</sub>	-	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L
Glucose 100 mM in 2 mM MnSO <sub>4</sub>	150 $\mu$ L	-	-
Reinstwasser	-	300 $\mu$ L	600 $\mu$ L

<sup>1</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2)

Die Messungen wurden mit den folgenden Parametern durchgeführt (Tabelle 2.35).

**Tabelle 2.35 Parameter der Messungen des  $\beta$ -Carotinabbaus mittels AvaSpec Spektrometer**

Schwarzabgleich	Kamera aus
Weißabgleich	Verwendeter Puffer
Referenz	Verwendeter Puffer
Integration time	40 s
Average	10
Messdauer	180 min

### 2.8.10.3.2 Gaschromatographische Analyse der flüchtigen $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte

Die durch den  $\beta$ -Carotinabbau entstehenden flüchtigen, teilweise aromarelevanten Abbauprodukte wurden mittels HS-SPME-GC-MS und mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS analysiert.

### 2.8.10.3.3 Analyse der flüchtigen $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte mittels HS-SPME-GC-MS

Die Transformation von  $\beta$ -Carotin wurde für 30 min bei 24 °C nach Pipettierschema Tabelle 2.36 durchgeführt.

Tabelle 2.36 Pipettierschema des  $\beta$ -Carotinabbaus zur Identifizierung der Abbauprodukte mittels HS-SPME-GC-MS

	Volumen [ $\mu$ L]
$\beta$ -Carotinlösung 0,1 g*L <sup>-1</sup> (2.8.9.1)	1000
Wasserstoffperoxid 14 $\mu$ M	1250
Peroxidase <sup>1</sup> 17 U*L <sup>-1</sup>	250
Natriumacetatpuffer pH 3,6 150 mM	2500
Thymol 9,2 mg*L <sup>-1</sup>	85

<sup>1</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1)

Negativkontrollen wurden mitgeführt, bei denen die Volumenanteile der Peroxidaselösung durch gleiche Teile Puffer ersetzt wurden.

Anschließend wurden die flüchtigen Substanzen mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) extrahiert und gaschromatographisch-massenspektrometrisch getrennt und identifiziert. Zwischen den einzelnen Analysen wurde die Faser bei 250 °C für 19 min ausgeheizt. Die Parameter waren wie folgt (Tabelle 2.37).

Tabelle 2.37 Parameter der gaschromatographischen Analyse der  $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte mittels HS-SPME-GC-MS

GC	Agilent 7890A (Agilent Technologies), (Tabelle 2.11)
Trennsäule	Agilent Technologies, VF-WAXms; 30 m x 250 $\mu$ m x 0,25 $\mu$ m
Trärgas	Helium, 1,2 mL*min <sup>-1</sup> konstant
Faserbeschichtung	DVB/CAR/PDMS
Inkubationszeit	30 min
Schüttelgeschwindigkeit	250 rpm
Extraktionsdauer	30 min
Extraktionstemperatur	75 °C
Eindringtiefe Vial	24 mm
Eindringtiefe Injektor	54 mm
Desorptionsdauer	60 s
Temperatur Ausheizen Faser	250 °C
Pause vor/nach Ausheizen	5 min
Eindringtiefe Ausheizen Faser	43 mm
Splitverhältnis	splitlos
Tranfertemperatur	75 °C
Injektortemperatur	250 °C
Liner	Supelco SPME-Liner
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C*min <sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min)
Temperatur Transfer Line	250 °C
Detektor	Massenspektrometer Agilent Technologies 5975C VL MSD
Massenbereich	<i>m/z</i> 33-300
Schwelle	100

### 2.8.10.3.4 Analyse der flüchtigen $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS

Das Pipettierschema des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2.38 dargestellt.

Tabelle 2.38 Pipettierschema des  $\beta$ -Carotinabbaus zur Identifizierung der Abbauprodukte mittels SBSE-TDU-CIS-GS-MS

	Volumen [ $\mu$ L]
$\beta$ -Carotinlösung 0,1 g*L <sup>-1</sup> (2.8.9.1)	1000
Wasserstoffperoxid 14 $\mu$ M	1250
Peroxidase <sup>1</sup> 17 U*L <sup>-1</sup>	125
Natriumacetatpuffer pH 3,6 150 mM	2625
Thymol 9,2 mg*L <sup>-1</sup>	50

<sup>1</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1)

Die Inkubationsdauer betrug 60 min. Anschließend wurde bei Raumtemperatur und mittlerer Rührgeschwindigkeit für 180 min mittels Twister extrahiert, die verwendeten Braunglasvials wurden mit Silicon/PTFE Caps verschlossen. Für die Analyse mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS wurden folgende Parameter eingehalten (Tabelle 2.39).

**Tabelle 2.39 Parameter der gaschromatographischen Analyse der  $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS**

GC	Agilent 7890B (Agilent Technologies), (Tabelle 2.12)
Trennsäule	Agilent Technologies, VF-WAXms; 30 m x 250 $\mu$ m x 0,25 $\mu$ m
Trärgas	Helium, 1,2 mL*min <sup>-1</sup> konstant
Stir Bar Beschichtung	PDMS
Inkubationszeit	60 min
Extraktionsdauer	180 min
Extraktionstemperatur	Raumtemperatur
Thermodesorptionseinheit (TDU)	40 °C
Starttemperatur	
TDU Temperaturprogramm	120 °C*min <sup>-1</sup> auf 250 °C (10 min)
TDU Transfertemperatur	250 °C (fixed)
TDU Desorption	splitlos
Kaltaufgabesystem (KAS) Starttemperatur	-100 °C
KAS Temperaturprogramm	12 °C*s <sup>-1</sup> auf 250 °C (5 min)
PTV Inlet Modus	Solvent Vent
Purge Flow zu Slit Vent	12 mL*min <sup>-1</sup> ab 0 min
Vent Flow	40 mL*min <sup>-1</sup>
Splitverhältnis	10
Injektortemperatur	250 °C
Liner	Supelco SPME-Liner
Temperaturprogramm	40 °C (3 min), 5 °C*min <sup>-1</sup> auf 240 °C (12 min)
Temperatur Transfer Line	250 °C
Detektor	Massenspektrometer Agilent Technologies 5975C VL MSD
Massenbereich	<i>m/z</i> 33-300
Schwelle	0

### 2.8.10.3.5 Identifizierung der Abbauprodukte mittels Kováts-Indices

Kováts-Indices nach dem Prinzip von Kováts (1958) dienen zum geräteunabhängigen Vergleich von Analytsubstanzen in der Gaschromatographie. Hierbei wird die Retentionszeit eines Analyten ins Verhältnis zu den Retentionszeiten einer Standardalkanreihe gesetzt. Die Ermittlung der Retentionszeiten erfolgte an einer polaren Säule (Tabelle 2.13). Die Berechnung der Kováts-Indices erfolgte anhand folgender Gleichung:

$$KI = 100 * N + 100 * z \frac{\log_{t'A} - \log_{t'N}}{\log_{t'n} - \log_{t'N}}$$

- N Anzahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans
- n Anzahl der C-Atome des vor dem Analyten eluierenden Alkans
- z Differenz zur Zahl der C-Atome des nach dem Analyten eluierenden Alkans
- A Analyt
- t' Nettoretentionszeit [min] = Bruttoretentionszeit [min] – Totzeit [min]

### 2.8.10.3.6 Quantifizierung ausgewählter identifizierter Substanzen mittels

#### Response-Faktor $R_f$

Die Quantifizierung zweier ausgewählter Abbauprodukte erfolgte über den internen Standard Thymol. Durch Erstellen einer externen Kalibriergerade mit variierenden Konzentrationen der Analytsubstanzen bei konstanter Konzentration des internen Standards Thymol wurde der Response-Faktor  $R_f$  wie folgt berechnet:

$$R_f = \frac{M_A * A_{IS}}{M_{IS} * A_A}$$

$R_f$	Response-Faktor
$M_A$	Masse Analyt
$A_{IS}$	Fläche interner Standard (Thymol)
$M_{IS}$	Masse interner Standard (Thymol)
$A_A$	Fläche Analyt

Folgende Konzentrationen der wässrigen Standard- und Analytsubstanzen wurden eingesetzt (Tabelle 2.40).

Tabelle 2.40 Eingesetzte Konzentrationen der Standardlösungen und des internen Standards zur Berechnung der Response-Faktoren

	$\beta$ -Cyclocitral		$\beta$ -Ionon		Thymol (interner Standard)	
	Konzentration [mg*L <sup>-1</sup> ]	Eingesetztes Volumen [ $\mu$ L]	Konzentration [mg*L <sup>-1</sup> ]	Eingesetztes Volumen [ $\mu$ L]	Konzentration [mg*L <sup>-1</sup> ]	Eingesetztes Volumen [ $\mu$ L]
<b>Kal1</b>	246	50	103	200	9,2	50
<b>Kal2</b>	246	75	103	300	9,2	50
<b>Kal3</b>	246	100	103	350	9,2	50
<b>Kal4</b>	246	150	103	400	9,2	50
<b>Kal5</b>	246	200	103	450	9,2	50

Die in Tabelle 2.40 eingesetzten Volumina der Standardsubstanzen wurden *ad* 5 mL mit 75 mM Natriumacetatpuffer pH 3,6 aufgefüllt und analog 2.8.10.3.3 und 2.8.10.3.4 zu den jeweiligen Extraktionsmethoden und anschließenden gaschromatographischen Untersuchungen eingesetzt.

Anhand der somit berechneten Response-Faktoren konnten die Analytkonzentrationen in den Proben anhand des internen Standards Thymol berechnet werden.

## 2.9 Elektrophorese-Techniken

Unter Verwendung elektrophoretischer Techniken können Proteine und Nucleinsäuren analysiert und charakterisiert werden. In dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung von Nucleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese (McDonell *et al.* 1977, Southern 1979), die Trennung von Proteinen erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), (Laemmli 1970).

### 2.9.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzte Lösungen:

#### 50x TAE-Puffer

Tabelle 2.41 Zusammensetzung 50x TAE-Puffer

Tris	242 g*L <sup>-1</sup>
Essigsäure 100%	57,1 mL*L <sup>-1</sup>
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 mL*L <sup>-1</sup>

Der 50-fach konzentrierte Puffer wurde vor Verwendung 1:50 in VE-Wasser verdünnt (entspricht 1x TAE-Puffer).

**Tabelle 2.42** Verwendete Marker und Färbungen für die Agarose-Gelelektrophorese

<b>Marker</b>	100 bp-DNA-Ladder (Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe)
	1 kbp-DNA-Ladder (Carl Roth)
<b>Färbung</b>	Midori green direct (Nippon Genetics Europe, Düren)

Für die Herstellung der Agarosegele wurde eine entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde die Agaroselösung nach kurzer Abkühlzeit in den horizontalen Gelschritten gegossen und für die Taschen ein entsprechender Kamm eingesetzt. Nach vollständigem Erkalten wurde das so gefertigte Gel beladen und für die Gelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt, der Kamm entfernt und die Proben in die Taschen pipettiert.

Bei den Durchführungen wurden zwei verschiedene Gelgrößen verwendet, kleine Gele mit einem Volumen von 56 mL und große Gele à 168 mL.

Die Agarosekonzentrationen variierten je nach Targetgröße zwischen 1% (für Targets > 2 kb) und 3% (RNA-Kontrollgele, Targets <2 kb). Die Elektrophorese wurde, je nach Gelgröße und Agarosekonzentration, zwischen 80-120 V durchgeführt.

Die Geldokumentation erfolgte mittels Decon Science Tec UV-Transilluminator (312 nm) und DeVision G 2.0 Software.

## 2.9.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Verwendet wurde die Apparatur Mini-Protean® Tetra von BioRad Laboratories GmbH. Folgende Lösungen wurden, sofern nicht anders beschrieben, mit Reinstwasser angesetzt und verwendet (modifiziert nach Laemmli 1970).

#### 4x Lower Tris

Tabelle 2.43 Zusammensetzung 4x Lower Tris

Tris-Base	181,7 g*L <sup>-1</sup>
SDS	4 g*L <sup>-1</sup>

Die Lösung wurde mittels 1 M NaOH auf pH 8,8 eingestellt.

#### 4x Upper Tris

Tabelle 2.44 Zusammensetzung 4x Upper Tris

Tris-Base	60,55 g*L <sup>-1</sup>
SDS	4 g*L <sup>-1</sup>

Die Lösung wurde mittels 1 M NaOH auf pH 6,8 eingestellt.

#### Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS-Lösung)

Ammoniumperoxodisulfat	400 g*L <sup>-1</sup>
------------------------	-----------------------

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### Dithiothreitol-Lösung (DTT-Lösung)

Dithiothreitol	154,25 g*L <sup>-1</sup>
----------------	--------------------------

Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### 10x Laufpuffer

Tabelle 2.45 Zusammensetzung 10x Laufpuffer

Tris-Base	30,2 g*L <sup>-1</sup>
SDS	10 g*L <sup>-1</sup>
Glycin	144,2 g*L <sup>-1</sup>

Der Laufpuffer wurde mit VE-Wasser angesetzt und vor Verwendung 1:10 mit VE-Wasser verdünnt (1x Laufpuffer).

### Auftragspuffer

**Tabelle 2.46 Zusammensetzung Auftragspuffer für die SDS-PAGE**

Tris-HCl 1 M pH 6,8	1 mL
SDS-Lösung 20% (w/v)	2 mL
Bromphenolblau	20 mg
Glycerol	2,3 mL

Die Lösung wurde mit VE-Wasser *ad* 8 mL aufgefüllt und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2.47 Verwendete Marker für die SDS-PAGE**

<b>Marker</b>	Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt)
	PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher)

Das Trenngel wurde mit einer Gesamtkonzentration von Acrylamid und Bisacrylamid von 12% gefertigt, das Sammelgel mit einer Gesamtkonzentration von 6%. Die Cross-Linkerkonzentration betrug 2,6%. Angesetzt wurde das Gel wie folgt:

**Tabelle 2.48 Zusammensetzung Sammelgel und Trenngel der denaturierenden SDS-PAGE**

	Sammelgel 6%	Trenngel 12%
Reinstwasser	1,8 mL	2,7 mL
Lower-Tris	-	1,5 mL
Upper-Tris	750 µL	-
Rotiporese-Gel 40 (37,5:1)	450 µL	1,8 mL
APS-Lösung	10 µL	15 µL
TEMED	4 µL	7,5 µL

Zu 15 µL Probe wurden je 12 µL Probenauftragspuffer gegeben und 5 min bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurde auf Eis abgekühlt und 3 µL 1 M DTT-Lösung zugegeben. Pro Probentasche wurden je 30 µL Probe eingesetzt. Das Gel wurde, nach Einsetzen in die Gelkammer und vollständigem Auffüllen der Kammer mit 1x Laufpuffer, beladen und die Elektrophorese gestartet. Die Stromstärke zur Trennung betrug 10 mA pro Gel bis zum Erreichen der Probe des Trenngels, danach 20 mA pro Gel bis Auslaufen des Bromphenolblaus aus dem Gel.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese sofort zur Coomassie-Färbung (2.10.1 bzw. 2.10.2) eingesetzt.

Zur Bestimmung der molekularen Massen wurde ein Proteinstandard mitgeführt (5 µL pro Probentasche), anhand welchem die molekularen Massen der Proteine berechnet wurden.

### **2.9.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Für die Isoelektrische Fokussierung wurden SERVAGel™ IEF 3-10 Gele von SERVA Elektrophorese GmbH (Heidelberg) verwendet. Das Material besteht hierbei aus Acrylamid /N,N'-Methylenbisacrylamid mit einer Schichtdicke von 1 mm. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben, die verwendeten Lösungen wurden ebenfalls von SERVA bezogen.

Tabelle 2.49 Verwendete Puffer und Marker bei der isoelektrischen Fokussierung

<b>Kathodenpuffer</b>	SERVA cathode buffer (Serva Gelelektrophorese GmbH, Heidelberg)
<b>Anodenpuffer</b>	SERVA anode buffer
<b>Probenauftragspuffer</b>	SERVA IEF sample buffer (2x)
<b>Marker</b>	SERVA IEF Marker 3-10, liquid Mix Amersham™ IEF Calibration Kit Low Range pI (pH2.5-6.5) (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg)

Nach Einsetzen des Gels in die Elektrophoresekammer wurde die Innenkammer mit Kathodenpuffer gefüllt und nach Entfernen des Kamms die Taschen ebenfalls mit Kathodenpuffer vorgespült. Je 20 µL Probe wurden mit 10 µL Probenauftragspuffer versetzt und 30 µL pro Proben tasche eingesetzt. Nach Auffüllen der Außenkammer mit Anodenpuffer wurde unter Kühlung (4,0 °C) die Elektrophorese unter den folgenden Bedingungen durchgeführt (Tabelle 2.50).

Tabelle 2.50 Elektrophoreseprogramm der isoelektrischen Fokussierung

Spannung [V]	Dauer des Elektrophoreseschrittes [min]
50	60
200	60
500	30

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel sofort zur Färbung (2.10.1 bzw. 2.10.2 bzw. 2.10.3) eingesetzt.

## 2.10 Gelfärbungen

Die SDS-PAGE-Gele und IEF-Gele wurden mit folgenden Methoden gefärbt, die Geldokumentation erfolgte mittels Bio 5000 Microtec Scanner von Serva (Heidelberg).

### 2.10.1 Coomassie-Färbung

#### Fixierlösung

Tabelle 2.51 Zusammensetzung der Fixierlösung für Coomassie-Färbung

Methanol (v/v)	50%
Methansäure (v/v)	10%
VE-Wasser (v/v)	40%

#### Färbelösung

Tabelle 2.52 Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung

Methanol (v/v)	50%
Ameisensäure (v/v)	10%
VE-Wasser (v/v)	40%
Coomassie® Brilliant Blue R 250 (w/v)	0,25%

#### Entfärbelösung

Tabelle 2.53 Zusammensetzung der Entfärbelösung für die Coomassiefärbung

Methanol (v/v)	55%
Ameisensäure (v/v)	7,5%
VE-Wasser (v/v)	87,5%

Das Gel wurde für mindestens 30 min in Fixierlösung gegeben. Danach wurde das Gel in Färbelösung geschwenkt, bis es komplett mit Coomassie eingefärbt war (ca. 2 - 4 h). Dabei lagert sich Coomassie® Brilliant Blue an basische Seitenketten der Aminosäuren an und färbt somit Proteine sichtbar an. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung gegeben, bis der Hintergrund entsprechend entfärbt und die Banden gut sichtbar wurden (4 - 24 h).

### 2.10.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Färbemethode mit kolloidaler Coomassie erforderte keine Fixierlösung. Die Färbelösung setzte sich wie folgt zusammen (Tabelle 2.54).

#### Färbelösung

Tabelle 2.54 Zusammensetzung der Färbelösung der kolloidalen Coomassiefärbung

Coomassie® Brilliant Blue G 250	1 g*L <sup>-1</sup>
Ethanol (v/v)	10%
Aluminiumsulfat	50 g*L <sup>-1</sup>
Phosphorsäure 85% (v/v)	2%

Die Lösung wurde in entsprechender Reihenfolge angesetzt, über Nacht gerührt und nach Filtrieren unter Lichtausschluss gelagert.

Das Gel wurde in Färbelösung gegeben und so lange entwickelt, bis Banden gut sichtbar wurden. Anschließend wurde der Hintergrund mit Reinstwasser weitgehend entfärbt.

### 2.10.3 ABTS-Aktivitätsfärbung

Die Aktivitätsfärbungen mit ABTS wurden mit IEF-Gelen durchgeführt.

Hierzu wurde das Gel in 50 mL einer 2,5 mM ABTS-Lösung, gelöst in Natriumacetatpuffer 150 mM pH 3,5, gegeben. Beim Vorhandensein von Laccasen färben sich diese Banden bereits im ersten Schritt grün. Anschließend wurden 36 µL einer 3%-igen Wasserstoffperoxidlösung zugegeben. Dadurch wurden vorhandene Peroxidase-Banden sichtbar. Die Gele wurden sofort dokumentiert. Die Aktivitätsfärbungen mit ABTS erfolgten stets durch doppeltes Auftragen der Proben. Nach Teilen des Geles wurde die eine Hälfte des Gels mit Coomassie-Färbung, die andere Hälfte mit ABTS-Aktivitätsfärbung behandelt. Durch Aneinanderlegen der getrennt gefärbten Gelhälften konnten den Banden der ABTS-Färbung durch den mit Coomassie gefärbten Marker die entsprechenden isoelektrischen Punkte zugeordnet werden.

## 2.11 Molekularbiologische Arbeiten

### 2.11.1 Primerableitung

Geeignete Primer wurden, wenn möglich, direkt aus der bekannten Sequenz abgeleitet. Als Referenzgen geeignete Gene, welche bereits bei *Pleurotus ostreatus* angewendet wurden (Castanera *et al.* 2012, Castanera *et al.* 2015), wurden durch Abgleich der entsprechenden Nukleotidsequenzen aus *Cerrena unicolor* bezogen, da das Genom von *Cerrena unicolor* vollständig bekannt ist.

Aufgrund der hohen Homologie von *Irpex consors* zu *Cerrena unicolor* konnten die somit gewählten Gensequenzen von *Cerrena unicolor* für die erste Primerableitung verwendet werden. Diese Primer wurden für Polymerase-Kettenreaktionen mit genomischer DNA (2.11.4) aus *Irpex consors* eingesetzt.

War die Durchführung erfolgreich und die genaue Sequenz des Gens aus *Irpex consors* erhalten, konnten dort passgenaue, nach Möglichkeit exonübergreifende Primer abgeleitet werden.

## 2.11.2 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die jeweiligen Konzentrationen der gewonnenen RNA (2.11.5) und DNA (2.11.4) wurden mittels Nanophotometer™ Pearl aus den Extinktionen  $E$  bei den Wellenlängen 260 nm, 280 nm und 320 nm berechnet. Die Extinktion bei 260 nm misst die Konzentration der Nucleinsäuren. Aus dem Quotienten der Extinktionen 260 nm/280 nm lässt sich die Reinheit der eingesetzten Probelösung berechnen; für DNA-Lösungen liegt dieser optimal bei 1,8, für RNA-Lösungen bei 2,0. Über die Extinktion bei 320 nm lässt sich die Trübung messen.

## 2.11.3 Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff

Das durch 2.7.11.2 gewonnene, tiefgefrorene Pilzmycel wurde mittels Mörser und Pistill unter Stickstoffkühlung aufgeschlossen und sofort für die weitere Verwendung (RNA- bzw. DNA-Isolierung) eingesetzt. Wurde RNA isoliert, wurden Mörser und Pistill zuvor 4 h bei 500 °C im Muffelofen ausgeglüht.

## 2.11.4 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung der DNA aus isoliertem Pilzmycel (2.7.11.2) wurden folgende Lösungen verwendet (Tabelle 2.55).

### Lysis-Puffer

Tabelle 2.55 Zusammensetzung Lysis-Puffer zur DNA-Isolierung

Tris HCl pH 8,0	400 mM
EDTA pH 8,0	60 mM
NaCl	150 mM
SDS (w/v)	1%

**Kaliumacetat-Lösung**

---

Kaliumacetat pH 4,8	3 M
---------------------	-----

---

Die Durchführung erfolgte mit durch flüssigen Stickstoff aufgeschlossenem Mycel gemäß folgender Anleitung (Tabelle 2.56).

**Tabelle 2.56 Allgemeiner Arbeitsablauf der DNA-Isolierung**

---

Ca. 4 Microspatel gemörstertes Mycel mit 500 µL Lysispuffer versetzen, vortexen
10 min bei Raumtemperatur inkubieren
150 µL Kaliumacetat-Lösung zugeben, vortexen
10 min bei 13.000 x <i>g</i> und Raumtemperatur zentrifugieren
Überstand (ca. 600 µL) in ein neues Reaktionsgefäß überführen
600 µL Isopropanol zugeben, vortexen
10 min bei 13.000 x <i>g</i> und Raumtemperatur zentrifugieren
Überstand verwerfen
Pellet in 500 µL 70%-igem Ethanol waschen
1 min bei 13.000 x <i>g</i> und Raumtemperatur zentrifugieren
Überstand verwerfen
Pellet über Kopf lufttrocknen
Pellet in 40 µL autoklaviertem Reinstwasser resuspendieren

---

Auf diese Weise gewonnene DNA-Isolate wurden nach einer Konzentrationsbestimmung (2.11.2) sofort weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

### **2.11.5 Isolierung der RNA**

Die Isolierung der RNA aus gemörserten Pilzmycel-Proben (2.11.3) wurde sofort im Anschluss mittels RNeasy® Plant Mini Kit von Quiagen durchgeführt. Die Aufbereitung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Verwendet wurde hierbei der im Kit enthaltene Puffer RLT, welcher vor Verwendung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt wurde. Eluiert wurde die RNA mit 30-50  $\mu$ L RNase-freiem Reinstwasser (Eluat A), gegebenenfalls wurde eine zweite Elution durchgeführt (Eluat B). Nach der Konzentrationsbestimmung des gewonnenen Isolats (2.11.2) wurde dieses, wenn nicht sofort weiterverwendet, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.11.6 Überprüfung der RNA-Qualität**

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde mit den gewonnenen RNA-Isolaten (2.11.5) eine Agarose-Gelelektrophorese in einem 3%-igen Agarosegel durchgeführt (2.9.1). Hierbei sollten, bei guter RNA-Qualität, die 18S- und 28S-Banden deutlich vorhanden sein. Verschmierte und verlaufene Banden deuten auf Zersetzung der RNA hin.

### 2.11.7 DNA-Verdau mit anschließender Phenol-Chloroform-Fällung

Für den DNA-Verdau DNA-kontaminierter RNA-Isolate (2.11.5) wurde das RNase freie DNase Set von Qiagen verwendet, die Durchführung erfolgte nach folgendem Schema (Tabelle 2.57).

**Tabelle 2.57 Allgemeiner Arbeitsablauf eines DNA-Verdaus mit anschließender Phenol/Chloroformfällung von DNA-kontaminierten RNA-Proben**

---

≤87,5 µL RNA-Lösung mit 10 µL Puffer RDD und 2,5 µL DNase versetzen
15 min bei Raumtemperatur inkubieren
Auf 200 µL Gesamtvolumen mit RNase freiem Reinstwasser auffüllen
400 µL Phenol/Chloroform zugeben, vortexen
5 min bei 13.000 x <i>g</i> und Raumtemperatur zentrifugieren
Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
400 µL Phenol/Chloroform zugeben, vortexen
5 min bei 13.000 x <i>g</i> und Raumtemperatur zentrifugieren
Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
200 µL Chloroform/Iso-Amylalkohol (24:1) zugeben, vortexen
5 min bei 13.000 x <i>g</i> und Raumtemperatur zentrifugieren
Obere, wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen
25 µL Natriumacetatpuffer 3 M pH 4,5 und 900 µL Ethanol 95% zugeben
1 h bei -80 °C ausfrieren
30 min bei 13.000 x <i>g</i> und 4 °C zentrifugieren
Überstand verwerfen und Pellet in Ethanol 70% waschen
10 min bei 13.000 x <i>g</i> und 4 °C zentrifugieren
Pellet komplett trocknen <sup>1</sup>
Pellet in 30-50 µL RNase-freiem Reinstwasser lösen

---

<sup>1</sup>bei 50 °C im Heizblock oder mittels SpeedVac

Nach einer Konzentrationsbestimmung (2.11.2) der DNA-freien RNA wurden diese, wenn nicht sofort weiterverwendet, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 2.11.8 Reverse Transkription

Durch reverse Transkription werden RNA-Templates in cDNA umgeschrieben. Durchgeführt wurde die reverse Transkription von RNA-Proben mittels M-MLV Reverser Transkriptase (Invitrogen) nach folgendem Protokoll (Tabelle 2.58).

**Tabelle 2.58 Allgemeiner Arbeitsablauf der reversen Transkription einer RNA-Probe mittels M-MLV Reverser Transkriptase**

Oligo (dT) <sub>12-18</sub> (500 µg*mL <sup>-1</sup> )	1 µL
RNA-Probe	1 µL
10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	1 µL
Reinstwasser	9 µL
5 min bei 65 °C inkubieren, kurz auf Eis abkühlen, zentrifugieren	
5x first strand buffer	4 µL
DTT 0,1 M	2 µL
Wenn weniger als 50 ng gesamt-RNA vorliegt, RNase Out™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U*µL <sup>-1</sup> )	1 µL
Vortexen, 2 min bei 37 °C inkubieren	
M-MLV RT (200 U*µL <sup>-1</sup> )	1 µL
Vortexen, 50 min bei 37 °C inkubieren	
15 min bei 70 °C inaktivieren	

Die so gewonnene cDNA wurde, wenn nicht sofort weiterverwendet, nach Bestimmung der Konzentration (2.11.2) aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

## 2.11.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung bestimmter DNA-Sequenzen wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt.

Beim Ableiten der Primer wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur zweier zueinander gehöriger Primer nicht stark abweicht (ca. 2 °C), dass der G/C-Gehalt eines Primers zwischen 40-60% liegt und die Länge der Primer 18-22 Basenpaare beträgt.

Für die Polymerasekettenreaktion wurde eine Phusion Polymerase von Thermo Fisher Scientific verwendet. Das allgemeine Pipettierschema ist in Tabelle 2.59 dargestellt.

PCR-Ansatz (20 µL Gesamtvolumen):

**Tabelle 2.59 Allgemeines Pipettierschema PCR-Mastermix mit Phusion-Polymerase**

Template (ca. 200 ng*µL <sup>-1</sup> )	1 µL
5x GC-Puffer	4 µL
10 mM dNTP-Mix	0,4 µL
Forward Primer	1 µL
Reverse Primer	1 µL
Phusion	0,2 µL
Reinstwasser	13,4 µL

PCR-Temperaturprogramm:

**Tabelle 2.60 Allgemeines Temperaturprogramm einer Polymerase-Kettenreaktion mittels Phusion-Polymerase**

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Grunddenaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	35
Annealing	Primerspezifisch	30 s	
Elongation	72 °C	15-30 s pro kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
	4 °C	∞	

### 2.11.9.1 Präparative PCR

Wurden für Sequenzierungen größere Mengen eines PCR-Produktes benötigt, wurden alle Volumina des PCR-Ansatzes aus Tabelle 2.59 mit Faktor 2,5 multipliziert, die PCR-Produkte über ein Agarosegel (2.9.1) getrennt und mit entsprechenden Banden nach 2.11.10 verfahren.

### 2.11.9.2 Reverse-Transkription-*Real-time*-PCR (RT-*q*PCR)

Mittels *Real-time*-PCR kann die Produktakkumulation einer Polymerasekettenreaktion in Echtzeit verfolgt werden. Dies erfolgt über den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green, einem Cyaninfarbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Der gebundene Farbstoff fluoresziert dabei unter Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 480 nm etwa 1 000 mal stärker als der ungebundene Farbstoff (Morrison *et al.* 1998). Je mehr doppelsträngige DNA im Laufe der PCR amplifiziert wird, desto stärker ist das gemessene Fluoreszenzsignal (Higuchi *et al.* 1993, Heid *et al.* 1996). Über den Zeitpunkt des exponentiellen Anstiegs der Fluoreszenz des Zieltargets können quantitative Aussagen über die Konzentration des Templates in der Probe getroffen werden (Wilhelm & Pingoud 2003).

Da der Gehalt eines bestimmten Templates über Referenzgene, deren Konzentrationen an mRNA in der Zelle als konstant angesehen werden können, relativiert wird, können äußere Faktoren wie z. B. nicht exakte Konzentrationseinstellungen in der Berechnung berücksichtigt werden.

*Real-time*-Primerpaare wurden, sofern möglich, beide exonübergreifend abgeleitet, mindestens jedoch ein Primer eines Primerpaares.

Zur Durchführung wurde das Power SYBR® Green RNA-to-c<sub>T</sub><sup>™</sup> 1-Step-Kit von Applied Biosystem verwendet. Dabei können direkt RNA-Templates eingesetzt werden, da der Schritt der reversen Transkription direkt inkludiert ist. Verwendet wurden biologische Triplikate. Die Mycelien wurden zur RNA-Isolierung gepoolt und anschließend in technischen Triplikaten gemessen wurden.

PCR-Ansatz gemäß Tabelle 2.61.

**Tabelle 2.61 Allgemeines Pipettierschema der quantitativen RT-*q*PCR**

RT Enzyme Mix (125x)	0,08 µL
Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)	5 µL
Forward Primer	0,2 µL
Reverse Primer	0,2 µL
Template (20 ± 2 ng*µL <sup>-1</sup> )	2 µL
Nucleasefreies Reinstwasser	2,52 µL

RT-*q*PCR-Temperaturprogramm gemäß Tabelle 2.62.

**Tabelle 2.62 Allgemeines Temperaturprogramm der quantitativen RT-*q*PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Reverse Transkription	48 °C	30 min	1
Enzym Aktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Annealing/Elongation	60 °C	30 s	
Schmelzkurve	65,0 - 95,0 °C	Steigung 5 °C für 5 s + Plattenlesen	

Die durch Fluoreszenzmessung erhaltenen Daten der RT-*q*PCR wurden nach Pfaffl (2001) ausgewertet. Hierbei wird neben dem c<sub>T</sub>-Wert (*threshold cycle*) auch die Steigung der Fluoreszenz und somit die Effizienzen der einzelnen Targets berücksichtigt und miteinander berechnet. Die Schmelzkurven wurden auf eine eindeutige Schmelztemperatur ohne Nebenprodukte hin kontrolliert.

### 2.11.9.3 Auswertung der RT-*q*PCR nach Pfaffl (2001)

Für die quantitative Auswertung wurde eine relative Quantifizierung gewählt, welche die Expression über Referenzgene berechnet. Hierbei werden für die verwendeten Targets zusätzlich die Effizienzen der Expression mit einbezogen. Diese werden über die logarithmische Auftragung der Fluoreszenz über der Zyklenanzahl berechnet, bei der die größte Steigung ermittelt wird. Folgende Formel wird zur Berechnung des Verhältnisses (Ratios) verwendet:

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{T_{\text{Zielgen}}(MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Substrat Melanin})}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_{T_{\text{Referenzgen}}(MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Substrat Melanin})}}}$$

R	Ratio
E	Effizienz
C <sub>T</sub>	Treshhold Cycle
MW	Mittelwert

Allgemein kann bei einem relativen Expressions-Verhältnis größer 2 von einer gesteigerten Expression gesprochen werden.

### 2.11.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Proben, welche für eine Sequenzierung verwendet werden sollten, wurden durch präparative PCR vervielfältigt (2.11.9.1), über ein Agarosegel getrennt (2.9.1) und entsprechende Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Die weitere Reinigung der Bande erfolgte mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Eluiert wurden die Zielprodukte mit 30 µL Reinstwasser oder dem im Kit enthaltenen NE-Puffer.

Die Sequenzierung erfolgte entweder im Sequenzierlabor des interdisziplinären Forschungszentrum iFZ der Universität Gießen (Research Center for Biosystems, Land use and Nutrition) mittels Abi Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt) oder mittels Sequenzierservice von SeqLab Sequence Laboratories, Göttingen.

### **2.11.11 Proteinidentifizierung**

Proteinidentifizierungen erfolgten im Anschluss an eine isoelektrische Fokussierung (2.9.3). Hierzu wurden IEF-Gele unter möglichst sterilen Bedingungen angefertigt. Die Zielbanden wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Die Proteinidentifizierung erfolgte durch den analytischen Service des Biochemischen Instituts unter der Leitung von Prof. Dr. Lochnit der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierbei erfolgte ein tryptischer Verdau mit anschließender MALDI-TOF-MS/MS Analyse. Durch Abgleich der erhaltenen Massenfragmente mit Datenbanken konnten entsprechende Proteine identifiziert werden.

### **2.11.12 Edman-Abbau**

Mittels Edman-Abbau wurde das N-terminale Ende der Aminosäuresequenz des Zielenzym aufgeklärt. Das angewendete Prinzip beruht auf einer durch Edman (1949) entwickelten Methode. Dabei wird durch Phenylisothiocyanat (Edman-Reagenz) das Peptid schrittweise abgebaut und durch jeweilige Endgruppenbestimmung letztendlich die Aminosäuren-Abfolge erhalten.

Eingesetzt wurde für den Edmann-Abbau eine reine FPLC-Fraktion, welche nach FPLC-Reinigung über eine Anionentauschersäule (2.8.5.1) und Größenausschluss säule (2.8.5.2) erhalten wurde. Durchgeführt wurde der Edman-Abbau durch den analytischen Service des Biochemischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Messung erfolgte mittels Procise® Protein Sequencing System von Applied Biosystems (Weiterstadt).

## **2.12 Sterilisation und Entsorgung**

### **2.12.1 Entsorgung von Chemikalien**

Verwendete Lösungsmittel wurden nach ihren Eigenschaften getrennt entsorgt, Agarosegele und phenolhaltige Abfälle wurden separat gesammelt. Lösungsmittel, Chemikalien und Sonderabfälle wurden über die zentrale Entsorgungseinrichtung der Justus-Liebig-Universität Gießen entsorgt.

### **2.12.2 Sterilisation und Entsorgung von S1-Abfällen**

Flüssige und feste S1-Abfälle wurden im Autoklav 15 min bei 135 °C sterilisiert. Flüssige Abfälle wurden nach Filtration dem Laborabwasser zugeführt, feste Abfälle wurden über den Laborabfall entsorgt.

### **2.12.3 Sterilisation von Arbeitsmaterialien**

Verwendete Lösungen und Geräte wurden bei Bedarf durch Autoklavieren für 20 min bei 121 °C sterilisiert. Lösungen, welche nicht autoklaviert werden konnten, wurden gegebenenfalls mittels Sterilfilter (0,22 µm Porengröße) sterilfiltriert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Screening von Basidiomyceten auf Melaninbleichung

#### 3.1.1 Screening auf Melaninagarplatten

Für das Screening auf mögliche Bleichung von Melaninagarplatten wurden 29 Basidiomyceten (2.2) ausgewählt, welche unter normalen Kultivierungsbedingungen nicht-toxisch sind. Bei 13 dieser Basidiomyceten konnte optisch eine Bleichung der schwarzbraun gefärbten Agarplatten (2.7.4) beobachtet werden (Abbildung 3.1).

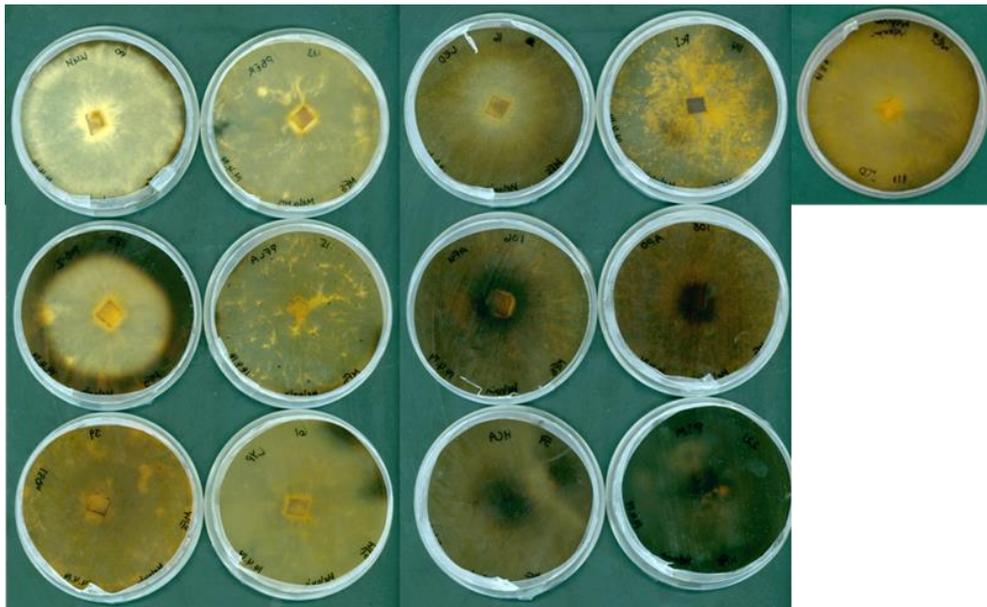


Abbildung 3.1 Bleichwirkung der 13 erfolgreich getesteten Basidiomyceten auf Melaninagarplatten; Erste Reihe v.l.n.r *Kuehneromyces mutabilis*, *Panellus serotinus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Irpex consors*. Zweite Reihe *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus flabellatus*, *Auricularia fuscossuccinea*, *Auricularia polytricha*. Dritte Reihe *Lentinus squarrosulus*, *Lycoperdon pyriforme*, *Hypholoma capnoides*, *Phallus impudicus*.

Die Bleichung erfolgte dabei entweder zeitgleich mit der Wachstumszone von der Plattenmitte nach außen, oder leicht zeitverzögert nach vollständigem Bewachsen der Platte.

Folgende Basidiomyceten wurden positiv auf einen bleichenden Effekt getestet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Liste der im Melaninagarplattenscreening positiv auf Bleichwirkung getesteten Basidiomyceten

Stammnummer	Organismus	Kürzel
16	<i>Lentinula edodes</i>	LED
39	<i>Lentinus squarrosulus</i>	LSQU
43	<i>Panellus serotinus</i>	PSER
59	<i>Hypholoma capnoides</i>	HCA
60	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	KUM
61	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	LYP
106	<i>Auricularia fuscusuccinea</i>	AFU
108	<i>Auricularia polytricha</i>	APO
111	<i>Irpex consors</i>	ICO
114	<i>Pleurotus citrinopileatus</i>	PCI
115	<i>Pleurotus flabellatus</i>	PFLA
187	<i>Pleurotus ostreatus</i>	POS-2
221	<i>Phallus impudicus</i>	PIM

### 3.1.2 Screening in Submersmedium

Von den 13 positiv getesteten Basidiomyceten wurden die sieben am schnellsten bleichenden Organismen einem Submersscreening unterzogen. Dazu wurden die Basidiomyceten in Melaninmedium (2.7.3) kultiviert und der Kulturüberstand alle zwei Tage mittels ABTS-Assay auf Peroxidaseaktivität (2.8.9.2.1) untersucht (Abbildung 3.2).

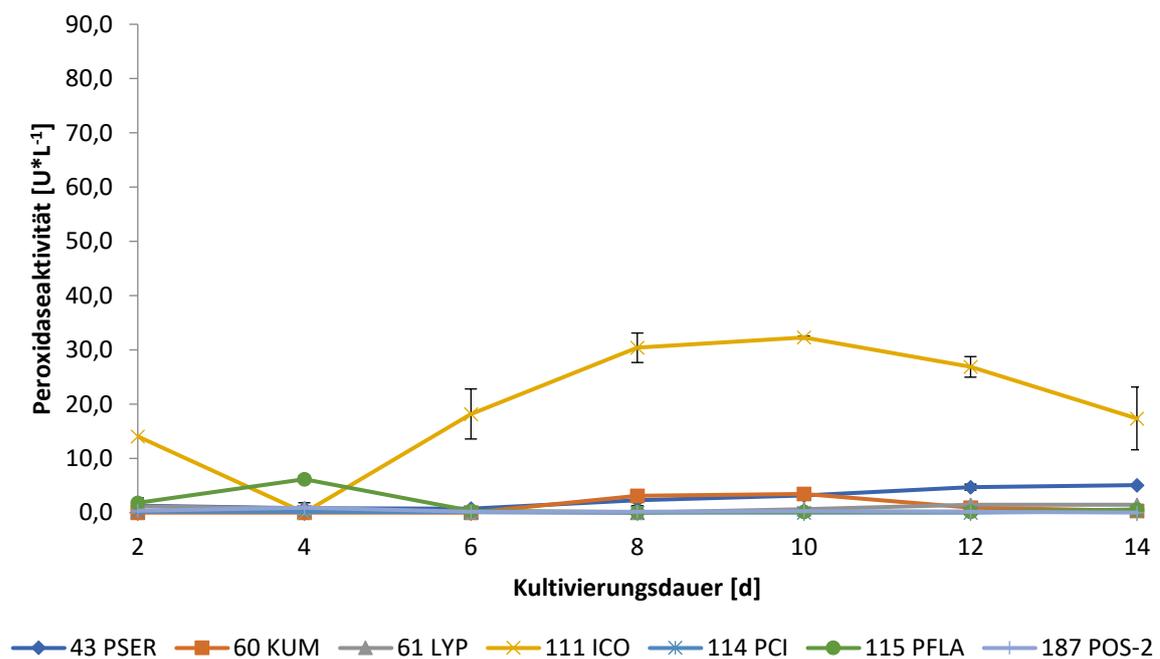


Abbildung 3.2 Submersscreening der auf Agarplatten positiv getesteten Basidiomyceten in Melaninmedium, Kinetikmessung der Peroxidaseaktivität mittels ABTS-Assay

Bei fast allen der getesteten Basidiomyceten wurde Peroxidaseaktivität mittels ABTS-Assay innerhalb der ersten vierzehn Kulturtag nachgewiesen. Im Vergleich wies *Irpex consors* die höchste Peroxidaseaktivität der getesteten Basidiomyceten auf. Daher und aufgrund der raschen Bleichwirkung in Submersmedium wurde *Irpex consors* für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit ausgewählt.

In Submersmedium, welches durch das Substrat Melanin schwarzbraun gefärbt war, konnte durch *Irpex consors* bereits nach 120 h eine nahezu vollständige Bleichung erzielt werden (Abbildung 3.3).

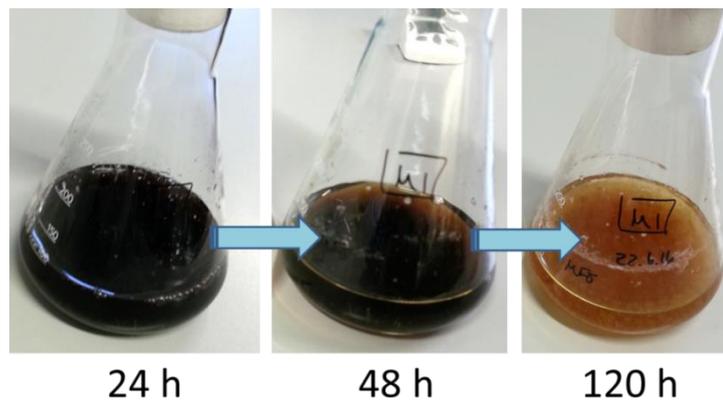


Abbildung 3.3 Bleichwirkung von *Irpex consors* in Melanin-submersmedium innerhalb von 120 h

### 3.1.3 Bleichung von Agarplättchen in Submersmedium

Zur Submerskultivierung in Malzextraktmedium (2.7.1) wurden 1 cm<sup>2</sup> große Melaninagarstücke (2.7.4) in das Medium hinzugefügt. Nach sieben Kulturtagen wurde die Kultivierung abgebrochen und die Agarstücke dokumentiert. Hierbei wurden die Agarstücke, welche in mit *Irpex consors* inokuliertem Medium inkubierten, komplett gebleicht (Abbildung 3.4 rechts). Bei mitgeführten Negativkontrollen ohne ICO bzw. mit autoklaviertem ICO-Inokulum konnte keine Bleichung festgestellt werden (Abbildung 3.4 Mitte und links).

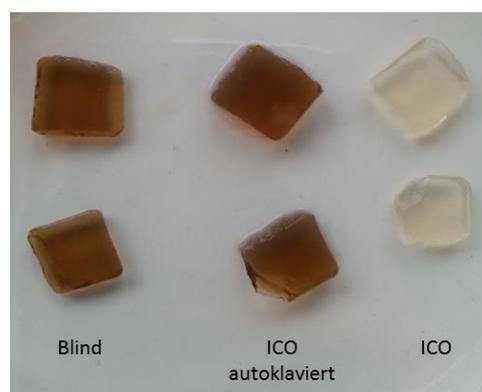


Abbildung 3.4 Bleichung von Melaninagarstücken bei Kultivierung in Submersmedium. Links: chemische Negativkontrolle ohne Mikroorganismus, Mitte: biologische Negativkontrolle mit autoklavierter *Irpex consors* Kultur, rechts: gebleichtes Agarstück kultiviert mit *Irpex consors*

## 3.2 Kultivierung von *Irpex consors* und Untersuchung der Enzymaktivität

### 3.2.1 Enzymaktivität im Kulturüberstand bei Kultivierung in Melaninmedium

Während der Submerskultivierung in Melaninmedium wurde in regelmäßigen Abständen Kulturüberstand entnommen und mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1) auf Peroxidase-Aktivität untersucht. Als Vergleichskontrolle dienten Kulturansätze ohne Melanin (Abbildung 3.5).

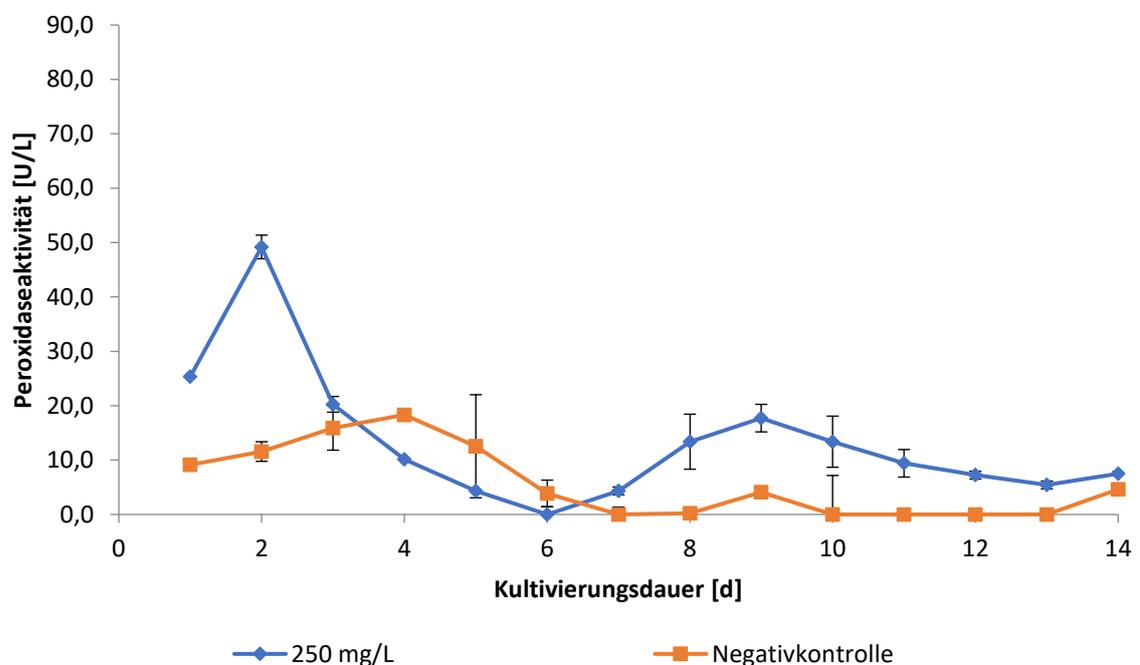


Abbildung 3.5 Peroxidaseaktivität im Kulturverlauf von ICO in Melaninmedium ( $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Melanin) im Vergleich mit Negativkontrolle ohne Melanin, gemessen mittels ABTS-Assay

Sowohl bei der Kultivierung mit Melanin als auch bei Negativkontrollen ohne Melanin wurde Peroxidase-Aktivität gemessen.

Bei der Kultivierung mit dem Substrat Melanin wurde ein erstes Aktivitätsmaximum bereits an Kulturtag zwei gemessen. Die Negativkontrolle zeigte ein geringeres Maß an Peroxidaseaktivität, wobei das Aktivitätsoptimum erst an Kulturtag vier auftrat.

Bei der Peroxidaseaktivität war ein zyklischer Verlauf erkennbar. Das erste Aktivitätsmaximum liegt an Kulturtag zwei (bzw. Tag vier in der Negativkontrolle), nach Abschwächung der Aktivität wurde zu einem späteren Zeitpunkt (Tag neun) ein zweites Maximum gemessen. Dieses war jedoch geringer als das erste gemessene Maximum.

Durch Variieren der Melaninkonzentration im Medium wurden unterschiedliche Peroxidaseaktivitäten erzielt (Abbildung 3.6).

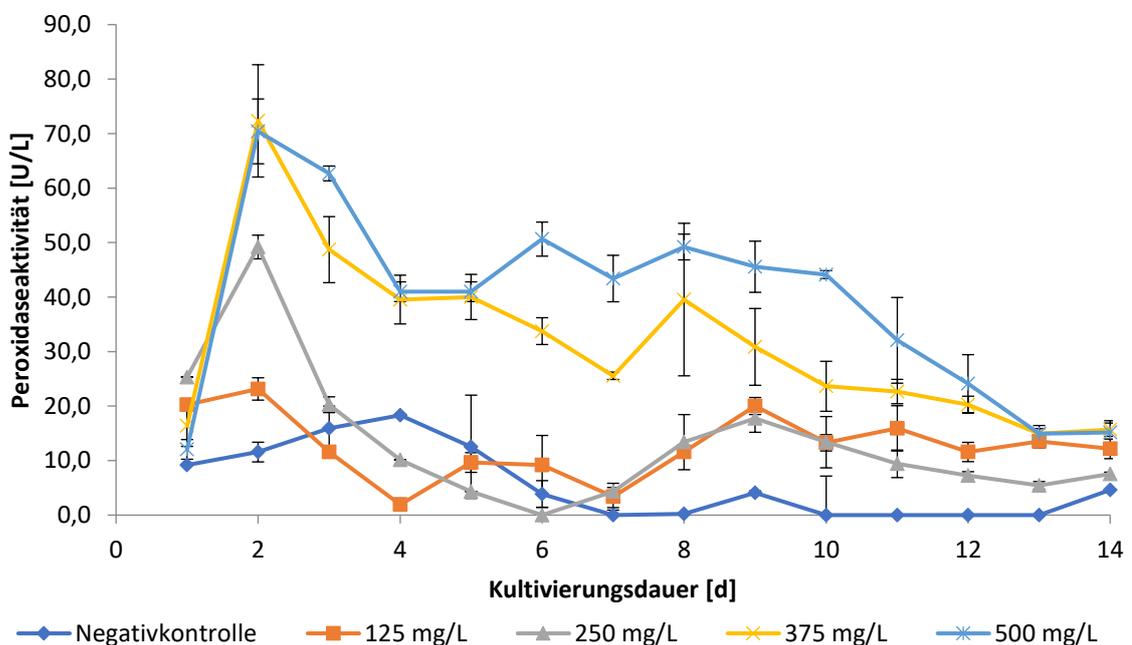


Abbildung 3.6 Verlauf der Peroxidaseaktivität von *Ipex consors* in Melaninmedien mit unterschiedlichen Melaninkonzentrationen, gemessen mittels ABTS-Assay

Die Konzentration an Melanin im Submersmedium hat Auswirkungen auf die erhaltene Peroxidaseaktivität des Kulturüberstandes. Bei einer Melanin-Konzentration von  $375 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  wurde an Kulturtag zwei die höchste Peroxidaseaktivität gemessen.

Bei einer weiteren Konzentrationssteigerung des Substrates wurde kein weiterer Anstieg der Peroxidaseaktivität erzielt.

### 3.2.2 Auswirkungen weiterer Substrate auf die Peroxidaseaktivität

Die Kultivierung von *Irpex consors* wurde auch mit weiteren Substraten auf Erhöhung der Peroxidaseaktivität getestet. Hierbei wurde neben kommerziell erworbenem Melanin von Sigma-Aldrich die Calciumsulfitablauge BretaxCl verwendet, welche in einer vorhergehenden Arbeit bei der Kultivierung von *Irpex consors* bereits erfolgreich eingesetzt worden war (Imami *et al.* 2015), (Abbildung 3.7).

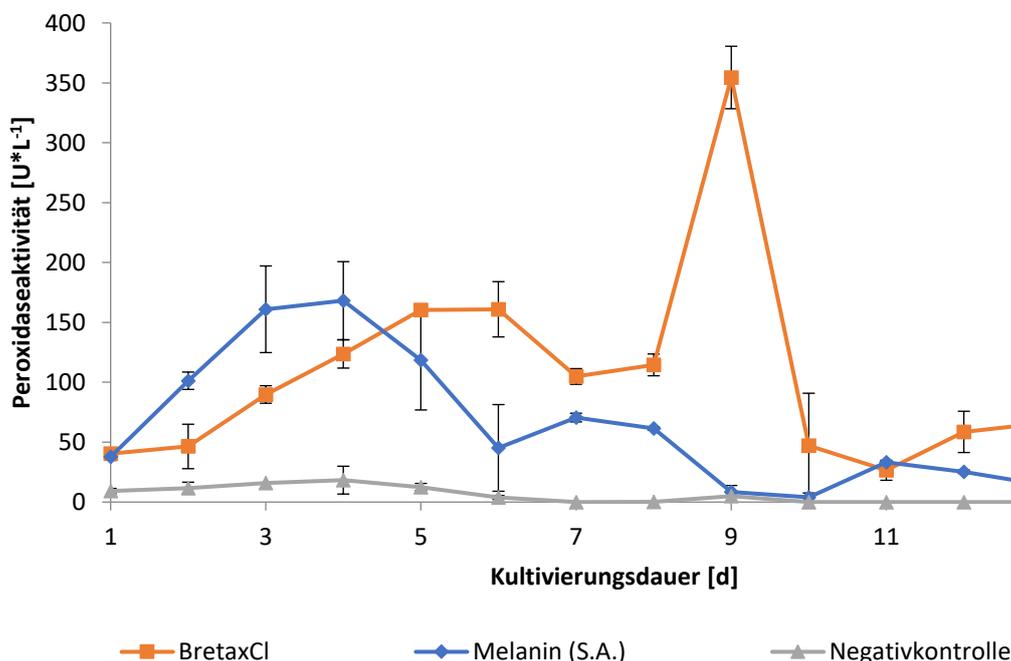


Abbildung 3.7 Verlauf der Peroxidaseaktivität bei Kultivierung von *Irpex consors* mit Melanin (Sigma-Aldrich, 250 mg·L<sup>-1</sup>) und BretaxCl im Vergleich, gemessen mittels ABTS-Assay

Bei der Kultivierung von *Irpex consors* mit kommerziellem Melanin wurden deutlich höhere Peroxidaseaktivitäten erzielt, als mit selbst synthetisiertem Melanin.

Das Aktivitätsmaximum lag hingegen an Kulturtag vier anstelle von Kulturtag zwei (Abbildung 3.6). Die Kultivierung mit BretaxCl zeigt einen anderen Verlauf. Dabei war das zweite Aktivitätsmaximum an Tag neun deutlich höher als das erste gemessene Maximum an den Tagen fünf und sechs. Zudem konnte bei der Kultivierung mit BretaxCl die am höchsten gemessene Peroxidaseaktivität von mehr als 350 U·L<sup>-1</sup> erzielt werden.

Weiterhin wurden die Substrate Oxalsäure, Gallussäure, Vanillin, 2,6-Dimethoxyphenol, Ferulasäure und Veratrylalkohol auf einen möglichen Einfluss zur Steigerung der Peroxidaseaktivität getestet (Abbildung 3.8).

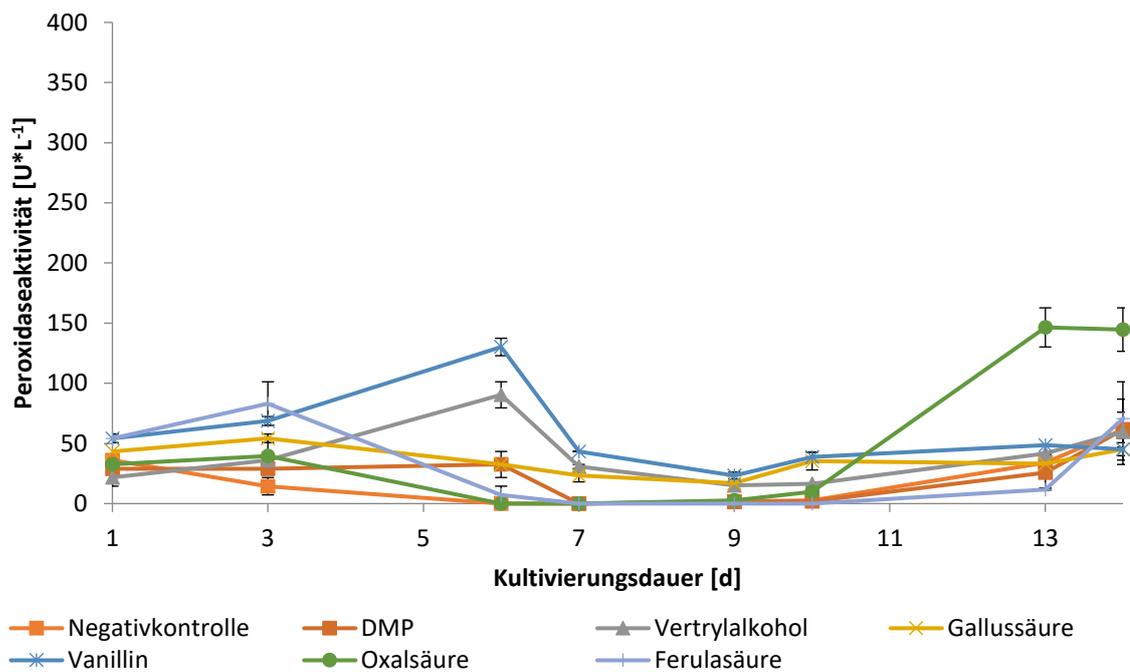


Abbildung 3.8 Verlauf der Peroxidaseaktivität bei Kultivierung von ICO mit verschiedenen Substraten, gemessen mittels ABTS-Assay

Bei diesen getesteten Substraten wurden ebenfalls deutliche Steigerungen der Peroxidaseaktivität im Vergleich zur Negativkontrolle erzielt. Die Steigerungen variierten je nach Substrat unterschiedlich stark. Der Zeitpunkt der höchsten Aktivität wurde dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen.

Die höchsten Peroxidaseaktivitäten wurden mit Vanillin an Tag sechs ( $130 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und mit Oxalsäure an Tag dreizehn ( $150 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ ) erzielt.

### 3.3 Isolierung und Identifizierung einer Peroxidase aus *Irpex consors*

#### 3.3.1 Isolierung einer Peroxidase aus *Irpex consors*

Die Isolierungen einer Peroxidase erfolgten aus dem Kulturüberstand von *Irpex consors*. Die Isolierungen wurden mit Kulturüberständen aus Melanin-Medium (2.7.3.2) und BretaxCI-Medium (2.7.5) durchgeführt. In beiden Fällen wurde dieselbe Peroxidase isoliert und identifiziert. Die folgenden Daten stammen aus einer Isolierung aus BretaxCI-Medium am Kulturtag sieben.

##### 3.3.1.1 Vorreinigung Kulturüberstand

Im ersten Schritt wurde am siebten Kulturtag der BretaxCI-Hauptkultur eine Ammoniumsulfatfällung (2.8.1) der Proteine im Kulturüberstand durchgeführt. Die Peroxidaseaktivitäten wurden in jedem Zwischenschritt mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1) überprüft, um Verluste der Aktivität nachverfolgen zu können. Bei der Ammoniumsulfatfällung und dem anschließenden Lösen des Pellets wurde die Anfangsaktivität zu 87% erhalten.

Durch Tangential-Filtrierungen mittels Ultrasette (2.8.2) und Vivaflow (2.8.3) wurde die gewonnene Enzymlösung weiter gereinigt. Hierbei führten jedoch Totvolumina, Dauer und Druck der Filtrationsprozesse zu deutlichen Verlusten der Gesamtperoxidaseaktivität (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Überblick über die Aktivitätsverluste der einzelnen Vorbereitungsstufen des *Irpex consors* Kulturüberstands

Aufbereitungsschritt	Peroxidaseaktivität <sup>1</sup> [U*L <sup>-1</sup> ]	Volumen [mL]	Peroxidaseaktivität total [U]
Kulturüberstand	43	910	39
Nach Ammoniumsulfatfällung	170	200	34
Nach Membranfiltration mittels Ultrasette®	87	250	22
Nach Membranfiltration mittels Vivaflow 200	221	55	12
Gewonnene aktive Fraktionen nach FPLC DEAE Sepharose™	32 (Fraktion B5)	30	12 (gepoolt)
	174 (Fraktion B6)	30	
	181 (Fraktion C1)	30	

<sup>1</sup>Peroxidaseaktivität gemessen mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1)

Insgesamt war ein Aktivitätsverlust von ca. 70% zu verzeichnen, welcher zu einem Großteil auf die Filtrationsschritte zurückzuführen ist. Bei den einzelnen Reinigungsschritten wurden jeweils Aliquots zur Durchführung einer SDS-PAGE (2.9.2) entnommen (Abbildung 3.9).

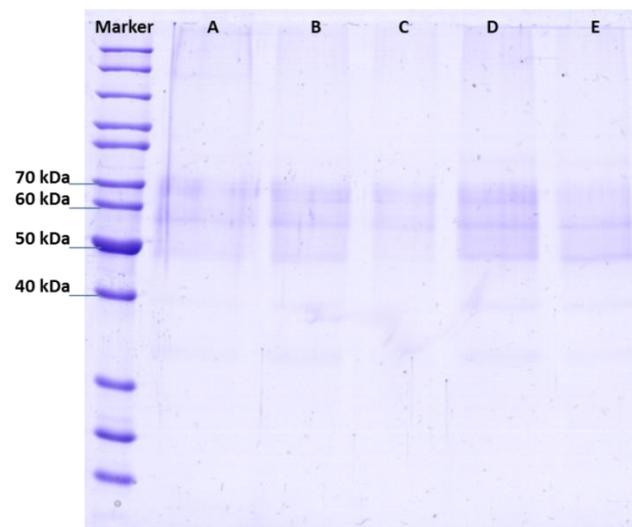


Abbildung 3.9 SDS-PAGE mit Commassiefärbung der Aliquots der Vorreinigungstufen des *Irpex consors*-Kulturüberstandes. (A) zentrifugierter Kulturüberstand, (B) Resuspendiertes Pellet nach Ammoniumsulfatfällung, (C) nach Ultrasette Filtrationseinheit, (D) nach Vivaflow Filtrationseinheit, (E) nach Umpuffern

In den einzelnen Teilproben wurden jeweils drei Banden bei Molekulargewichten von 49 kDa, 58 kDa und 69 kDa detektiert. In den Proben D und E waren weitere schwache Banden bei ca. 40 kDa zu sehen.

### 3.3.1.2 FPLC-Reinigung

#### 3.3.1.2.1 Schwache Anionenaustauschchromatographie

Der erste FPLC-Reinigungsschritt erfolgte über eine schwache Anionenaustauschersäule (2.8.5.1). Die gesammelten Fraktionen wurden jeweils auf ihre Peroxidaseaktivität mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1) untersucht. Hierbei konnte Peroxidaseaktivität in drei aufeinanderfolgenden Fraktionen gemessen werden, welche im Salzgradienten bei einem Natriumchloridgehalt ab ca. 0,6 M eluierten (Abbildung 3.10).

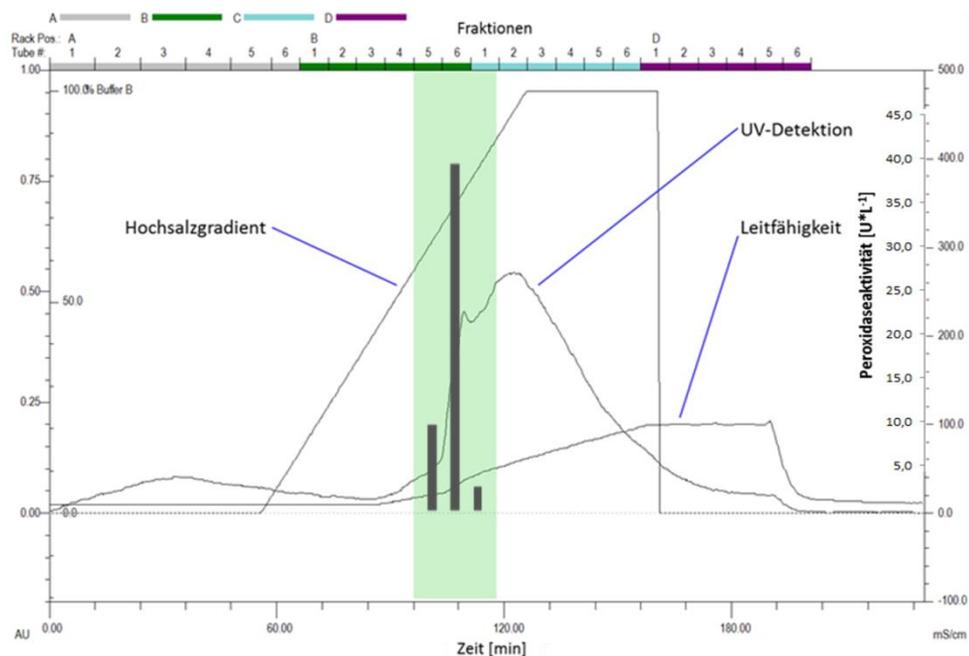


Abbildung 3.10 FPLC-Chromatogramm der Enzymreinigung eines ICO-Kulturüberstandes mittels schwachem Anionenaustausch, Fraktionen mit Peroxidaseaktivität sind grün hinterlegt

In den Fraktionen B5, B6 und C1 wurde Peroxidaseaktivität nachgewiesen. Das UV-Signal zeigt keinen sauber getrennten Peak. Zum Zeitpunkt der Peroxidaseaktivität sitzt der Peak auf einem weiteren, nachfolgendem Peak auf.

Die Peroxidaseaktivität ist in der Fraktion B6 am größten, gefolgt von Fraktion B5 und C1.

Die aktiven Fraktionen B5, B6 und C1 wurden gepoolt, entsalzt und umgepuffert (2.8.4). Zur Übersicht wurde eine SDS-PAGE (2.9.2) der erhaltenen Enzymlösung angefertigt (Abbildung 3.11).

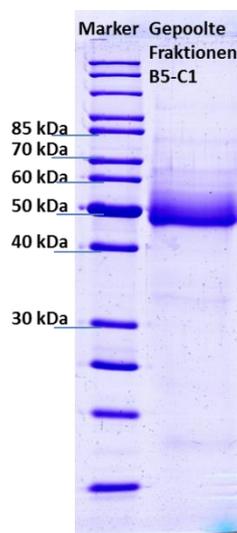


Abbildung 3.11 SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung der gepoolten und umgepufferten peroxidaseaktiven Fraktionen B5, B6 und C1 nach schwacher Anionenaustauschchromatographie

In der gepoolten Probe ist eine Bande auf der Höhe von 49 kDa deutlich zu erkennen. Weitere, schwache Banden unterschiedlicher Molekülgrößen sind ebenfalls vorhanden.

Anschließend wurde die gepoolte Enzymlösung aus dem Anionenaustausch zum nächsten Reinigungsschritt eingesetzt.

### 3.3.1.2.2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde im Anschluss an die schwache Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Hierbei wurden drei Fraktionen (21, 22 und 23) mit Peroxidaseaktivität gewonnen.

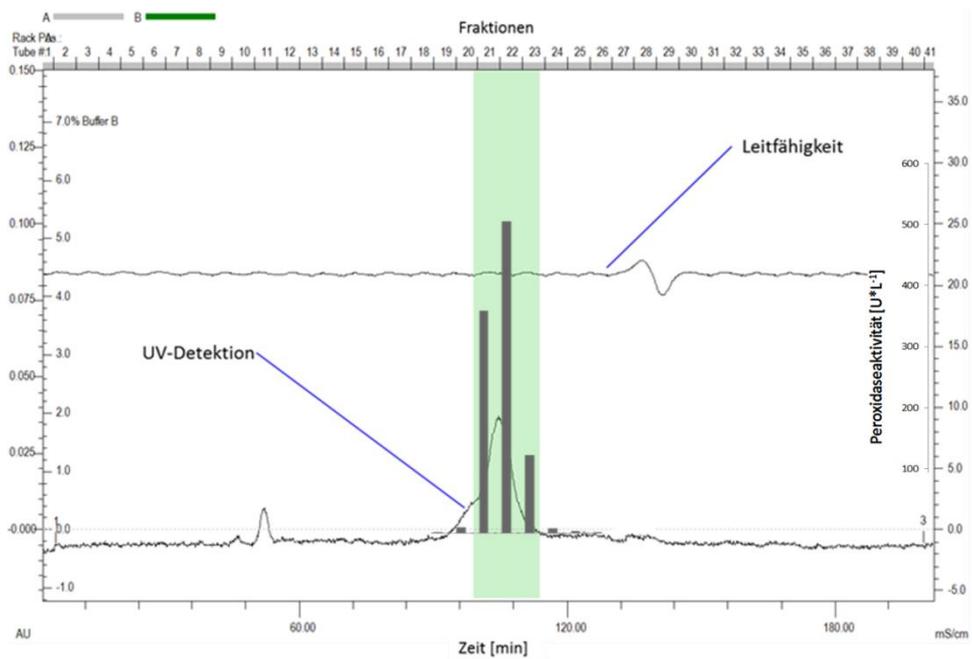


Abbildung 3.12 FPLC-Chromatogramm der Enzymreinigung eines ICO-Kulturüberstandes mittels Größenausschlusschromatographie. Fraktionen mit Peroxidaseaktivität sind grün hinterlegt

Das UV-Signal des erhaltenen Chromatogramms (Abbildung 3.12) zeigt ein Peak zum Zeitpunkt der elution der peroxidaseaktiven Fraktionen. Zum Zeitpunkt der Elution der Fraktionen 19 und 20 ist ein minimales Fronting zu erkennen.

Die Peroxidaseaktivitäten wurden hauptsächlich in Fraktion 21 und 22 gemessen. In den Randfraktionen 20, 23 und 24 wurde ebenfalls noch leichte Peroxidaseaktivität nachgewiesen.

### **3.3.2 Bestimmung der molekularen Masse mittels SDS-PAGE**

Mit den peroxidaseaktiven Fraktionen nach der Größenausschlusschromatographie wurde nach Umpufferung (2.8.4) eine SDS-PAGE (2.9.2) angefertigt (Abbildung 3.13). Hierbei zeigte sich, dass die Fraktionen 20 und 21 ein Enzym der Masse von 66 kDa enthielten, welches in den weiteren Fraktionen nicht nachgewiesen wurde. Ab Fraktion 21 war auf der Höhe von 46 - 49 kDa eine Doppelbande zu erkennen. In Fraktion 23 war diese hingegen nur noch sehr schwach zu erkennen (Abbildung 3.13).

Aufgrund der mittels ABTS-Assay gemessenen Enzymaktivitätsverteilung in den Fraktionen 21 bis 23 wurde die gesuchte Peroxidase bei der Doppelbande bzw. einer der beiden Banden erwartet. Das zuerst eluierende Enzym mit der molekularen Masse von 66 kDa wurde aufgrund der Peroxidaseaktivitätsmessung als Zielenzym ausgeschlossen.

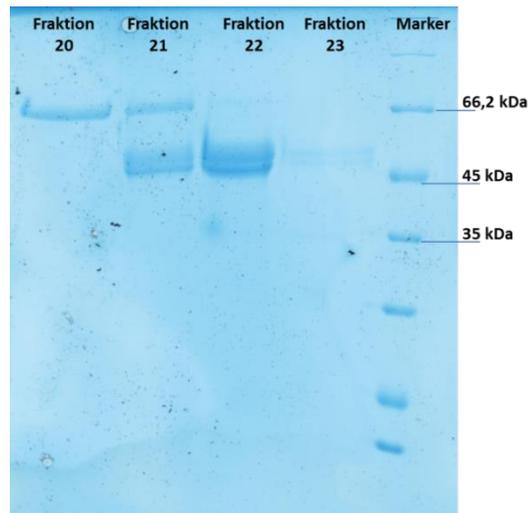


Abbildung 3.13 SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung der peroxidaseaktiven Fraktionen 20, 21, 22 und 23 nach Größenausschlusschromatographie

Die Kulturüberstände der Kultivierungsansätze mit den Substraten Melanin, Vanillin und Oxalsäure wurden auf gleiche Weise untersucht, wobei auf den Schritt der Größenausschlusschromatographie verzichtet wurde. Hierbei wurde gezeigt, dass die jeweils dabei isolierten Enzyme die identische Charakterisierung in SDS- und IEF-Gelen aufwiesen.

### 3.3.3 Bestimmung des isoelektrischen Punkts mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF)

Die reine Enzymfraktion wurde zur isoelektrischen Fokussierung (2.9.3) eingesetzt, um den isoelektrischen Punkt des Enzyms zu bestimmen.

Die Färbung erfolgte hierbei zum einen über Coomassie (2.10.1) (2.10.2) und zum anderen über ABTS-Aktivitätsfärbung (2.10.3). Da die isoelektrische Fokussierung unter nativen Bedingungen abläuft, können mittels ABTS-Aktivitätsfärbung direkt laccase- und peroxidaseaktive Banden sichtbar gemacht werden. Es zeigte sich bei der ABTS-Aktivitätsfärbung eine Doppelbande, welche erst nach Zugabe von Wasserstoffperoxid zum Färbegrad grün sichtbar wurde. Die zwei Banden zeigten bei Coomassie-Färbung einen isoelektrischen Punkt im niedrigen Bereich bei pH 3,5. Die Aktivitätsfärbung zeigte eine deutliche und rasche Umsetzung von ABTS auf Höhe dieser Bande (Abbildung 3.14).

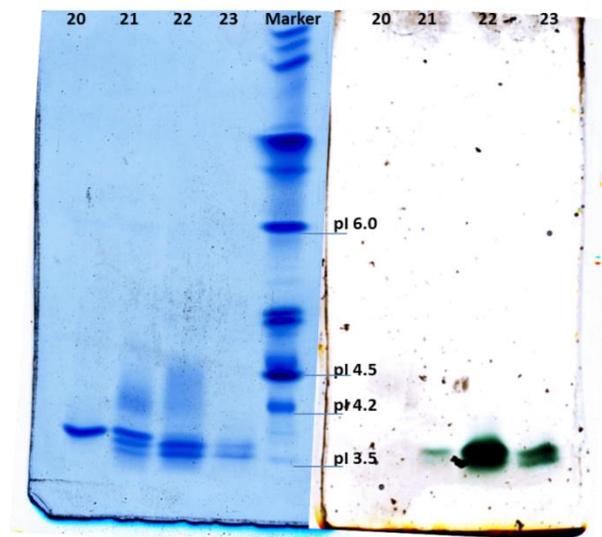


Abbildung 3.14 IEF-Gel der Fraktionen 20, 21, 22 und 23 mit Peroxidaseaktivität nach Größenausschlusschromatographie. Links Färbung mit Coomassie, rechts Aktivitätsfärbung mit ABTS

Es ist erkennbar, dass in Fraktion 20 und 21 eine weitere Bande mittels Coomassie-Färbung detektiert wurde. Diese besitzt einen leicht höheren isoelektrischen Punkt als die anderen beiden Banden, weist jedoch keine Laccase- oder Peroxidaseaktivität in der ABTS-Aktivitätsfärbung auf.

### 3.3.4 Proteinidentifizierung der isolierten Peroxidase mittels MALDI-TOF-MS/MS

Aus einem möglichst steril präpariertem IEF-Gel (2.9.3) wurden die in der ABTS-Färbung positiv getesteten Banden der Doppelbande separat mit einem Skalpell herausgetrennt und einem tryptischem Verdau mit anschließender MALDI-TOF-MS/MS Analyse unterzogen (2.11.11).

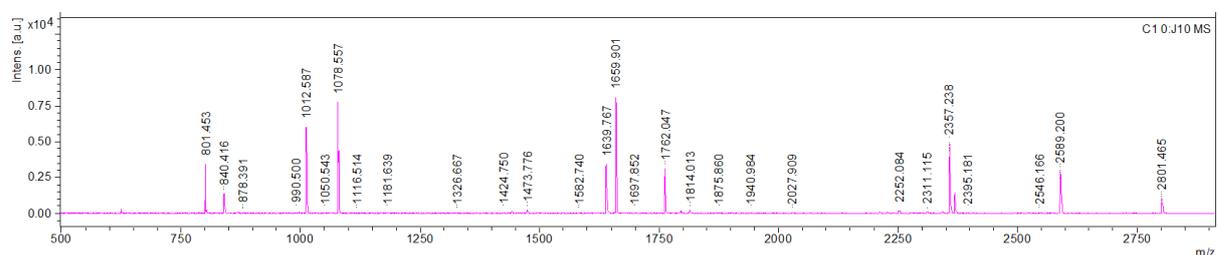


Abbildung 3.15 Massenverteilung der Fragmente des Zielenzym der MALDI-TOF-MS/MS-Analyse

Die erhaltenen Massendaten der Fragmente (Abbildung 3.15) zeigten durch Datenbankabgleich in beiden Fällen Übereinstimmung mit einer Manganperoxidase aus *Spongipellis* sp. Ferm-P 18171 (UniProt accession number Q2HWK0), deren Peptid-Sequenz vollständig aufgeklärt ist (Abbildung 3.16).

```

seq1 MAFKSLAFL TLAAFQVANA ALTRRVACPD GVNTATNAAC CSLFALRDDL 50
seq1 QQNLFDNGQC GEDVHESLRL TFHDAIGIGS NGGGGADGSI AIFEDIETAF 100
seq1 HANAGIDEII NEQKPFLLARH NITVGDFIQF AGALGVSNCV GAPRLPVFIG 150
seq1 RPNAVAPAPD KTVPEPFDSV DTILARFADA GNFSTVEVVW LLISHTIAAA 200
seq1 DLVDPTIPGT PFDSTPETFD TQFFVETQLK GTLFPGTAGN QGEVESPLQG 250
seq1 EIRLQSDFEL ARDSRTACEW QSFVNNQRKL TNRFAQVFTK MTVLGNVNS 300
seq1 LIDCSELIPE PPAFTGSATF PAGFSVNDVE QACEATPFPT LATDPGPVTS 350
seq1 VAPVPPS 357

```

Abbildung 3.16 Vollständige Aminosäuresequenz mit 357 Aminosäuren der Manganperoxidase aus *Spongipellis* sp, UniProt accession number Q2HWK0

In einer vorhergehenden Arbeit von Imami *et al.* (2015) wurde die selbe Peroxidase wie die hier isolierte Peroxidase identifiziert und als putative versatile Peroxidase (pVP) eingeordnet.

Diese vorhergehende Arbeit beschäftigte sich dabei mit dem Abbau von Lignosulfonaten, welcher ebenfalls durch die hier isolierte Peroxidase aus *Irpex consors* erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Da es sich somit um die identische Peroxidase handelt, konnte auf die vollständige cDNA-Sequenz zurückgegriffen werden, welche in der vorhergehenden Arbeit aufgeklärt wurde (Abbildung 3.17):

seq1	GTTGCTTGCC	CAGATGGCGT	CAACACTGCG	ACCAACGCAG	CCTGCTGCTC	50
seq1	TTTGTTGCGT	CTCCGTGATG	ATCTCCAACA	GAACCTCTTC	GACAACGGAC	100
seq1	AATGTGGTGA	AGATGTCCAC	GAATCCCTTC	GTCTCACCTT	CCACGATGCT	150
seq1	ATCGGTATCG	GCTCAAACGG	TGGTGGAGGT	GCCGACGGTT	CTATCGCCAT	200
seq1	TTTCGAAGAC	ATCGAAACCG	CCTTCCACGC	GAACGCTGGT	ATTGACGAAA	250
seq1	TTATCAATGA	GCAGAAGCCT	TTCCTTGCTA	GGCACAACAT	CACGGTTGGT	300
seq1	GACTTCATTC	AATTCGCTGG	TGCTCTTGGT	GTGAGCAACT	GCCCTGGTGC	350
seq1	TCCTCGTTTG	CCTGTCTTCA	TCGGTCGTCC	CAACGCCGTT	GCCCCCGCTC	400
seq1	CCGACAAGAC	TGTCCCGGAA	CCATTCGATA	GTGTCGACAC	TATCTTGCT	450
seq1	CGTTTCGCCG	ATGCTGGTAA	CTTCAGCAGC	CGTCGAAGTC	GTCTGGTTGC	500
seq1	TCATCTCTCA	CACGATCGCG	GCAGCCGATC	TTGTGACCC	TACCATTCTC	550
seq1	GGAACACCCT	TTGACTCTAC	CCCGAGACT	TTCGACACTC	AATTCTTCGT	600
seq1	CGAGACCCAG	TTAAAGGGAA	CGCTCTTCCC	CGGAACCGCT	GGAACCAAG	650
seq1	GCGAGGTCGA	GTCCCCCTTG	CAGGGTGAAA	TTCGTCTCCA	ATCCGACTTT	700
seq1	GAGCTCGCAC	GAGACAGCAG	GACCGCATGT	GAATGGCAAT	CGTTCGTCAA	750
seq1	CAACCAACGC	AAACTACCA	ACCGATTCCA	AGCCGTCTTC	ACCAAGATGA	800
seq1	CCGTGTTGGG	TAACGACGTC	AACAGCCTCA	TTGATTGCTC	CGAGCTCATC	850
seq1	CCTGAGCCAC	CCGCCTTCAC	TGGTTCAGCG	ACTTTCCTTG	CTGGGTCTC	900
seq1	TGTCACGAT	GTTGAGCAAG	CTTGCAGGC	TACGCCATTC	CCACTCTCGC	950
seq1	CACTGATCCC	GGTCCGGTCA	CTTCTGTCGC	TCCTGTCCCC	CCTTCGTAA	999

Abbildung 3.17 Vollständige cDNA-Sequenz mit einer Länge von 999 Nukleotiden der isolierten Peroxidase aus *Irpex consors*, aufgeklärt durch Imami *et al.* (2015)

Die cDNA-Sequenz wurde in ihre Aminosäuresequenz überführt, wobei eine Sequenz von 332 Aminosäuren erhalten wurde. Diese zeigte vollständige Übereinstimmung mit der oben genannten Manganperoxidase aus *Spongipellis* sp, welche mittels MALDI-TOF-MS/MS und Datenbankabgleich als das Zielenzym identifiziert worden war (Abbildung 3.18).

seq1	VACPDGVNTA	TNAACCSLFA	LRDDLQQNLF	DNGQCGEDVH	ESLRLTFHDA	50
seq1	IGIGSNGGGG	ADGSIAIFED	IETAFHANAG	IDEIINEQKP	FLARHNITVG	100
seq1	DFIQFAGALG	VSNCPGAPRL	PVFIGRPNVAV	APAPDKTVPE	PFDSVDTILA	150
seq1	RFADAGNFST	VEVVWLLISH	TIAAADLVDP	TIPGTFPDST	PETFDTQFFV	200
seq1	ETQLKGTLP	GTAGNQGEVE	SPLQGEIRLQ	SDFELARDSR	TACEWQSFVN	250
seq1	NQRKLTNRFQ	AVFTKMTVLG	NDVNSLIDCS	ELIPEPPAFT	GSATFPAGFC	300
seq1	VNDVEQACEA	TPFPATLADP	GPVTSVAPVP	PS	332	

Abbildung 3.18 Übersetzte Aminosäureabfolge aus der cDNA-Sequenz der Peroxidase aus *Irpex consors* mit einer Sequenzlänge von 332 Aminosäuren

### 3.3.5 Bestimmung des N-Terminus der Aminosäuresequenz mittels Edman-Abbau

Da in der cDNA-Sequenz das Start-Codon nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, wurde zur Absicherung das N-terminale Ende der Aminosäuresequenz mittels Edman-Abbau überprüft. Dazu wurde eine reine Enzymfraktion nach Größenausschlusschromatographie eingesetzt. Die Analyse erfolgte im Institut für Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Das N-terminale Ende der Aminosäuresequenz wurde verifiziert. Die erhaltenen ersten 12 Aminosäuren stimmen mit dem N-terminalen Ende der übersetzten Aminosäuresequenz überein (Abbildung 3.19).

```

seq1 VACPGDVNTA TNAACCSLFA LRDDLQQLNF DNGQCGEDVH ESLRLTFHDA 50
seq1 IGIGSNGGGG ADGSIAIFED IETAFHANAG IDEIINEQKP FLARHNITVG 100
seq1 DFIQFAGALG VSNCPGAPRL PVFIGRPNV APAPDKTVPE PFDSVDTILA 150
seq1 RFADAGNFST VEVVWLLISH TIAAADLVDP TIPGTPFDST PETFDTQFFV 200
seq1 ETQLKGTLPF GTAGNQGEVE SPLQGEIRLQ SDFELARDSR TACEWQSFVN 250
seq1 NQRKLTNRFQ AVFTKMTVLG NDVNSLIDCS ELIPEPPAFT GSATFPAGFC 300
seq1 VNDVEQACEA TPFPLS 316

```

Abbildung 3.19 Aminosäuresequenz der Peroxidase aus *Irpex consors*, grün hinterlegt die mittels Edman-Abbau verifizierten N-terminalen Aminosäuren

### 3.4 Biochemische Charakterisierung der isolierten versatilen Peroxidase

#### 3.4.1 UV/Vis-Spektrum der isolierten putativen versatilen Peroxidase

Das UV/Vis-Spektrum der reinen Peroxidase wurde mittels Spektralphotometer (2.8.7) in einem Bereich von 250 - 900 nm aufgenommen. Hierbei ist bei einer Wellenlänge von 408 nm ein deutliches Maximum zu messen. Dies entspricht der Soret-Bande, welche üblicherweise zwischen 400 - 450 nm zu finden ist und auf ein Hämprotein hindeutet. Weiterhin wurden zwei lokale Maxima bei 504 nm und 642 nm detektiert (Abbildung 3.20).

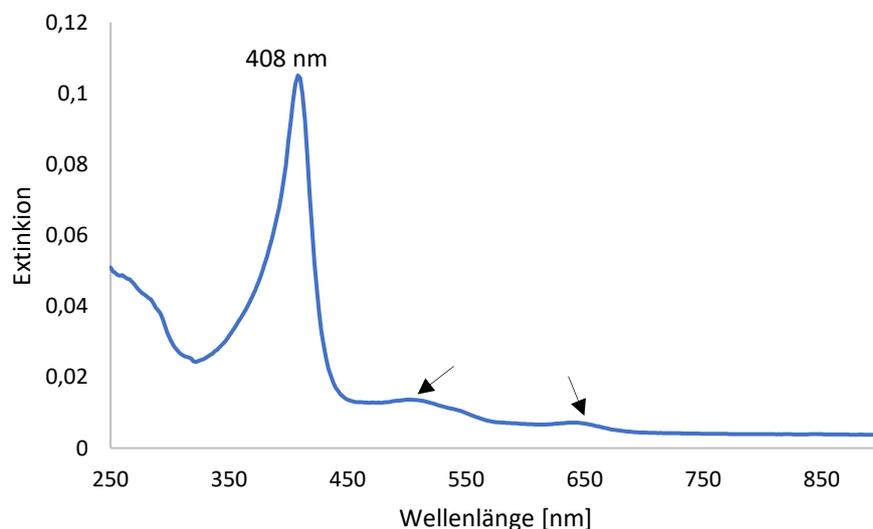


Abbildung 3.20 UV/Vis-Spektrum der isolierten Peroxidase aus *Irpex consors* im Wellenlängenbereich von 250-900 nm

#### 3.4.2 Reinheitszahl

Anhand des UV/Vis-Spektrums der reinen Enzymlösung konnte die Reinheitszahl der Peroxidase zu  $E_{408}/E_{280} = 2,45$  bestimmt werden (2.8.8).

### 3.4.3 Optimale Umsetzungsbedingungen

#### 3.4.3.1 Bestimmung des pH-Optimum der versatilen Peroxidase

Zur Bestimmung des optimalen pH-Wertes der Umsetzung durch die versatile Peroxidase wurde 150 mM Natriumacetatpuffer mit pH-Werten von 3,0 bis 4,5 eingesetzt. Durchgeführt wurde die Optimierung jeweils mit den Substraten ABTS (2.8.9.2.1) und DMP (2.8.9.2.2) (2.8.9.3).

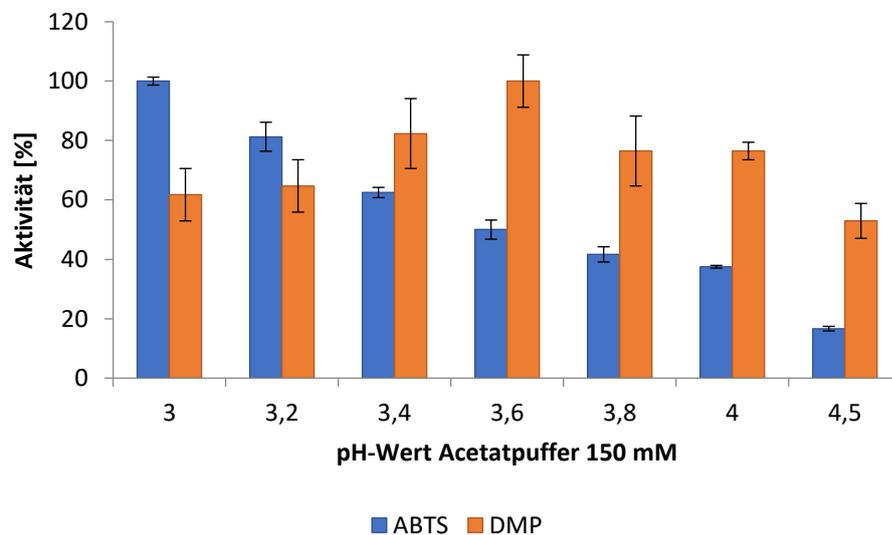


Abbildung 3.21 Vergleich der Peroxidaseaktivitäten der pVP aus *Ipex consors* bei variierenden pH-Werten, gemessen mit den Substraten ABTS und DMP

Bei der Messung der Peroxidaseaktivität mittels DMP wurde ein pH-Optimum von 3,6 bestimmt. Bei der Umsetzung mittels ABTS wurden bei tieferen pH-Werten immer bessere Aktivitäten gemessen (Abbildung 3.21).

Die Peroxidaseaktivitätsbestimmungen wurden bei einem pH von 3,6 durchgeführt.

### 3.4.3.2 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums der versatilen Peroxidase wurde im ABTS (2.8.9.2.1)- und DMP (2.8.9.2.2)-Assay der verwendete Puffer vorgewärmt und die Umsetzung ebenfalls bei entsprechender Temperatur durchgeführt. Gemessen wurde bei Temperaturen zwischen 25 bis 50 °C (2.8.9.4).

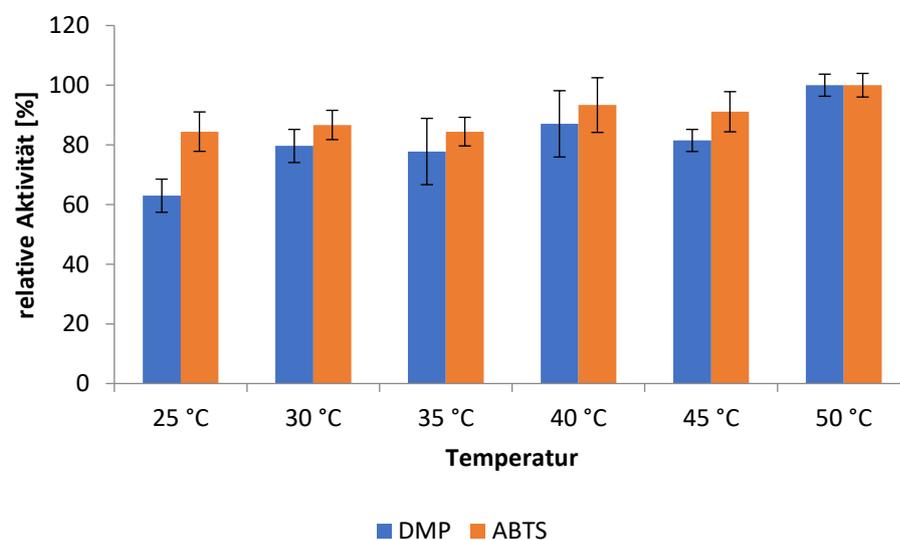


Abbildung 3.22 Vergleich der Peroxidaseaktivitäten der pVP aus *Irpex consors* bei variierenden Temperaturen, gemessen mit den Substraten ABTS und DMP

Bei einer Temperatur von 50 °C wurde sowohl mit dem Substrat ABTS also auch mit dem Substrat DMP die höchste Peroxidaseaktivität gemessen (Abbildung 3.22). Bei niedrigeren Temperaturen wurden zwischen 80-90% der Aktivität erzielt. Zwischen 30 und 45 °C sind keine deutlichen Aktivitätsunterschiede gegeben. Die ABTS- und DMP-Assays wurden bei 30 °C durchgeführt.

### 3.4.3.3 Bestimmung der optimalen Wasserstoffperoxid-Konzentration

Die Wasserstoffperoxid-Konzentration wurde sowohl im ABTS-Assay (2.8.9.2.1) als auch im DMP-Assay (2.8.9.2.2) von 17,5 - 700  $\mu\text{M}$  variiert (2.8.9.5).

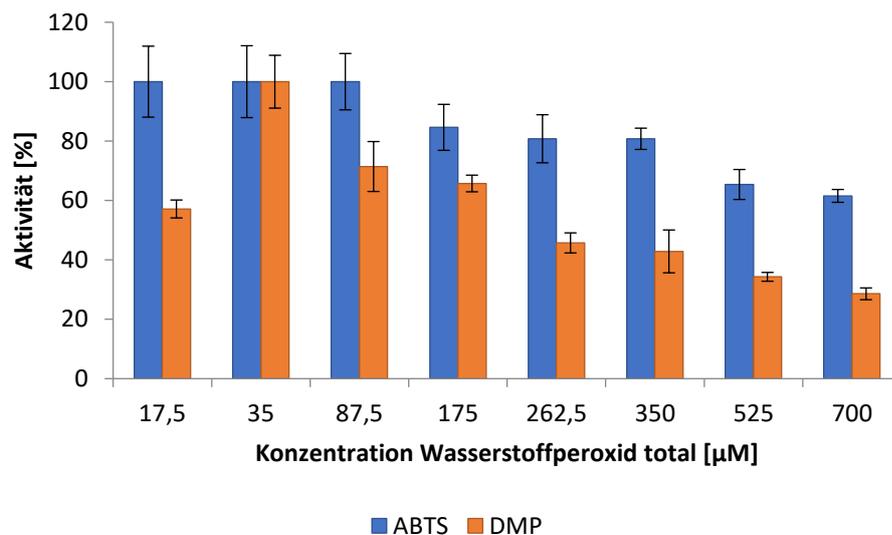


Abbildung 3.23 Vergleich der Peroxidaseaktivitäten der pVP aus *Irpex consors* bei variierenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen, gemessen mit den Substraten ABTS und DMP

Die optimale  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bei der Umsetzung des Substrates DMP lag bei 35  $\mu\text{M}$  (Abbildung 3.23). Bei der Umsetzung von ABTS liegt das Optimum zwischen 17,5 - 87,5  $\mu\text{M}$ . Die Durchführungen der ABTS- und der DMP-Assays erfolgten fortan bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 35  $\mu\text{M}$ .

### 3.4.4 Kinetische Parameter

Die Affinität der versatilen Peroxidase zu den Substraten ABTS und DMP wurde berechnet, indem die Aktivität des enzymatischen Umsatzes bei konstanter Enzymkonzentration, nicht limitierendem Überschuss an Wasserstoffperoxid und variierender Substratkonzentration bestimmt wurde.

Die gemessene Aktivität wurde gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Software OriginPro 9.3 wurde eine Hyperbel an die Messpunkte angepasst, sodass sich die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  direkt aus der Sättigungshyperbel ablesen lässt (Abbildung 3.24).

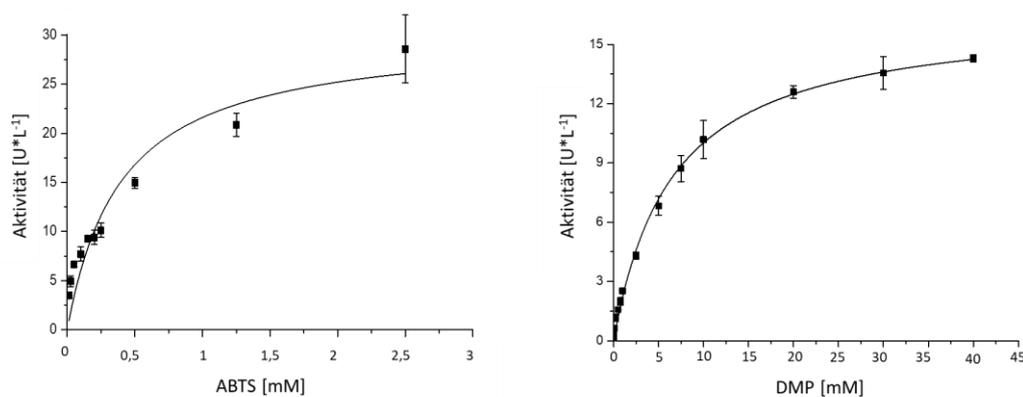


Abbildung 3.24 Auftragung der Aktivitäten [ $U \cdot L^{-1}$ ] der Umsetzung von ABTS und DMP durch pVP aus *Ipex consors* gegen die Substratkonzentrationen in [mM]

Für das Substrat ABTS wurde für die isolierte pVP  $v_{max}$  zu  $30,3 \mu M \cdot s^{-1}$  und  $K_m$  zu  $0,40 \text{ mM}$  bestimmt. Die Michaelis-Menten-Konstante für das Substrat DMP wurde zu  $K_m = 6,55 \text{ mM}$  bestimmt,  $v_{max}$  betrug  $16,6 \mu M \cdot s^{-1}$ .

### 3.4.5 Enzymstabilitätstests

#### 3.4.5.1 Bestimmung der Stabilität bei variierenden pH-Werten

Zur Bestimmung der Stabilität der versatilen Peroxidase bei kurzfristiger Lagerung wurden Aliquote der Peroxidase in Natriumacetatpuffer (pH 3 bis 4) bzw. Phosphatpuffer (pH 5 und 6) verschiedener pH-Werte umgepuffert (2.8.4). Anschließend wurde direkt oder nach entsprechender Lagerzeit die Aktivität mittels DMP-Assay gemäß (2.8.9.7) bestimmt.

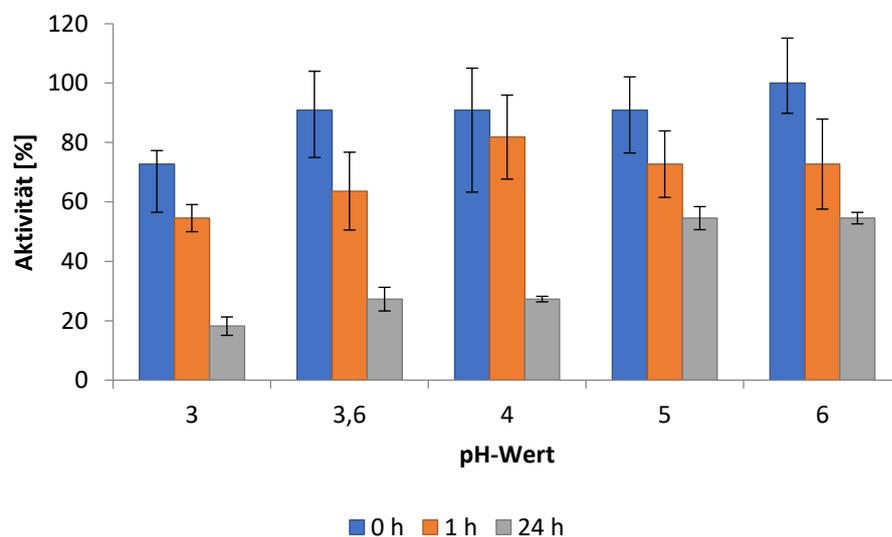


Abbildung 3.25 Vergleich der Peroxidaseaktivitäten der pVP aus *Irpex consors* bei kurzfristiger Lagerung bei verschiedenen pH-Werten über einen Zeitraum von 0 h, 1 h und 24 h, gemessen mittels DMP-Assay

Für kurzzeitige Lagerungen der versatilen Peroxidase für einen Zeitraum bis 24 h erwies sich ein pH-Wert von 6 am effektivsten, hierbei wurde die Peroxidaseaktivität weitgehend erhalten (Abbildung 3.25). Bei niedrigen pH-Werte von pH 3 bis 4 wurden höhere Verluste an Peroxidaseaktivität innerhalb der ersten 24 h gemessen.

### 3.4.5.2 Bestimmung der Stabilität bei variierenden Temperaturen

Da die Anwendung der versatilen Peroxidase im Hinblick auf Bleichungsreaktionen einen Einsatz von evtl. mehreren Stunden erfordert, wurde die längerfristige Stabilität des Enzyms bei verschiedenen Temperaturen getestet. In 3.4.3.2 wurde das Temperaturoptimum zu 50 °C bestimmt. Die folgenden, längeren Ansätze wurden bei Temperaturen von 30, 40 und 50 °C über einen Zeitraum von 0 h bis 24 h inkubiert und anschließend analog (2.8.9.2.2) die Peroxidaseaktivität gemessen.

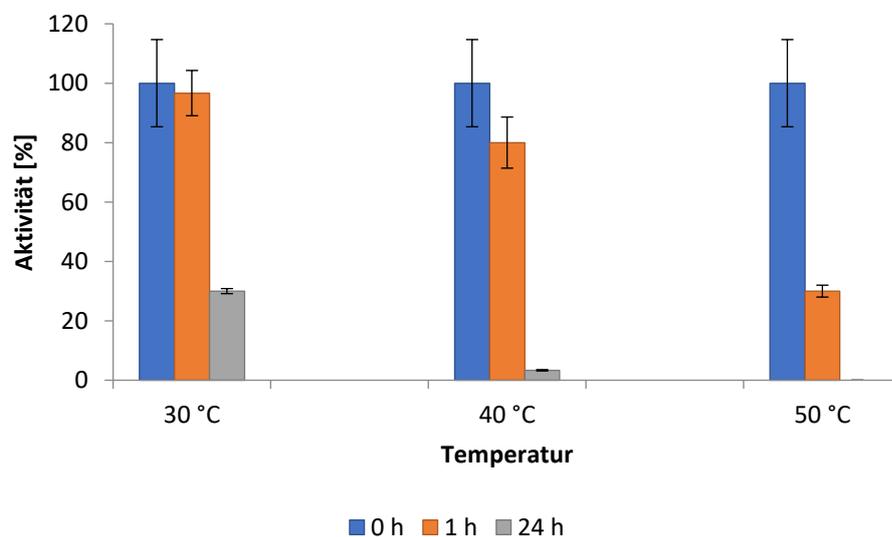


Abbildung 3.26 Vergleich der Peroxidaseaktivitäten der pVP aus *Irpex consors* bei kurzfristiger Lagerung bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 0 h, 1 h und 24 h, gemessen mittels DMP-Assay

Bei einer Temperatur von 30 °C wurden nach 24 h ca. 30% Aktivität erhalten (Abbildung 3.26). Bei höheren Temperaturen von 40 °C bzw. 50 °C wurden über einen Zeitraum von 24 h kaum bzw. keine Restaktivität erhalten. Für lange Umsetzungszeiten wie z.B. für den Melanin-Abbau (2.8.10.1.2) benötigt, wurde aufgrund dessen eine Temperatur von 30 °C angesetzt.

### 3.4.5.3 Bestimmung der Lagerstabilität bei variierenden Temperaturen

Für eine längerfristige Lagerung der gereinigten versatilen Peroxidase wurden Aliquote bei +4 °C, -20 °C und -80 °C gelagert. Nach Auftauen auf Eis wurde auf verbleibende Peroxidaseaktivität mittels DMP-Assay (2.8.9.2.2) überprüft (2.8.9.7).

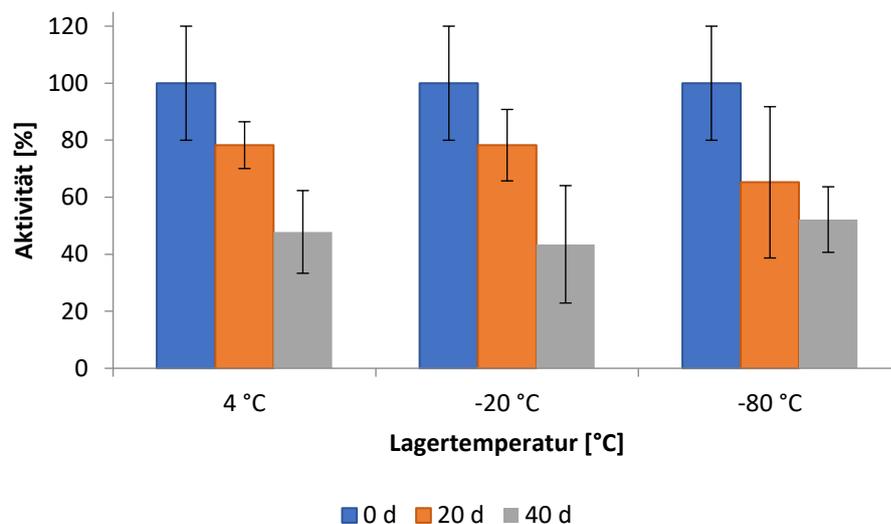


Abbildung 3.27 Vergleich der Peroxidaseaktivitäten der pVP aus *Irpex consors* bei langfristiger Lagerung bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von 0, 20 und 40 Tagen, gemessen mittels DMP-Assay

Nach einer Lagerungsdauer von 20 Tagen wurden durch die Lagerungen bei 4 °C und -20 °C höhere Peroxidaseaktivitäten erhalten als bei der Lagerung bei -80 °C (Abbildung 3.27). Nach einer Lagerungsdauer von 40 Tagen zeigte jedoch die Lagerung bei -80 °C die höchste Peroxidaseaktivität der Peroxidase im Vergleich zu den anderen Lagerungstemperaturen.

### 3.5 Melaninabbau durch die isolierte versatile Peroxidase in einem 2-Enzym-System

#### 3.5.1 Etablierung eines 2-Enzym-Systems

Ein 2-Enzym-System sollte etabliert werden bei welchem das für die Peroxidase benötigte Wasserstoffperoxid *in-situ* durch Glucoseoxidase (GOX) bereitgestellt wird. Die Aktivitäten beider Enzyme wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen bestimmt. Dabei lag der Fokus auf den zuvor optimierten Parametern der Peroxidase, diese wurden bei der Aktivitätsbestimmung der GOX beibehalten. Die Aktivität der GOX ist bei einem pH-Wert von 7,0 bei 25 °C zu 303 U\*mg<sup>-1</sup> angegeben (SERVA Electrophoresis GmbH). Da das 2-Enzym-System jedoch in saurem Milieu umgesetzt werden sollte, wurde die GOX-Aktivität bei pH-Werten von 3,2 bis 4,5 bestimmt. Folgende Aktivitäten wurden indirekt mittels ABTS-Assay berechnet (2.8.9.9) (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Ermittelte Glucoseoxidaseaktivität durch indirekte Berechnung mittels ABTS-Assay bei verschiedenen pH-Werten

pH-Wert Natriumacetatpuffer 150 mM	Aktivität GOX [U*mg <sup>-1</sup> ]
3,2	14,5
3,6	20
4,0	24
4,5	30

Mit der ermittelten Glucoseoxidaseaktivität konnten verschiedene Verhältnisse der GOX zur Peroxidase im DMP-Assay gewählt werden. Hierzu wurde der pH-Wert von 3,6 beibehalten und der Assay auf 60 min ausgedehnt (2.8.10.1.1) (Abbildung 3.28).

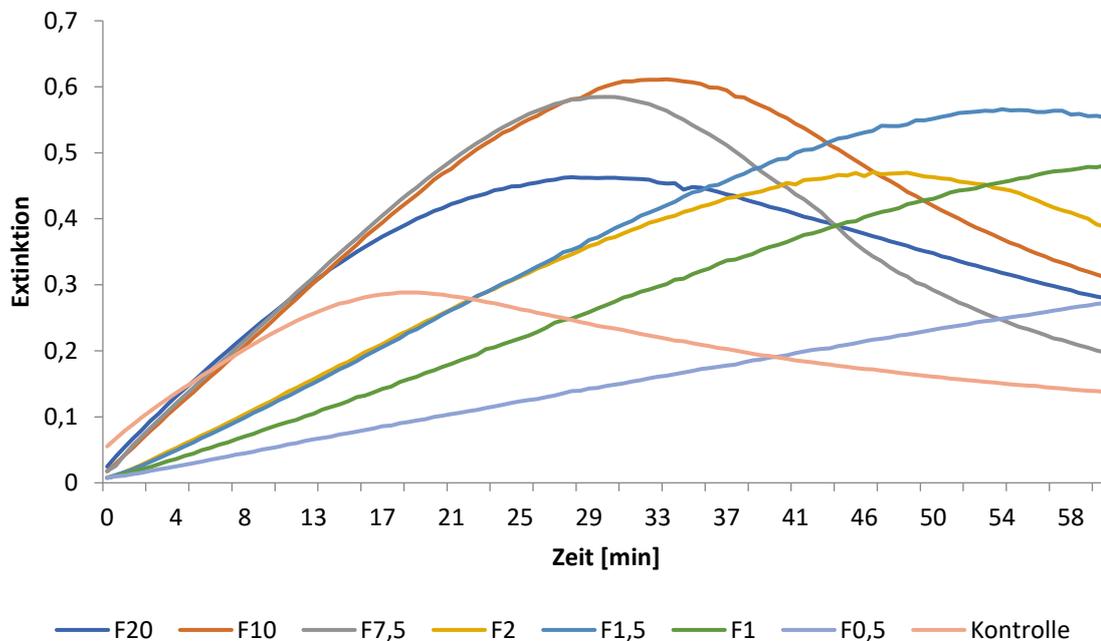


Abbildung 3.28 Umsetzung von DMP mittels 2-Enzym-System mit verschiedenen Aktivitätsverhältnissen, Kontrolle herkömmliches 1-Enzym-System mit  $H_2O_2$  statt GOX

Ist Glucoseoxidase im Überschuss vorhanden, findet die Umsetzung des Substrates schneller statt (F2 bis F20). Jedoch ist nach einer gewissen Zeit ein Abfallen der Kurven zu beobachten. Die Reaktion der Peroxidase ist durch die höhere Wasserstoffperoxidproduktion beschleunigt, diese inhibiert jedoch bei längerer Umsetzungsdauer das Enzym. Bei Verhältnissen von 1,5 bzw. 1 ist keine bzw. kaum eine Abflachung innerhalb 60 min Umsetzungsdauer festzustellen. Bei einem Verhältnis der Enzyme von 0,5 erfolgt die Umsetzung von DMP stetig, aber im Vergleich zu dem Verhältnis von 1 langsamer und damit weniger effektiv.

### 3.5.2 Anwendung des 2-Enzym-Systems zur Bleichung von Melanin

Das etablierte 2-Enzym-System wurde auf einen Bleichungsansatz mit Melanin übertragen. Die Umsetzungsdauer wurde auf sechs Stunden festgelegt. Bei einer solchen Umsetzungsdauer ist eine ausreichende, aber mäßige *in-situ*-Produktion von Wasserstoffperoxid essentiell. Aufgrund dessen wurden mehrere Aktivitätsverhältnisse der beiden Enzyme GOX und pVP gemessen. Die Messungen erfolgten bei den Wellenlängen 475 und 540 nm (Abbildung 3.29) (Abbildung 3.30):

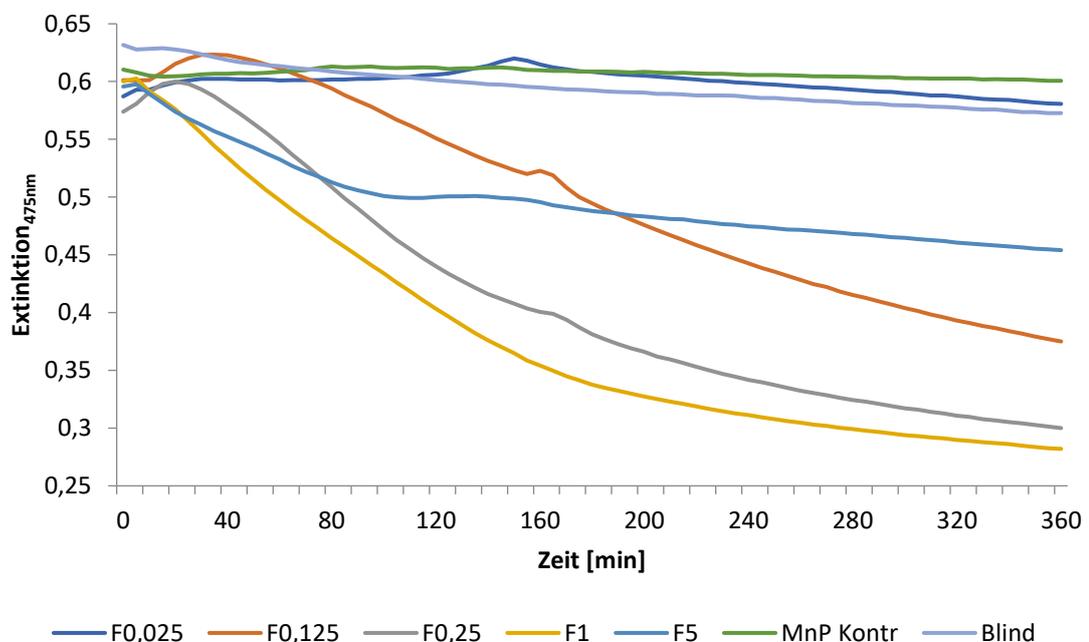


Abbildung 3.29 Extinktionsänderung der Melaninlösung durch Umsetzung mit pVP im 2-Enzym-System verschiedener Aktivitätsverhältnisse im Zeitraum von 6 h, gemessen bei 475 nm

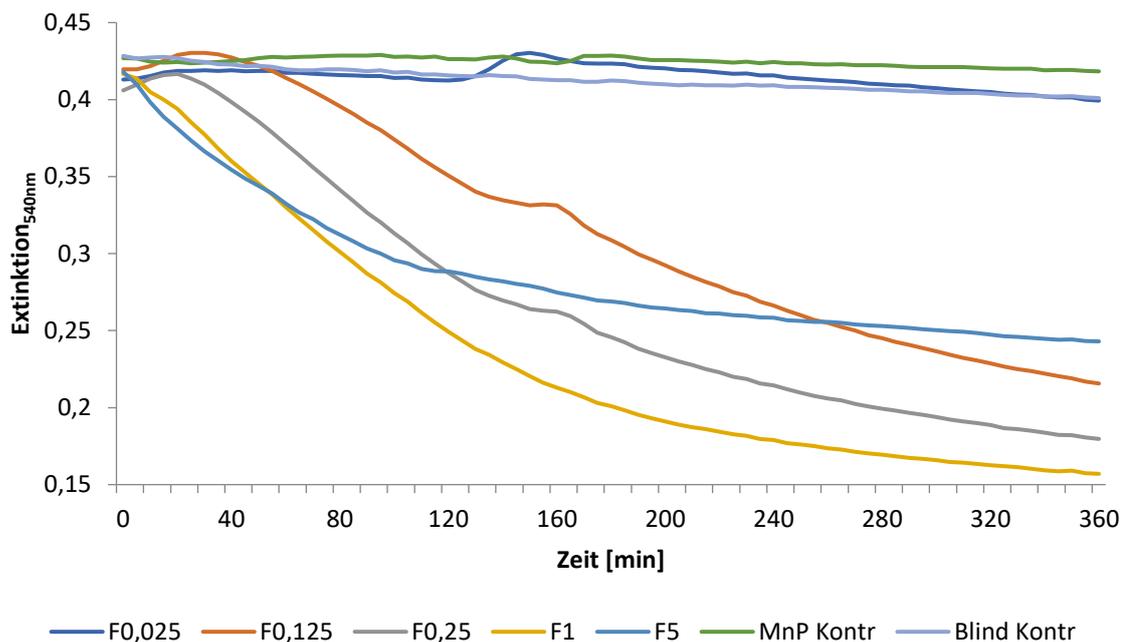
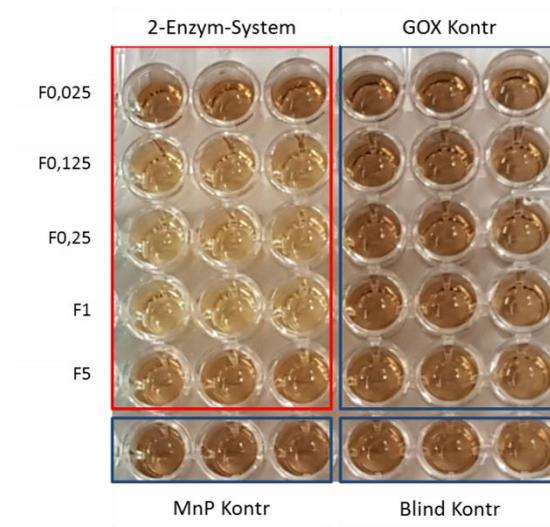


Abbildung 3.30 Extinktionsänderung der Melaninlösung durch Umsetzung mit pVP im 2-Enzym-System verschiedener Aktivitätsverhältnisse im Zeitraum von 6 h, gemessen bei 540 nm

Mittels 2-Enzym-System konnte das Substrat Melanin erfolgreich abgebaut werden. Hierbei erwies sich ein Verhältnis der Aktivität beider Enzyme von 1:1 am effektivsten. Der Abbau erfolgte dabei für etwa 150 Minuten linear, danach flachte die Kurve leicht ab.

Bei einem Verhältnis von Glucoseoxidaseaktivität zu Peroxidaseaktivität von 5:1 wurde anfangs eine raschere Bleichung gemessen. Allerdings flachte die Kurve nach ca. 60 min ab. Durchführungen mit Peroxidase im Überschuss stellten sich auch über die Dauer von sechs Stunden als weniger effektiv heraus. Die mitgeführten Negativkontrollen zeigten kaum Bleichungswirkung.

Die Mikrotiterplatte des Melaninabbaus ist in Abbildung 3.31 zu sehen. Optisch ist die Bleichung des braunen Pigments deutlich zu erkennen.



**Abbildung 3.31** Mikrotiterplatte der Melaninbleichung mit pVP im 2-Enzym-System im Vergleich zu Kontrollansätzen nach einer Umsetzungsdauer von 6 h

### 3.6 Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression der putativen versatilen Peroxidase (pVP) aus *Irpex consors* in Melaninmedium

#### 3.6.1 Primerableitung

Für die Quantifizierung der Expression der putativen versatilen Peroxidase mittels *qPCR* sollte eine Relativierung über Referenzgene erfolgen. Für die Ableitung der *Real-time*-Primer wird im Idealfall exonübergreifend gearbeitet. Da das Genom von *Irpex consors* nicht bekannt ist, mussten zunächst geeignete Referenzgene gefunden und sequenziert werden. Dabei wurde sich der hohen Homologie von *Irpex consors* zu *Cerrena unicolor* (78% Übereinstimmung der pVP zu einer Manganperoxidase aus *Cerrena unicolor*, Vergleich über Joint Genome Institute, JGI) zu Nutze gemacht, da das Genom von *C. unicolor* vollständig bekannt ist (Ko & Jung 1999, Hibi *et al.* 2012). Bei guter Übereinstimmung der entsprechenden Enzyme zu dem in *C. unicolor* geblasteten Enzym wurden Sequenzierprimer an *C. unicolor* abgeleitet.

Folgende Gene wurden gewählt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Die bei *Pleurotus ostreatus* angewendeten, ausgewählten Referenzgene und die durch Sequenzabgleich gewählten Gene in *Cerrena unicolor*

Gen	Transcript ID in PC9 (v1.0)	Protein ID in CUN (v1.1)	E-value
Actin1	114148	282752	1,37* $E^{-163}$
CytC	112752	447462	5,62* $E^{-034}$
Phos	49690	295417	3,38* $E^{-023}$

Die Alignments der Nukleotidsequenzen aus *Pleurotus ostreatus* mit den erhaltenen Sequenzen aus *Cerrena unicolor* sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 7.1) (Abbildung 7.2) (Abbildung 7.3).

Anhand der Nukleotidsequenzen von *C. unicolor* wurden folgende Sequenzierprimer abgeleitet (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 Anhand der Sequenzen der ausgewählten Gene in *Cerrena unicolor* abgeleiteten Sequenzierprimer

Nummer	Name	Sequenz	T <sub>m</sub> [°C]	Hersteller
126	CUN_CytC_for	5'>CCTTTTCGCTGCAGGTACGCTT<3'	62	eurofins
127	CUN_CytC_rev	5'>TTAAGCACACTACACAGTTGGC<3'	58	eurofins
141	CUN_actin1_for	5'>ATGGATGAAGAGGTCGCAGC<3'	59	Biomers.net GmbH, Ulm
142	CUN_actin1_rev	5'>TTAGAAGCATTTGCGGTGGACAAT<3'	59	biomers
244	ICO_Phos_For	5'>ATGGCTGCAGAGCAAGGAAAC<3'	60	biomers
245	ICO_Phos_rev	5'>CTAGGCAAAATACGTCGGC<3'	57	biomers

Die abgeleiteten Primer wurden zur Polymerase-Kettenreaktion mit isolierter genomischer DNA (2.11.4) aus *Irpex consors* eingesetzt. Hierbei wurde die PCR bei mehreren Annealingtemperaturen durchgeführt, um die jeweils beste Annealingtemperatur für die Primerpaare zu bestimmen. Die erhaltenen Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.9.1) getrennt (Abbildung 3.32).

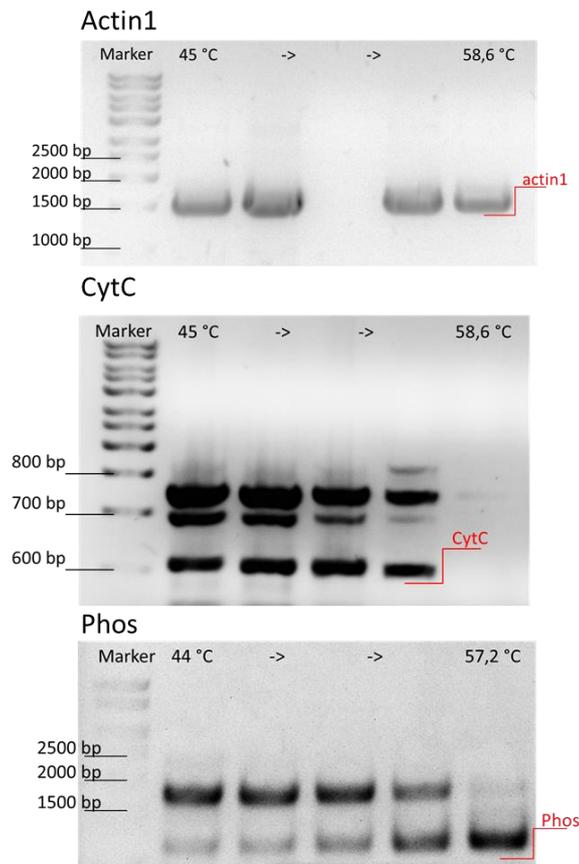


Abbildung 3.32 Agarosegele der Produkte bei verschiedenen Annealingtemperaturen der Sequenzierprimer mit genomischer DNA aus *Irpex consors*

Die Banden bei der erwarteten Targetgröße wurden ausgeschnitten und mittels PCR Clean-up Kit (2.11.10) gereinigt. Erhalten wurden die folgenden Konzentrationen (2.11.2) (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6 Konzentration und Reinheit der aus den Agarosegelen ausgeschnittenen, vermuteten Targets der PCR mit den abgeleiteten Sequenzierprimern

Target	Konzentration [ng* $\mu$ L <sup>-1</sup> ]	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	A <sub>260</sub> /A <sub>230</sub>
Actin1	238	1,82	1,89
CytC	58,3	1,84	1,14
Phos	21,8	1,85	0,26

Die gereinigten Proben wurden mit jeweils beiden verwendeten Primern separat sequenziert (2.11.10). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Sequenzen aus *C. unicolor* verglichen (Abbildung 3.33) (Abbildung 3.34) (Abbildung 3.35):



Abbildung 3.33 Abgleich der mittels abgeleiteter Sequenzierprimer 141 und 142 amplifizierten und sequenzierten Genabschnitte aus *Ipex consors* mit Actin1 aus *Cerrera unicolor*. Rot: Übereinstimmung

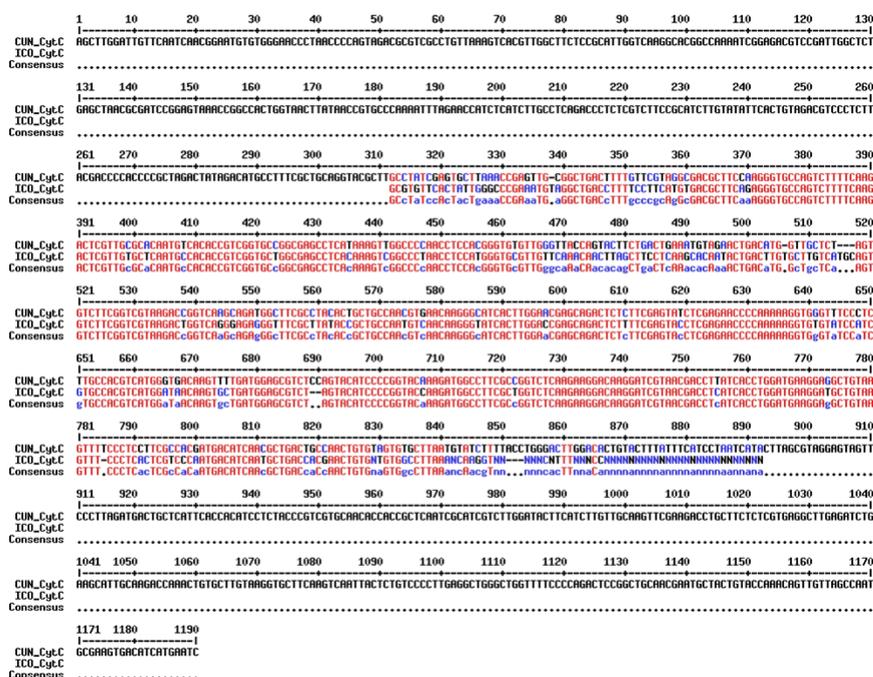


Abbildung 3.34 Abgleich der mittels abgeleiteter Sequenzierprimer 127 und 127 amplifizierten und sequenzierten Genabschnitte aus *Ipex consors* mit CytC aus *Cerena unicolor*. Rot: Übereinstimmung



Abbildung 3.35 Abgleich der mittels abgeleiteter Sequenzierprimer 244 und 245 amplifizierten und sequenzierten Genabschnitte aus *Ipex consors* mit Phos aus *Cerena unicolor*. Rot: Übereinstimmung

Durch Abgleich mit den Sequenzen aus *C. unicolor* konnte sichergestellt werden, dass es sich bei den durch die Primer amplifizierten Abschnitte der genomischen DNA von *Irpex consors* um die Zieltargets handelte. Die Nukleotidsequenzen konnten durch Sequenzierung weitgehend erhalten werden, sodass diese Sequenzen aus *Irpex consors* zur Ableitung der exonübergreifenden *Real-time*-Primer herangezogen werden konnten.

### 3.6.2 Referenzgene

Anhand der gewonnenen Nukleotidsequenzen aus *I. consors* konnten folgende exonübergreifende *Real-time*-Primer abgeleitet werden (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7 Aus den erhaltenen Sequenzen aus *Irpex consors* abgeleitete *Real-time*-Primer

Nummer	Name	Sequenz	T <sub>m</sub> [°C]
RT 11	RT_ICO_MnP_for	5'>CTCAAACGGTGGTGGAGGT<3'	59
RT 12	RT_ICO_MnP_rev	5'>GCGAATTGAATGAAGTCACCAACC<3'	61
RT 7	RT_ICO_Actin1_for	5'>ACGAGACCACCTACAACCTCCAT<3'	60
RT 8	RT_ICO_Actin1_rev	5'>CGACGATCTTGACCTTCATGCTT<3'	61
RT 65	RT_ICO_CytC_for	5'>TAACCTCCATGGTGTCTTCG<3'	57
RT 10	RT_ICO_CytC_rev	5'>CGGGGATGTACTTTTTGGG<3'	57
RT 66	RT_ICO_Phos_for1	5'>CTCACATTCATTAAGCACGTC<3'	56
RT 67	RT_ICO_Phos_rev1	5'>GATGTTGGCTCGGGCTGGAAC<3'	63

Bei der Anwendung der *Real-time*-Primer mit aus *I. consors* isolierter RNA übersetzter cDNA (2.11.5) wurde die Schmelztemperatur der entstandenen Produkte gemessen. Hierbei konnten jeweils eindeutige Schmelztemperaturen detektiert werden. Es wurde je ein sauberes Produkt ohne Nebenprodukte erhalten (Abbildung 3.36).

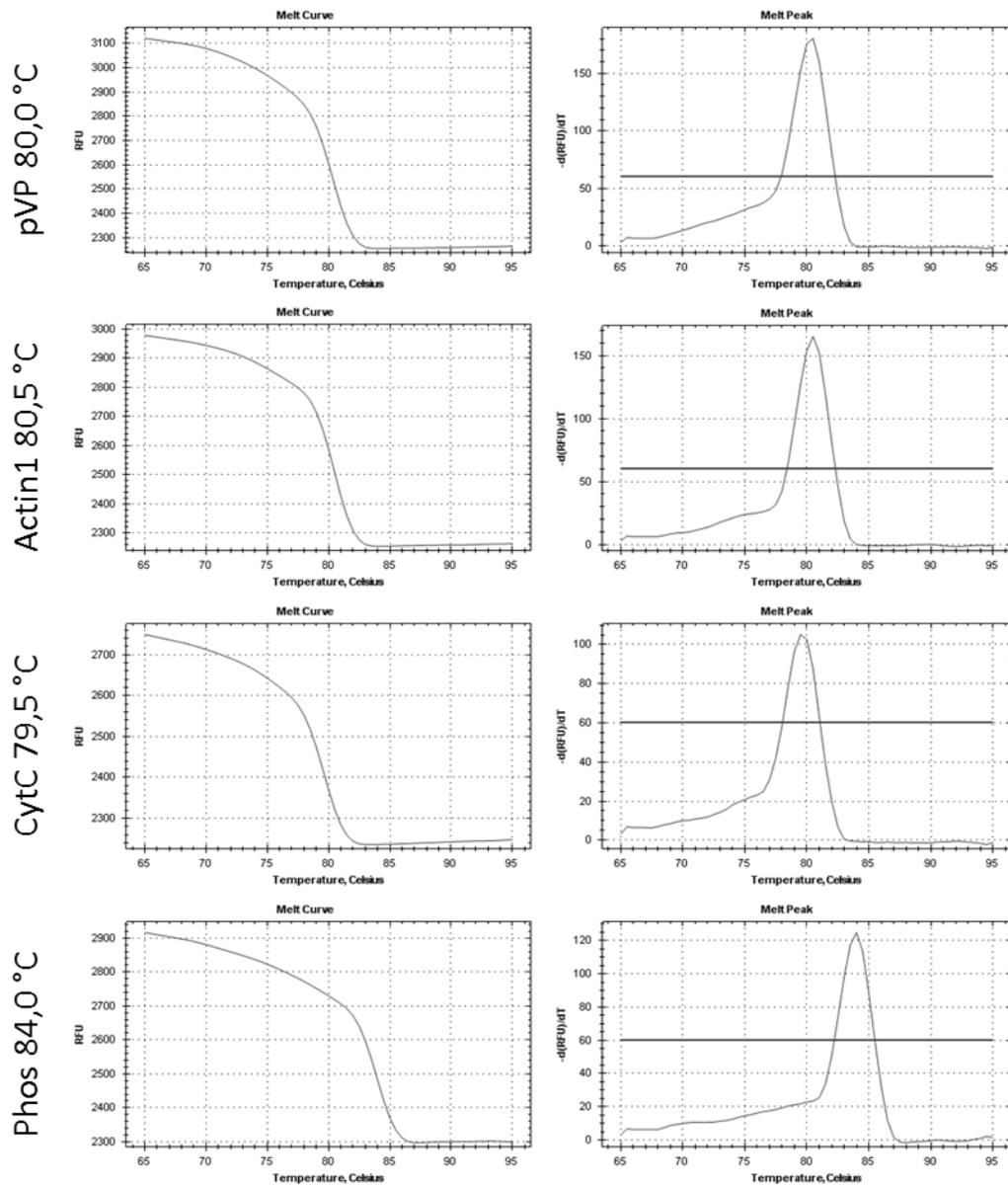


Abbildung 3.36 Schmelzkurven der PCR-Produkte bei Anwendung der *Real-time*-Primer mit cDNA aus *Irpex consors*

Die mit den *Real-time*-Primern amplifizierten Produkte wurden sequenziert (2.11.10) und durch Abgleich der erhaltenen Sequenzen als Zielprodukte bestätigt.

### 3.6.3 Expressionssteigerung der putativen versatilen Peroxidase durch Kultivierung mit Melanin

#### 3.6.3.1 Kinetik der Peroxidaseaktivität bei Kultivierung mit Melanin

Zur RNA-Gewinnung für den Nachweis der Expressionssteigerung der versatilen Peroxidase durch das Substrat Melanin wurde *Irpex consors* in Melanin-Submersmedium (2.7.3) kultiviert. Als Negativkontrolle dienten Submersmedien ohne Melanin. In beiden Fällen wurde mit biologischen Triplikaten gearbeitet. Die Kulturüberstände wurden alle zwölf Stunden mittels ABTS-Assay (2.8.9.2.1) auf ihre Peroxidaseaktivität untersucht. Hierbei konnten bei den Kultivierungen mit Melanin deutlich höhere Peroxidaseaktivität gemessen werden als bei den Negativkontrollen (Abbildung 3.37):

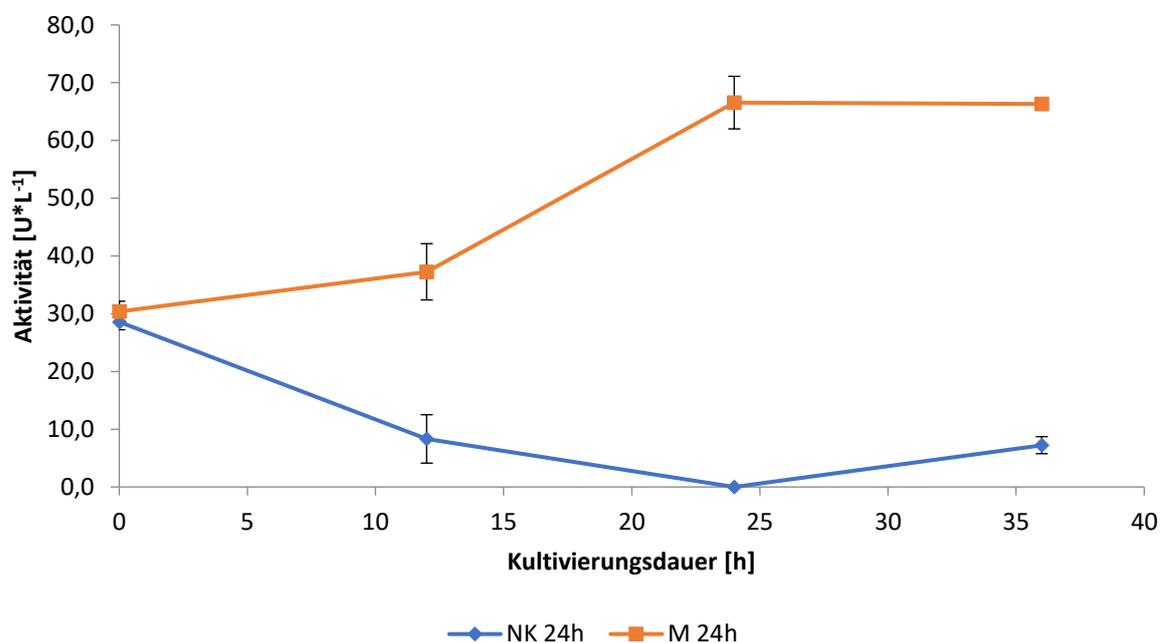


Abbildung 3.37 Peroxidaseaktivität des Kulturüberstands der Ansätze für die RNA-Isolierung, gemessen mittels ABTS-Assay. (NK) Negativkontrollen, (M) Melaninproben

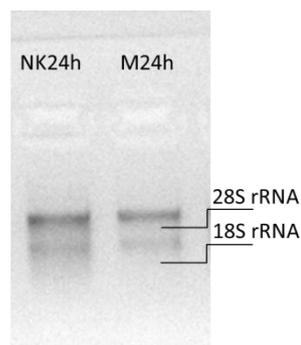
### 3.6.3.2 RT-*q*PCR

Von den biologischen Triplikaten wurden alle 12 h Mycelproben entnommen (2.7.11.2). Diese wurden vereinigt und die RNA isoliert (2.11.5). Für den Zeitpunkt  $t = 24$  h wurden nach DNA-Verdau und Phenol-Chloroform-Fällung (2.11.7) folgende Konzentrationen erhalten (Tabelle 3.8):

**Tabelle 3.8** Konzentration und Reinheit der isolierten RNA der zum Zeitpunkt  $t = 24$  h geernteten Mycelproben. Eluat A und Eluat B erhalten durch zweifache Elution des Säulchens. Negativkontrollen (NK), Melaninproben (M)

Probe		Konzentration [ $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ]	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
Eluat A	M24h	26,4	2,094	1,914
	NK24h	212	2,015	2,587
Eluat B	M24h	45,7	2,035	2,275
	NK24h	28,0	2,029	1,919

Aliquote der Eluate A von  $t = 24$  h wurde mittels 3%-igem Agarosegel (2.9.1) getrennt, um die Qualität der RNA zu überprüfen. Es konnten zwei deutliche Banden detektiert werden, was auf eine ausreichende Qualität ohne erkennbaren Zerfall hindeutet (Abbildung 3.38).



**Abbildung 3.38** Agarosegel zur Überprüfung der RNA-Qualität der Eluate A zum Zeitpunkt  $t = 24$ h. Negativkontrollen (NK), Melaninproben (M)

Die RNA-Eluate zum Zeitpunkt  $t = 24$  h wurden zur RT-*q*PCR eingesetzt. Hierbei wurden von jedem Target Dreifachmessungen durchgeführt.

Abbildung 3.39 zeigt links die Amplifikationskurven der jeweiligen Targets. Zu erkennen ist hierbei deutlich, dass die Amplifikationskurven der RNA-Proben der Kultivierungen mit Melanin ca. 6 Zyklen später als die Vergleichskontrollen verlaufen. Dieser Faktor kann jedoch durch Einbeziehen der Verläufe der Referenzgene bei der Berechnung berücksichtigt werden. Die Schmelzkurven (rechts) lieferten bei beiden Proben die gleichen Ergebnisse.

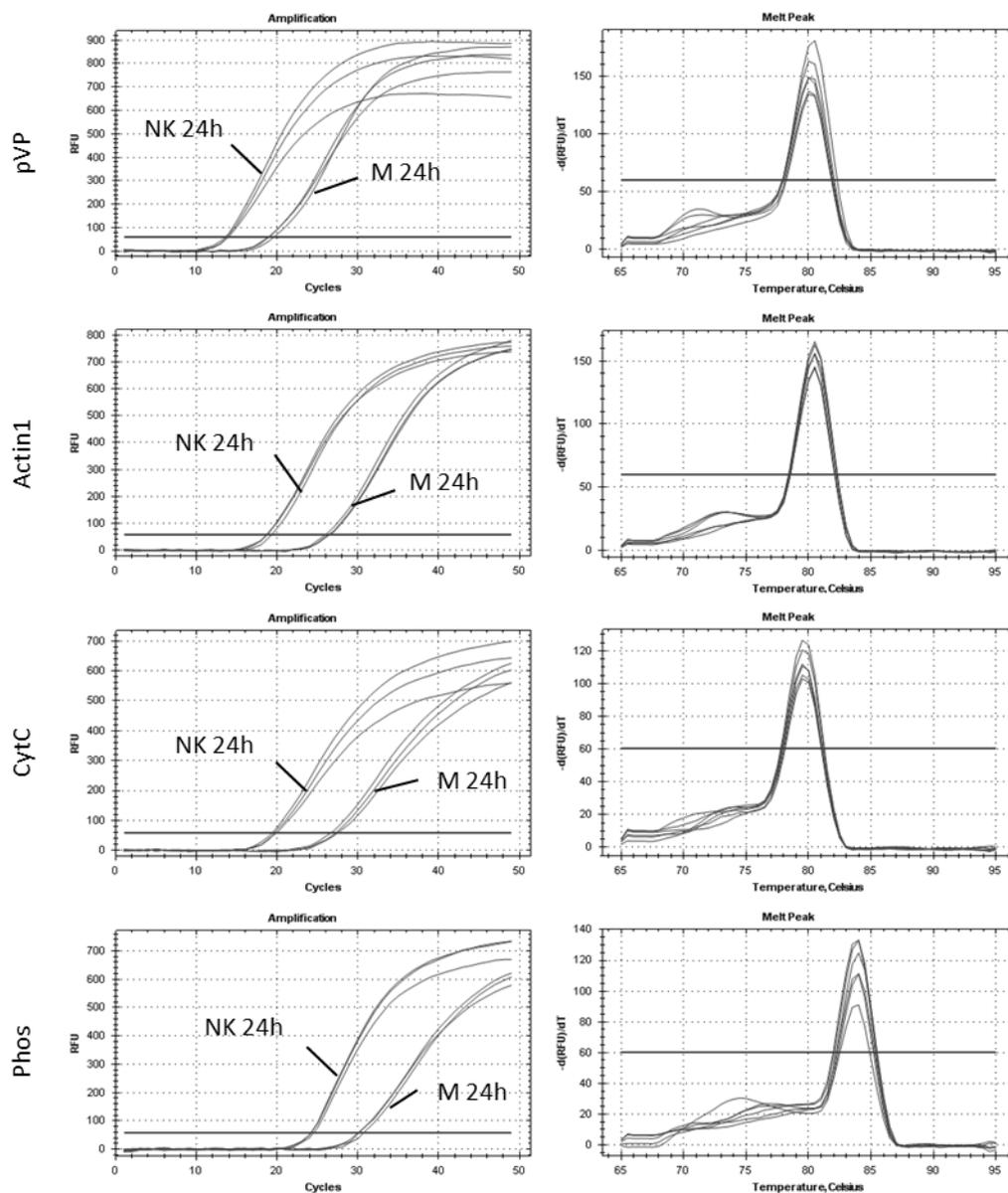


Abbildung 3.39 links SYBR Green Amplifikationskurven der RT-qPCR mit den RNA-Isolaten zum Zeitpunkt  $t = 24\text{h}$ , rechts Schmelzkurven der amplifizierten Produkte. Negativkontrollen (NK), Melaninproben (M)

In der folgenden Tabelle wurden die *threshold cycles* und die Schmelztemperaturen zusammengefasst (Tabelle 3.9).

**Tabelle 3.9 Threshold Cycles und Schmelztemperaturen der Dreifachbestimmungen der RT-qPCR aller vier Targets. Negativkontrollen (NK), Melaninproben (M)**

M 24h			NK 24h		
Target	Cq	T <sub>M</sub> [°C]	Target	Cq	T <sub>M</sub> [°C]
pVP	19,5	80,0	pVP	13,5	80,5
pVP	18,9	80,0	pVP	13,9	80,0
pVP	18,9	80,0	pVP	13,7	80,0
Actin1	26,5	80,5	Actin1	18,8	80,5
Actin1	26,0	80,5	Actin1	18,7	80,5
Actin1	26,4	80,5	Actin1	19,3	80,5
CytC	27,5	79,5	CytC	19,9	79,5
CytC	26,6	79,5	CytC	19,7	79,5
CytC	27,2	79,5	CytC	19,4	79,5
Phos	30,0	84,0	Phos	24,2	84,0
Phos	30,2	84,0	Phos	24,2	84,0
Phos	30,7	84,0	Phos	24,5	84,0

Ausgewertet wurden die Daten nach Pfaffl (2001). Hierbei wird aus den einzelnen Datenpunkten der Amplifikationskurve die logarithmische Ableitung gebildet (Abbildung 3.40). In dieser wird anschließend die maximale Steigung bestimmt. Aus der Steigung der einzelnen Messungen lassen sich im weiteren Verlauf die Effizienzen berechnen, welche zur Berechnung der Expressions-Verhältnisse herangezogen werden.

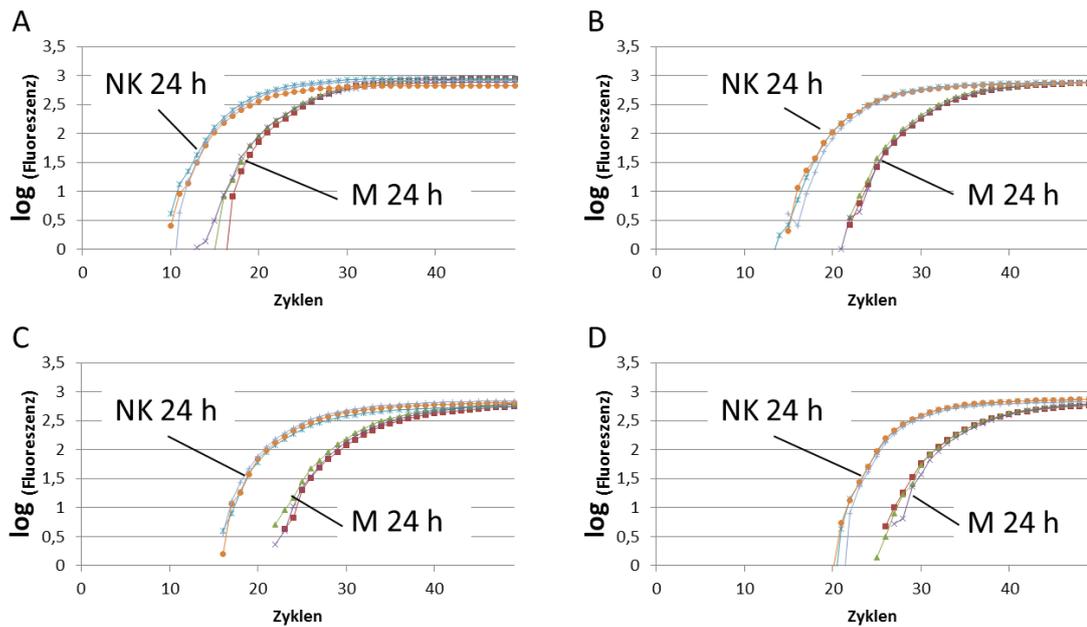


Abbildung 3.40 Logarithmische Auftragung der Amplifikationskurven der einzelnen Targets. (A) pVP, (B) Actin1, (C) CytC, (D) Phos

Folgende Ergebnisse wurden bei der Auswertung nach Pfaffl (2001) erhalten (Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10 Nach Pfaffl (2001) berechnete Effizienzen der Targets und die dadurch erhaltenen Verhältnisse der Expression von pVP in Relation zu den Referenzgenen

Gen	Probe	$C_T$	$\Delta C_T$	Effizienz E	Ratio R
pVP	M 24h	$19,1 \pm 0,30$	-5,41	$1,91 \pm 0,13$	
	NK 24h	$13,7 \pm 0,17$			
Actin1	M 24h	$26,3 \pm 0,21$	-7,39	$2,01 \pm 0,11$	5,13
	NK 24h	$18,9 \pm 0,28$			
CytC	M 24h	$27,1 \pm 0,35$	-7,47	$2,01 \pm 0,2$	5,47
	NK 24h	$19,7 \pm 0,24$			
Phos	M 24h	$30,3 \pm 0,29$	-6,01	$1,99 \pm 0,10$	1,88
	NK 24h	$24,3 \pm 0,15$			

Bei den Berechnungen über die Referenzgene Actin1 und CytC wurden Genexpressions-Verhältnisse von über 5 ermittelt. Dies spricht für eine deutliche Expressionssteigerung des Targetgens, also der Peroxidase, gegenüber der Negativkontrolle.

Allgemein kann bei einem Verhältnis von größer 2 von einer Expressionssteigerung ausgegangen werden. Mit dem Referenzgen Phos wurde das Verhältnis zu 1,88 berechnet.

## 3.7 Anwendungsansätze zur Bleichung weiterer natürlicher Farbstoffe

### 3.7.1 Enzymatische Umsetzung verschiedener natürlicher Farbstoffe

Zur Überprüfung und Erweiterung des Substratspektrums der isolierten Peroxidase wurden die natürlichen Farbstoffe Indigokarmin, Bixin, Curcumin und  $\beta$ -Carotin untersucht. Zur Bestimmung der Absorptionsmaxima der jeweiligen Farbstoffe wurden UV/Vis-Spektren (2.8.7) zwischen 320 und 720 nm aufgenommen (Abbildung 3.41). Indigokarmin, Curcumin und  $\beta$ -Carotin-Lösung (2.8.9.1) wurden in 150 mM Natriumacetatpuffer pH 3,6 und Bixin in wässriger Lösung gemessen.

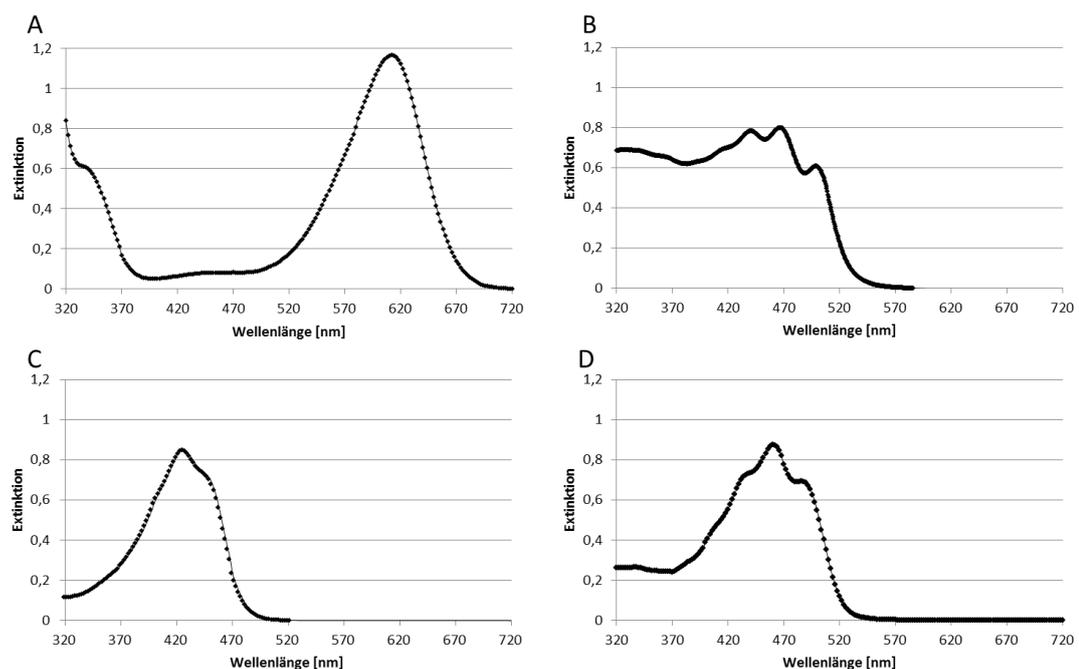


Abbildung 3.41 UV-Vis-Spektren der getesteten Farbstoffe. (A) Indigokarmin, (B) Bixin, (C) Curcumin, (D)  $\beta$ -Carotin.  
Gemessen mittels Spektralphotometer

Die folgenden Wellenlängen wurden zur Messung während der Umsetzungen mittels versatiler Peroxidase festgelegt (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11 Ermittelte Extinktionsmaxima der getesteten Farbstoffe

Substrat	Wellenlänge [nm]
Indigokarmin	612
Bixin	450
Curcumin	422
$\beta$ -Carotin	450

Die Umsetzung der Farbstoffe erfolgte analog (2.8.10.2).

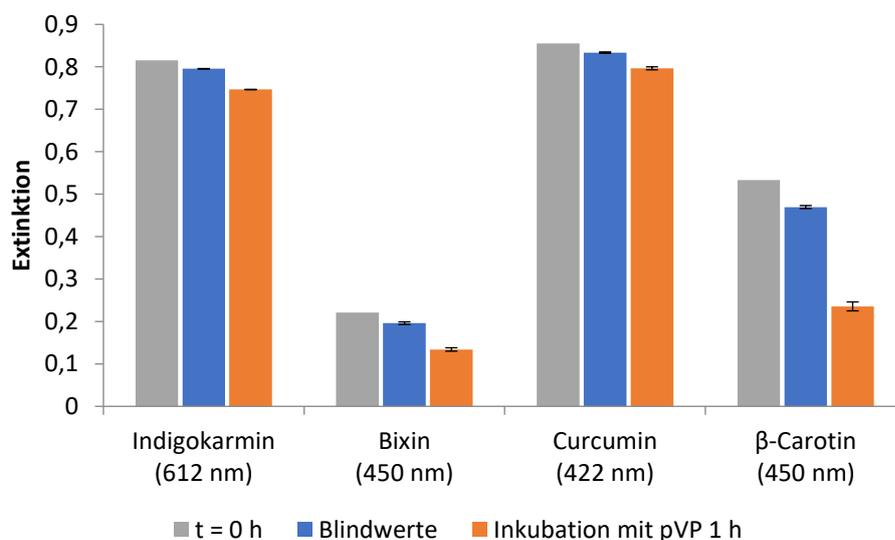


Abbildung 3.42 Abnahme der Extinktion der Farbstoffe durch Umsetzung mit pVP aus *Irpex consors* in t = 1h, gemessen mittels Spektralphotometer

Bei allen der vier getesteten Farbstoffe wurde ein Abbau der Farbstoffe aufgrund der Verringerung der Extinktion gemessen (Abbildung 3.42). Das Substrat  $\beta$ -Carotin wurde hierbei mit einer Umsetzung von ca. 50% am effektivsten abgebaut.

### 3.7.2 Umsetzung $\beta$ -Carotin

#### 3.7.2.1 Analyse der Bleichungswirkung durch das 2-Enzym-System mittels Spektralphotometer

Das angepasste 2-Enzym-System wurde auf den Abbau von  $\beta$ -Carotin übertragen (2.8.10.3.1). Als Kontrollen dienten eine Negativkontrolle, bei der nur Wasserstoffperoxid eingesetzt wurde, und das 1-Enzym-System mit versatiler Peroxidase und Wasserstoffperoxid. Der Abbau des Substrates  $\beta$ -Carotin wurde mittels AvaSpec-2048 Spektrometer gemessen. Der aufgenommene b-Wert drückt den Gelbwert einer Probe aus.

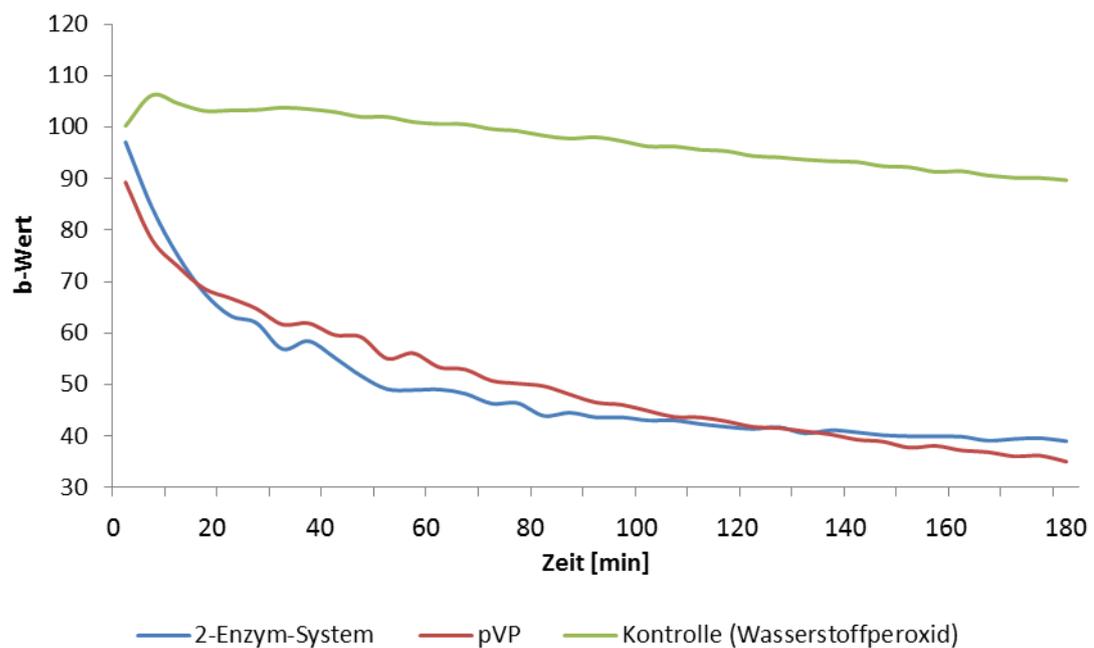


Abbildung 3.43 Abnahme des b-Wertes bei Abbau von  $\beta$ -Carotin, gemessen mittels AvaSpec Spektrometer im 2-Enzym-System im Vergleich zum 1-Enzym-System ( $H_2O_2$  + VP) und Negativkontrolle ( $H_2O_2$  ohne GOX/VP)

Die Umsetzungen von  $\beta$ -Carotin mittels 2-Enzym-System und 1-Enzym-System erzielten nach 180 Minuten eine deutliche Senkung des b-Wertes von über 60% (Abbildung 3.43). Die Abbaukinetiken beider Systeme unterschieden sich nur in geringem Maße voneinander.

Die Behandlung von  $\beta$ -Carotin nur mit Wasserstoffperoxid (Negativkontrolle) zeigte in der Behandlungsdauer von drei Stunden ebenfalls eine leichte Bleichung. Die Senkung des b-Wertes lag hier jedoch nur bei ca. 10%.

### 3.7.2.2 Identifizierung der Abbauprodukte von $\beta$ -Carotin durch pVP mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die Analysen der entstehenden flüchtigen Produkte des  $\beta$ -Carotinabbaus durch die versatile Peroxidase wurden sowohl mittels *head-space solid phase microextraction* (HS-SPME) als auch mittels *stir bar sorptive extraction* (SBSE) durchgeführt (2.8.10.3.2) (2.8.10.3.3).

Durch einen Tween® 80-Blankabgleich (ohne  $\beta$ -Carotin, pVP oder GOX) wurden die in Tabelle 3.12 aufgeführten Aldehyde identifiziert, die von dem zugegebenen Emulgator Tween® 80 mit in die Reaktionslösung eingetragen und somit nicht weiter berücksichtigt werden. Die Identifizierung der detektierten Substanzen erfolgte über NIST-Datenbankabgleich und Koväts-Indices (KI) (2.8.10.3.5), (Alkanreihen siehe Anhang Abbildung 7.11, Abbildung 7.13).

Tabelle 3.12 Liste der durch den Emulgator Tween®80 eingetragenen Substanzen und deren berechnete Kováts-Indices im Vergleich zu Literaturwerten

Substanz	KI <sub>HS-SPME</sub>	KI <sub>SBE</sub>	KI <sub>Lit</sub>
Heptanal	1.183	<1.200	1.174 <sup>1</sup>
Octanal	1.287	1.292	1.280 <sup>2</sup>
(2,E)-Octenal	1.329	1.331	1.345 <sup>3</sup>
Nonanal	1.392	1.387	1.385 <sup>4</sup>
(2,E)-Nonenal	1.535	1.537	1.510 <sup>5</sup>
(2,E)-Decenal	1.643	1.644	1.601 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>(Chung *et al.* 1993); <sup>2</sup>(Fischer & Grosch 1987); <sup>3</sup>(Ullrich & Grosch 1987); <sup>4</sup>(Schieberle & Grosch 1987); <sup>5</sup>(Valim *et al.* 2003); <sup>6</sup>(Schnermann & Schieberle 1997)

Durch Vergleich der Umsetzungen durch pVP mit Negativkontrollen konnten vier Substanzen identifiziert werden, welche zwar in der Negativkontrolle auch nachweisbar waren, durch Umsetzung mit pVP jedoch an Fläche zunahmen.

Mittels HS-SPME erhaltene Chromatogramme im direkten Vergleich (Abbildung 3.44).

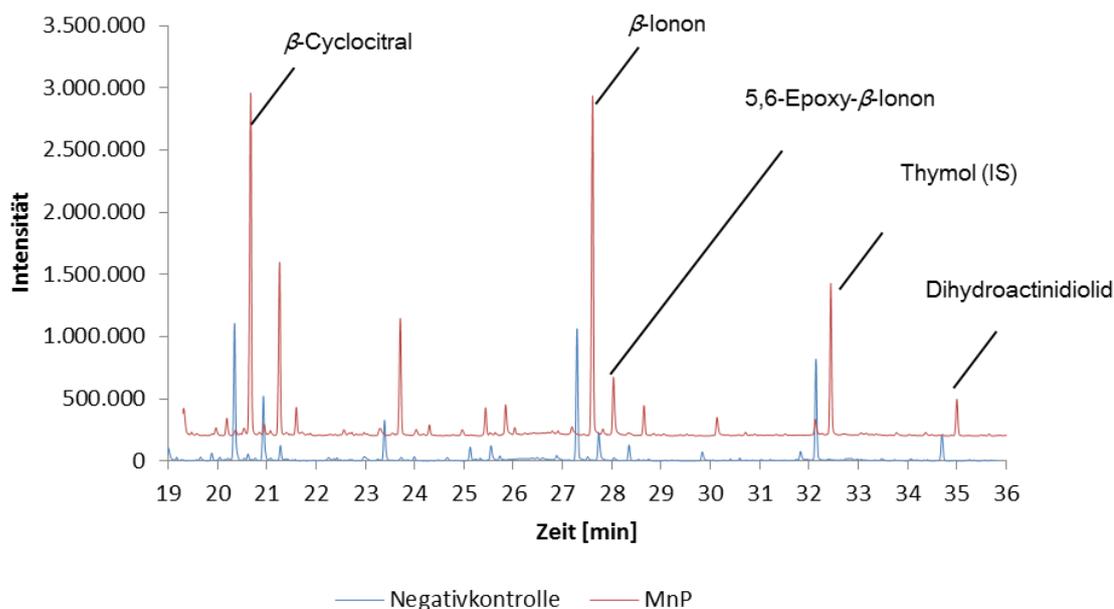


Abbildung 3.44 Überlagerung der Chromatogramme der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit pVP (rot, hinten) im Vergleich zur Negativkontrolle (blau, vorne), gemessen mittels HS-SPME-GC-MS

Mittels SBSE wurden dieselben Abbauprodukte identifiziert (Abbildung 3.45).

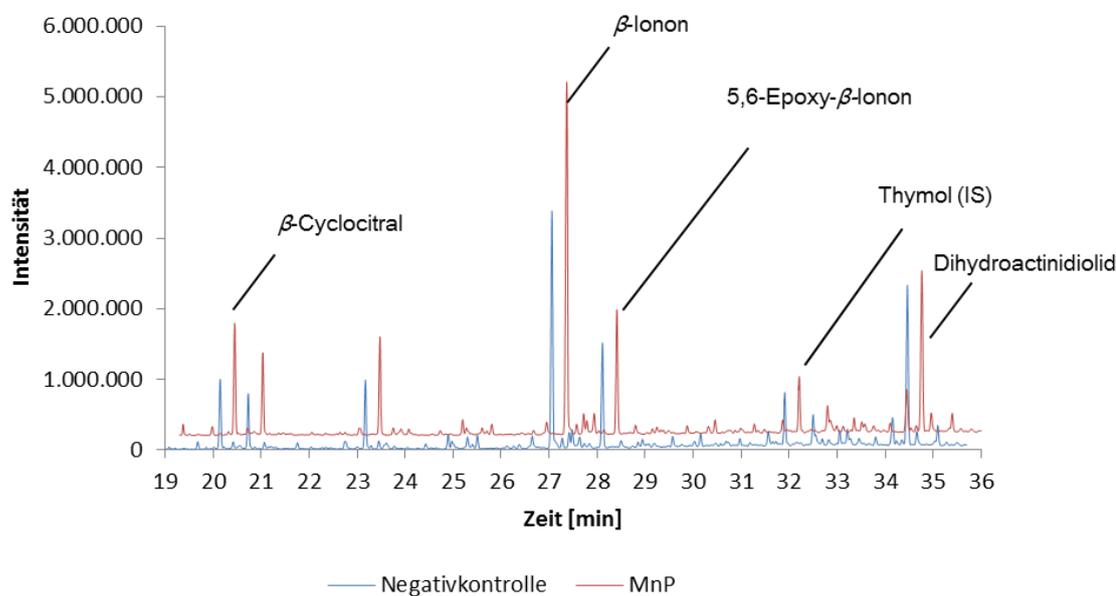


Abbildung 3.45 Überlagerung der Chromatogramme der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit pVP (rot, hinten) im Vergleich zur Negativkontrolle (blau, vorne), gemessen mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS

Die vier identifizierten Abbausubstanzen sind in Tabelle 3.13 aufgeführt, die Abgleiche der gemessenen Massenspektren mit den jeweiligen Massenspektren der NIST-Datenbank befinden sich im Anhang (Abbildung 7.14, Abbildung 7.15, Abbildung 7.16, Abbildung 7.17).

Tabelle 3.13 Liste der identifizierten Substanzen, deren Flächen durch Umsetzung mit pVP im Vergleich zur Negativkontrolle gesteigert wurden

Substanz	HS-SPME		SBSE		Literatur
	R <sub>T</sub> [min]	KI	R <sub>T</sub> [min]	KI	KI
$\beta$ -Cyclocitral	20,3	1.617	20,2	1.616	1.623 <sup>1</sup>
$\beta$ -Ionon	27,3	1.940	27,0	1.939	1.912 <sup>2</sup>
5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon	28,4	1.997	28,1	1.997	1.958 <sup>2</sup>
4-Dihydroactinidiolid	34,7	2.332	34,5	2.332	2.337 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> (Priestap *et al.* 2003); <sup>2</sup> (Berger *et al.* 1989); <sup>3</sup> (Lee *et al.* 2005)

### 3.7.2.3 Quantifizierung der Abbauprodukte mittels HS-SPME-GC-MS

Die beiden Abbauprodukte  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral sollten quantifiziert werden. Hierzu wurde Thymol als interner Standard gewählt und mit  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral-Standardsubstanzen eine Kalibrierreihe erstellt. Damit konnten die jeweiligen Response-Faktoren der Substanzen für das jeweilige System bestimmen werden (2.8.10.3.6).

Die folgende Abbildung (Abbildung 3.46) zeigt eine Überlagerung der Chromatogramme der fünf gemessenen Kalibrierlösungen.

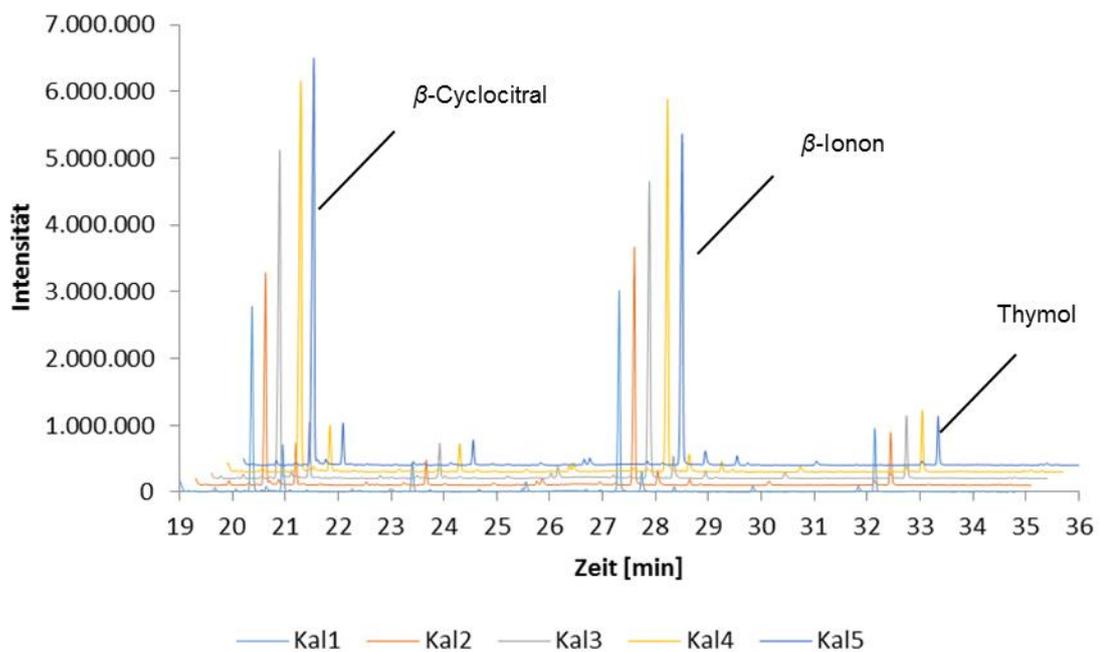


Abbildung 3.46 Überlagerung der Chromatogramme der Kalibrierlösungen gemessen mittels HS-SPME-GC-MS

Durch die Auftragung der Konzentrationsverhältnisse zu den Flächenverhältnissen konnten Kalibriergeraden der zu quantifizierenden Substanzen der jeweiligen Systeme erstellt werden. Das Bestimmtheitsmaß ist angegeben (Abbildung 3.47).

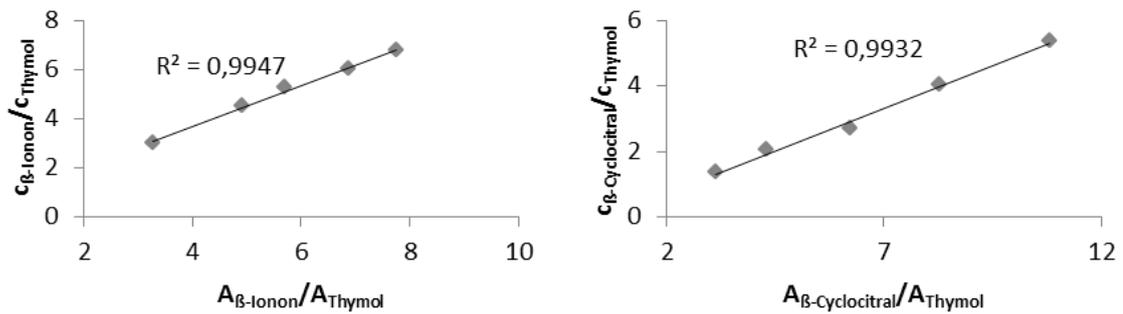


Abbildung 3.47 Kalibriergeraden der Substrate  $\beta$ -Ionon (links) und  $\beta$ -Cyclocitral (rechts) und deren Bestimmtheitsmaß, gemessen mittels HS-SPME-GC-MS

Mit den erhaltenen Kalibriergeraden konnten die Responsefaktoren der jeweiligen Standards bestimmt werden. Der Responsefaktor von  $\beta$ -Cyclocitral wurde zu  $R_f = 0,66$  und von  $\beta$ -Ionon zu  $R_f = 1,28$  berechnet.

Anhand der ermittelten Responsefaktoren für die jeweiligen Substanzen konnten anschließend die erhaltenen Produktkonzentrationen nach Umsetzung von  $\beta$ -Carotin durch pVP berechnet werden (Tabelle 3.14).

Tabelle 3.14 Berechnete Konzentrationen von  $\beta$ -Cyclocitral und  $\beta$ -Ionon durch Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit pVP bzw. in Negativkontrolle, gemessen mittels HS-SPME-GC-MS

	c(pVP)	c(NK)	c pVP/ Ansatz	t
	[ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	[ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	[min]
$\beta$ -Cyclocitral	262 $\pm$ 15	151 $\pm$ 2	0,85	30
$\beta$ -Ionon	540 $\pm$ 74	291 $\pm$ 14	0,85	30

### 3.7.2.4 Quantifizierung der Abbauprodukte mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS

Die beiden Abbauprodukte  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral sollten ebenfalls mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS quantifiziert werden. Hierzu wurde die Kalibrierreihe mit  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral-Standardsubstanzen zu gleichen Bedingungen angefertigt (2.8.10.3.6).

Die folgende Abbildung (Abbildung 3.48) zeigt eine Überlagerung der Chromatogramme der fünf gemessenen Kalibrierlösungen.

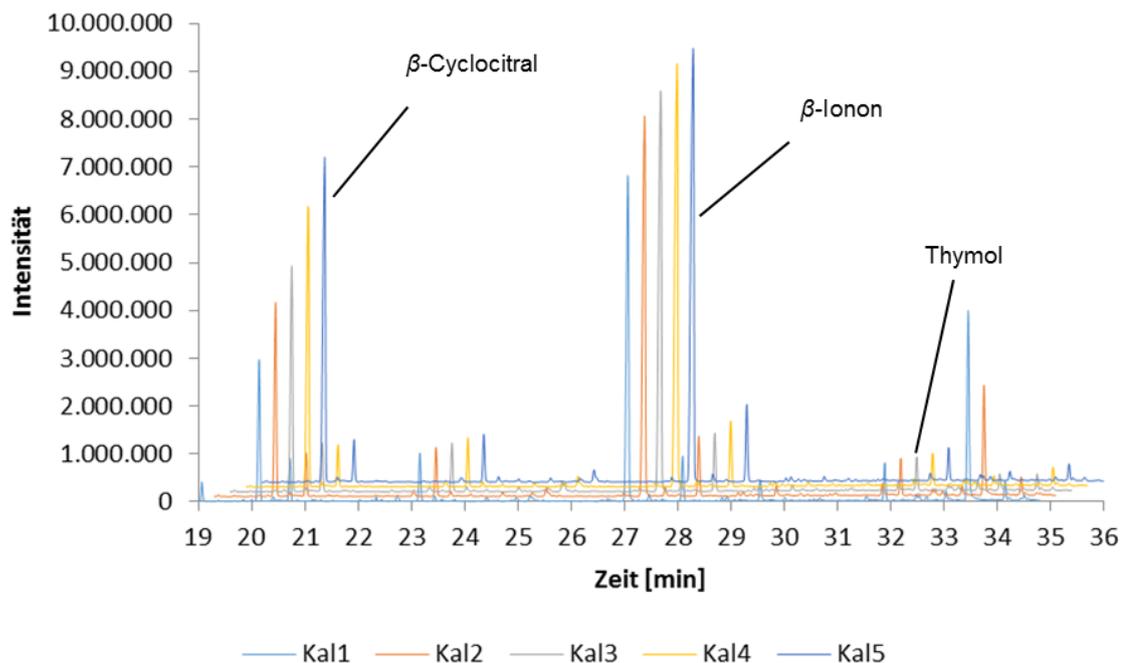


Abbildung 3.48 Überlagerung der Chromatogramme der Kalibrierlösungen gemessen mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS

Durch die Auftragung der Konzentrationsverhältnisse zu den Flächenverhältnissen konnten Kalibriergeraden der zu quantifizierenden Substanzen der jeweiligen Systeme erstellt werden. Das Bestimmtheitsmaß ist angegeben (Abbildung 3.49).

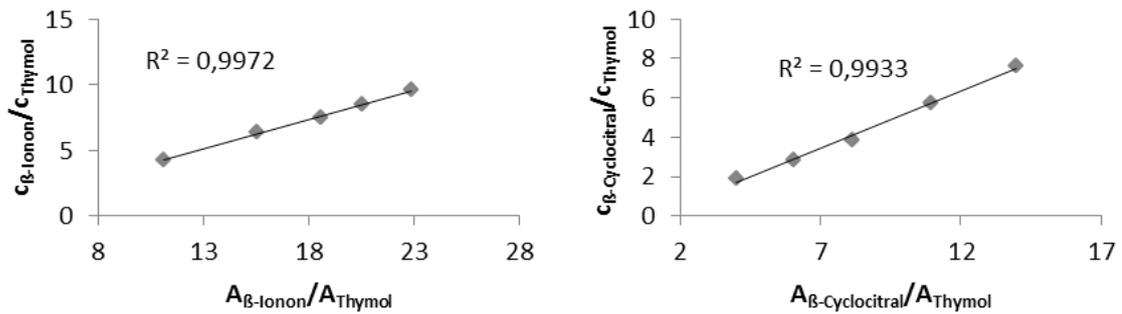


Abbildung 3.49 Kalibriergeraden der Substrate  $\beta$ -Ionon (links) und  $\beta$ -Cyclocitral (rechts) und deren Bestimmtheitsmaß, gemessen mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS

Mit den Formeln der erhaltenen Kalibriergeraden konnten die Responsefaktoren für  $\beta$ -Cyclocitral zu  $R_f = 0,50$  und für  $\beta$ -Ionon zu  $R_f = 0,41$  bestimmt werden.

Anhand der bestimmten Responsefaktoren konnten die Konzentrationen der Abbauprodukte bestimmt werden (Tabelle 3.15).

Tabelle 3.15 Berechnete Konzentrationen von  $\beta$ -Cyclocitral und  $\beta$ -Ionon durch Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit pVP bzw.in Negativkontrolle, gemessen mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS

	c(pVP) [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	c(NK) [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	c pVP/ Ansatz [ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	t [min]
$\beta$ -Cyclocitral	118 $\pm$ 3	73 $\pm$ 12	0,425	60
$\beta$ -Ionon	364 $\pm$ 22	214 $\pm$ 32	0,425	60

## 4 Diskussion

### 4.1 Gewinnung und Identifizierung der versatilen Peroxidase

Durch den Basidiomyceten *Irpex consors* konnte auf Melaninagarplatten und in Melanin-Submersmedium eine rasche Bleichwirkung erzielt werden. Das für die Arbeiten verwendete Melanin war entweder aus L-Dopa hergestelltes, synthetisches Eumelanin oder kommerziell erworbenes Eumelanin von Sigma-Aldrich, welches aus L-Tyrosin durch Umsetzung mittels Wasserstoffperoxid hergestellt wurde. Bezüglich der Melaninbleichung sind die verschiedenen Arten von Melanin wie Eumelanin, Phäomelanin, Neuromelanin, Allomelanin und Pyomelanin, welche unter 1.1 näher beschrieben wurden, zu berücksichtigen. So lässt sich die Bleichwirkung auf synthetische Melanine nicht unbedingt auf andere Melaninarten übertragen. Es wurde bereits gezeigt, dass Peroxidasen mit Bleichwirkungen auf Melanin in der Lage sind, mehrere verschiedene Typen abzubauen (Butler & Day 1998). Jedoch wurden auch Fälle publiziert, in denen ein Enzym zwar einen bestimmten Typ Melanin abbauen konnte, eine andere Art jedoch nicht oder in wesentlich geringerem Umfang (Nagasaki *et al.* 2008, Kaneko *et al.* 2009). Es wäre naheliegend, ein bestimmtes Melanin, welches in einem speziellen Fall von Interesse ist, aus natürlichen Vorkommen zu extrahieren. Die Umsetzung dessen ist jedoch schwierig, da die schwerlöslichen Melanine nicht problemlos extrahiert werden können. Viele Möglichkeiten der Isolierung oder der Gewinnung eines speziellen Melanins stellen harsche Extraktionsmethoden dar, die zum Beispiel in stark alkalischem Milieu durchgeführt werden. Diese Extraktionsmethoden verändern jedoch auch die extrahierten Melaninmoleküle, sodass das dadurch gewonnene Melanin nicht mehr seine ursprüngliche Struktur besitzt und somit auch andere Eigenschaften aufweist, was deren Abbau betrifft (Butler *et al.* 2005). Aus diesem Grund wurde das leicht zugängliche, synthetische Eumelanin als „Modell-Melanin“ verwendet. Jedoch sind die eventuellen Abweichungen der Bleichwirkungen auf verschiedene andere Melaninarten zu berücksichtigen.

Viele bisher publizierte Arbeiten zum Abbau von Melanin durch Enzyme aus Basidio- und Ascomyceten beschreiben Peroxidasen als die für den Abbau entscheidenden Enzyme. Durch Aktivitätsmessungen der Kulturüberstände der positiv getesteten Basidiomyceten konnte im Kulturüberstand von *Irpex consors* im Vergleich zu den anderen Basidiomyceten die höchste Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden. Aus diesem Grund und aufgrund der sehr raschen Bleichwirkung wurde *Irpex consors* als Organismus ausgewählt. Der zeitliche Verlauf der Peroxidaseaktivität wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen überprüft. Dabei konnten zwei lokale Maxima gemessen werden. Es scheint ein wellenförmiger Expressionsrhythmus vorzuliegen.

Bei der Zugabe von kleinen Melaninagarplättchen zu Submerskulturen von *Irpex consors* konnte eine vollständige Bleichung der Agarplättchen erzielt werden. Auf den Agarplättchen selbst konnte nach sieben Tagen Inkubationsdauer kein Bewuchs festgestellt werden. Die Bleichung der Plättchen im Kulturüberstand deutete auf extrazelluläre Aktivität des umsetzenden Enzyms hin, was weitere Reinigungs- und Isolierungsschritte vereinfachte.

Der erste Aufarbeitungsschritt, die Ammoniumsulfatfällung, wurde nicht fraktioniert durchgeführt. Vielmehr wurde durch die Fällung eine teilweise Abtrennung des verwendeten Substrates erzielt. Bei den Substraten Melanin oder auch BretaxCl kam es zu Problemen im weiteren Verlauf der Reinigung, insbesondere durch starke Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial der DEAE-Sepharose™ Anionentauschersäule der FPLC. Durch die Ammoniumsulfatfällung konnten zumindest große Teile dieser Substrate entfernt werden. Die Verluste der Aktivität durch die durchgeführte Fällung waren gering. In der Literatur beschriebene Verfahren zur Reinigung versatiler Peroxidasen bestehen oft aus einem dreistufigen Prozess oder einer Ammoniumsulfatfällung mit anschließender zweistufiger FPLC-Reinigung (De La Rubia, Teresa de *et al.* 2002, Martínez *et al.* 2005).

Der Schritt der Tangentialfluss-Filtration zur Abtrennung höhermolekularer Bestandteile (>300 kDa) wurde zwischengeschaltet, da der konzentrierte Kulturüberstand sonst eine gallertartige Viskosität annimmt.

Um dies zu verhindern und um in späteren Schritten die Säulenmaterialien zu schonen, wurde dieser erste Filtrierschritt trotz hoher Verluste an Peroxidaseaktivität durchgeführt. Im zweiten Filtrierschritt wurde durch die verwendete Ausschlussgröße von <10 kDa der Kulturüberstand konzentriert und auf den im nächsten Schritt benötigten Puffer umgepuffert.

Anschließend wurde der vorbereitete Kulturüberstand durch einen schwachen Anionentauscher mittels FPLC gereinigt. Hierbei wurde ein Salzgradient von 0 bis 1 M Ammoniumsulfat gefahren. Die erhaltenen Fraktionen mit Peroxidaseaktivität eluierten hierbei ab einer Salzkonzentration von ca. 0,6 M. Durch isoelektrische Fokussierung mit anschließender ABTS-Aktivitätsfärbung konnten Enzyme mit Peroxidaseaktivität sichtbar gemacht werden. Bei der Färbung mittels Coomassie stellte sich jedoch heraus, dass die erhaltenen Fraktionen nicht komplett rein waren, sondern noch fremde, nicht peroxidaseaktive Enzyme in den gleichen Fraktionen eluierten. Diese Beobachtung stimmte mit dem erhaltenen UV-Signal des FPLC-Chromatogramms überein. Aufgrund dessen wurde ein weiterer Reinigungsschritt angeschlossen. Über eine Größenausschlussäule wurden die Enzyme nach ihrer Größe getrennt. Hierbei konnten reine Enzymfraktionen erhalten werden. Zwar erschien in der angefertigten SDS-PAGE und im IEF-Gel in der ersten peroxidaseaktiven Fraktion noch ein anderes Enzym von ähnlicher Größe und pI, welches jedoch in den darauffolgenden Fraktionen nicht mehr enthalten war. Somit konnte die Enzymreinigung erfolgreich umgesetzt werden. Das Zielenzym wurde rein erhalten. Über den gesamten Aufarbeitungs- und Reinigungsverlauf waren jedoch Aktivitätsverluste von bis zu 70% zu beobachten.

Die Enzymreinigung wurde nicht nur mit Kulturüberstand aus Melaninmedium durchgeführt, es wurden auch die Sulfitablauge BretaxCl, Vanillin, Oxalsäure, Ferulasäure, Gallussäure, Veratrylalkohol und DMP als Induktoren getestet. Vorhergehende Arbeiten an Basidiomyceten haben gezeigt, dass Kultivierungen mit diesen Substraten eine vermehrte Bildung von Peroxidasen induzieren können. So konnte beispielsweise bei dem Basidiomyceten *Irpex lacteus* durch die Substrate Oxalsäure, Veratrylalkohol und DMP eine wesentlich höhere extrazelluläre Manganperoxidaseaktivität erzielt werden (Qin *et al.* 2014).

Bei *Irpex consors* konnten ebenfalls durch die verwendeten Induktoren die jeweiligen Peroxidaseaktivitäten im Vergleich zu Negativkontrollen signifikant gesteigert werden. Hierbei stellten sich besonders Oxalsäure und Vanillin als geeignet heraus.

Von den Kulturüberständen der Kultivierungen mit den oben genannten Substraten wurden ebenfalls Enzymreinigungen durchgeführt. Sowohl die Bestimmung der molekularen Masse mittels SDS-PAGE als auch die isoelektrische Fokussierung zeigten jeweils ein Enzym gleicher Masse und mit dem gleichen isoelektrischen Punkt wie in den mit Melanin supplementierten Kulturen.

Die molekulare Masse wurde mit 47 kDa bestimmt. Bisherige Publikationen zeigen ähnliche Werte für verschiedene versatile Peroxidasen von 38 bis 47 kDa (Camarero *et al.* 1999, Chen *et al.* 2010, Taboada-Puig *et al.* 2011b, Taboada-Puig *et al.* 2011a, Schüttmann *et al.* 2014). Die molekulare Masse, welche man bei 332 Aminosäuren ohne Glycosylierungen rechnerisch erhält, beträgt 37 kDa. Bei vergleichbaren Peroxidasen aus *P. eryngii* beispielsweise beträgt der Glycosylierungsgrad 5 - 7% (Ruiz-Duenas *et al.* 1999b). Zwar sind Kohlenhydrat-Seitenketten für die Funktion extrazellulärer Peroxidasen aus Pilzen nicht essentiell (Nie *et al.* 1999, Sato *et al.* 2004), jedoch werden ihnen schützende Eigenschaften, wie zum Beispiel die Erhöhung der Thermostabilität, zugeschrieben (Lis & Sharon 1993, Sugano *et al.* 2000, Rehm 2002).

Der isoelektrische Punkt liegt bei einem Wert von 3,5, welcher ebenfalls vergleichbar mit versatilen Peroxidasen anderer Spezies ist. Diese bewegen sich zwischen pI 3,45 und pI 4,1 (Chen *et al.* 2010, Taboada-Puig *et al.* 2011a).

Das gereinigte Enzym wurde mittels tryptischem Verdau und anschließender MALDI-TOF-MS/MS-Analyse durch Datenbankabgleich als Manganperoxidase von *Spongipellis* sp. (Q2HWK0) identifiziert. Auch die aus dem Kulturüberstand von *Irpex consors* aus Medien mit BretaxCl, Vanillin, Oxalsäure und DMP gereinigten Peroxidasen wurden als dasselbe Enzym identifiziert. Die Peroxidasen aus den Kultivierungen mit Ferulasäure, Gallussäure und Veratrylalkohol wurden nicht zusätzlich identifiziert.

Es handelt sich in allen Fällen um dieselbe Peroxidase, welche bereits durch Imami *et al.* (2015) aus dem Kulturüberstand von *Irpex consors* extrahiert wurde. Imami *et al.* (2015) beschäftigten sich mit dem Abbau von Lignin, welcher auch auf diese Peroxidase zurückzuführen ist. Das Enzym wurde als putative versatile Peroxidase eingestuft. Nicht aufgeklärt ist eine eventuelle falsche Annotation von *Spongipellis* sp. Die Annotation von *Irpex consors* ist durch ITS-Sequenzen und NCBI-Datenbankeinträge verifiziert. Die in den SDS-PAGE und IEF-Gelen detektierten Doppelbanden wurden in dieser Arbeit zur Enzymidentifikation jeweils separat als identische Peroxidasen identifiziert. Das häufige Auftreten von Isoenzymen bei Peroxidasen ist bereits bekannt (Gold & Alic 1993). Sie wurden zum Beispiel in *P. chrysosporium*, *P. eryngii* und *T. versicolor* nachgewiesen (Johansson & Nyman 1996, Ruiz-Duenas *et al.* 1999b, Martinez 2002, Hoegger *et al.* 2007). Von Imami *et al.* (2015) wurden die Enzyme der in SDS- und IEF-Gelen auftretenden Doppel- bzw. Tripelbande auf Höhe der versatilen Peroxidase ebenfalls als deren Isoenzyme eingestuft. Die N-terminale Aminosäuresequenz wurde mittels Edmann-Abbau aufgeklärt, wobei die ersten 12 Aminosäuren als VACPDGVNTATN verifiziert wurden. Die N-terminale Aminosäuresequenz einer versatilen Peroxidase aus *Bjerkanda* sp. zeigt mit VAXPDGVNTATNAAAXXALFAVRDDI hohe Übereinstimmungen mit der hier isolierten Peroxidase aus *Irpex consors* (Taboada-Puig *et al.* 2011b).

Versatile Peroxidasen (EC 1.11.1.16) verbinden als Hybride aus Ligninperoxidasen und Manganperoxidasen die katalytischen Eigenschaften beider Enzyme. Sie sind in der Lage, auch Substrate mit hohen Redoxpotentialen umzusetzen (Heinfling *et al.* 1998). Durch Wasserstoffperoxid werden Peroxidasen zweifach oxidiert, indem das Peroxid mit der Hämgruppe der Peroxidase reagiert. Die so aktivierte Peroxidase oxidiert darauffolgend in zwei Schritten durch Ein-Elektron-Übergänge zwei Substrateinheiten. Dabei fällt es von der zweifach oxidierten Stufe (Compound I, CI) über die einfach oxidierte Stufe (Compound II, CII) in die ursprüngliche Form zurück (Abbildung 4.1). Versatile Peroxidasen verfügen dabei über mehrere mögliche Reaktionswege.

Zugangswege zur Häm-Einheit bestehen zum einen aus einem größeren Tunnel, durch welchen auch Wasserstoffperoxid zum Eisen-Atom der Häm-Gruppe gelangt (Ruiz-Dueñas *et al.* 2008, Pollegioni *et al.* 2015). Zum anderen besitzen sie einen kleineren Tunnel, durch welchen  $Mn^{2+}$  zur Bindungsstelle direkt am Propionat der Häm-Gruppe gelangt. Diese besteht aus drei Säureresten (1x Aspartam, 2x Glutamat) (Gómez-Toribio *et al.* 2001, Pérez-Boada *et al.* 2005). Die Mangan-Bindungsstelle ist typisch für Manganperoxidasen und versatile Peroxidasen (Kishi *et al.* 1996, Sundaramoorthy *et al.* 1997, Whitwam *et al.* 1997). Die an diesen Bindungsstellen aktivierten Verbindungen werden als  $CI_A$  und  $CII_A$  bezeichnet (Ruiz-Duenas *et al.* 1999a). Die dritte Möglichkeit der Reaktion mit Substraten liegt auf der Oberfläche des Enzyms. Der dabei agierende Tryptophanrest ist essentiell für die Oxidation großer und komplexer Substrate (Blodig *et al.* 1998, Choinowski *et al.* 1999). Das Elektron wandert durch *long range electron transfer* (LRET) zum Tryptophanrest. Dieses kann anschließend an der Oberfläche mit großen Substratmolekülen reagieren, welche beispielsweise durch sterische Hinderung nicht bis zur Häm-Gruppe des Enzyms vordringen können (Martínez, Pérez-Boada *et al.* 2005, Tsukihara *et al.* 2008). Auch Substrate mit hohen Redox-Potentialen vermögen diese Bindungsstelle zu oxidieren (Camarero *et al.* 1999). Die dabei am Tryptophanrest aktiven Spezies werden als  $CI_B$  und  $CII_B$  bezeichnet (Pérez-Boada *et al.* 2005) (Abbildung 4.1).

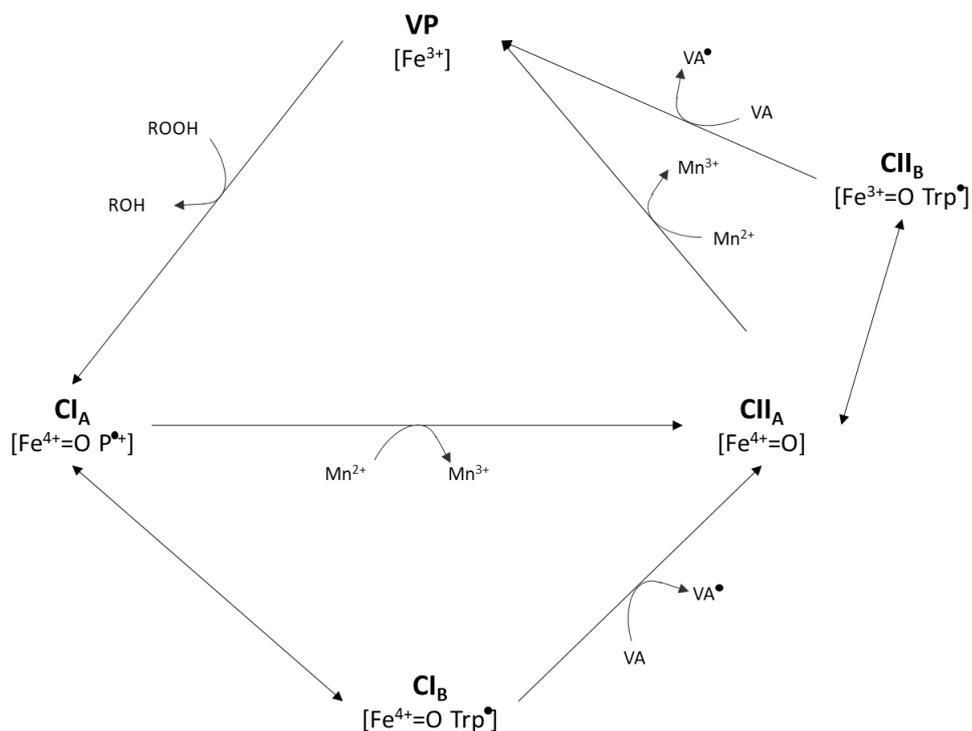


Abbildung 4.1 Aktivierung und Reaktion einer versatilen Peroxidase. Zweifach oxidierte Spezies Cl<sub>A</sub>, welche zu Cl<sub>B</sub> umgelagert werden kann, danach Reaktion mit Substraten in zwei Stufen zurück zur ungeladenen Form VP (modifiziert nach Pérez-Boada *et al.* 2005)

Der Tryptophanrest auf der Peroxidaseoberfläche ist typisch für Ligninperoxidasen, jedoch gibt es zu dem Tryptophanrest einer versatilen Peroxidase Unterschiede. So konnte das Tryptophan W171 einer Ligninperoxidase aus *Pleurotus eryngii* am C<sup>β</sup> hydroxyliert werden, was bei dem Tryptophanrest W164 einer versatilen Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* nicht nachgewiesen werden konnte (Pérez-Boada *et al.* 2005). Versatile Peroxidasen reagieren an der Tryptophaneinheit direkt mit Substraten, während Ligninperoxidasen (LiP) indirekt über Veratrylalkohol reagieren, welcher somit als Redox-Mediator genutzt wird. Die höhere Affinität der LiP zu Veratrylalkohol ist durch die Umgebung seiner Tryptophaneinheit zu erklären: bei Ligninperoxidasen liegt die Tryptophaneinheit durch vier umliegende, saure Aminosäuren in einer sauren Umgebung, während die Tryptophaneinheit versatiler Peroxidasen weniger sauer umgeben ist (Pérez-Boada *et al.* 2005, Tsukihara *et al.* 2008). Die saure, negativ geladene Umgebung kann somit das Veratrylalkoholkation besser binden als eine neutrale Umgebung.

Versatile Peroxidasen besitzen die kombinierten Eigenschaften von Lignin- und Manganperoxidasen, von denen sich alle Bindungsstellen im Molekül finden (Abbildung 4.2).

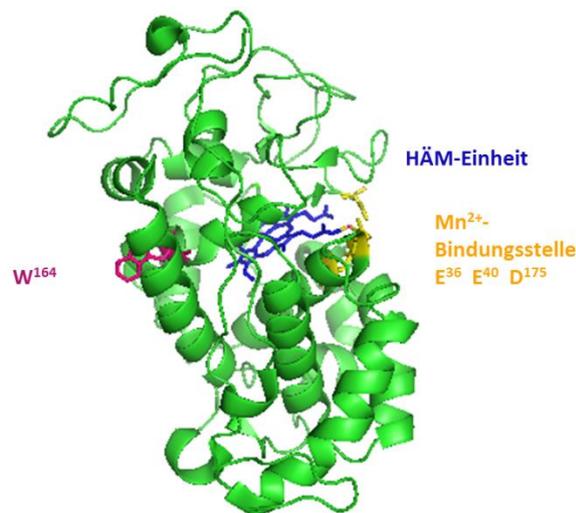


Abbildung 4.2 3-D-Modell einer versatilen Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* (Perez-Boada *et al.*, 2005) (PDB: 2BOQ.1).

Links der oberflächenaktive Tryptophanrest W<sup>164</sup> (pink), mittig die Häm-Region (blau), sowie recht die Manganbindungsstelle mit den Aminosäuren E<sup>36</sup>, E<sup>40</sup> und D<sup>175</sup> (gelb). Modell erstellt via pyMOL Molecular Graphic System

In der Sequenz der isolierten versatilen Peroxidase aus *Irpex consors* sind die konservierten Mangan-Bindungsstellen an E<sup>39</sup>, E<sup>43</sup> und D<sup>185</sup>, sowie der Tryptophanrest W<sup>165</sup> vorhanden. Die folgende Abbildung (Abbildung 4.3) zeigt die Elektronendichtestruktur der versatilen Peroxidase aus *Irpex consors*. Dabei lassen sich die Mangan-Bindungsstelle (links, gelb) sowie der Tryptophanrest (rechts, pink) auf den gegenüberliegenden Seiten der Enzymoberfläche erkennen.

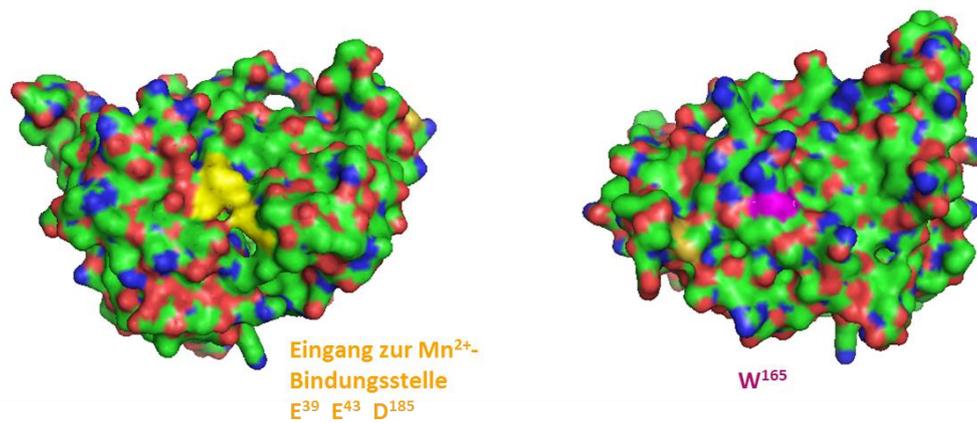


Abbildung 4.3 Struktur der Elektronendichte der versatilen Peroxidase aus *Ipex consors*, links der Zugang der Manganbindungsstelle mit den Aminosäuren E<sup>39</sup>, E<sup>43</sup> und D<sup>185</sup> (gelb), rechts der Tryptophanrest W<sup>165</sup> auf der Enzymoberfläche (pink). Homologiemodell berechnet mittels ExPASy SWISS-MODEL an PDB: 2BOQ.1. 3-D-Modell erstellt via PyMOL Molecular Graphic System

## 4.2 Enzymcharakterisierung

Das pH-Optimum der versatilen Peroxidase wurde zu 3,6 mittels DMP bestimmt. Auch für versatile Peroxidasen aus *Bjerkandera* sp. und *Pleurotus eryngii* wurden pH-Optima zwischen 3,0 und 3,5 beschrieben (Heinfling *et al.* 1998, Taboada-Puig *et al.* 2011b, Taboada-Puig *et al.* 2011a). Diese Untersuchungen sind jedoch sehr substratabhängig. Es wurde beobachtet, dass sich für Substrate, welche durch  $Mn^{3+}$  umgesetzt werden, oft pH-Bereiche im schwach sauren Bereich (pH~5) besser eignen, während Mangan-unabhängige Umsetzungen im saureren Bereich (pH~3) effizienter erfolgen (Heinfling *et al.* 1998).

Die optimale Umsetzungstemperatur in einem Temperaturbereich von 25 bis 50 °C wurde bei 50 °C gemessen. Dieser Temperaturbereich wurde auch bei anderen Peroxidasen als optimal beschrieben (Chen *et al.* 2010). Jedoch wurden keine höheren Temperaturen getestet, da eine Umsetzung bei 50 °C zwar über einen Zeitraum von 10 Minuten die schnellste Substratumsetzung erreicht, die Applikation für diese Peroxidase jedoch in einem längeren Zeitraum liegen. Eine rasche Umsetzung innerhalb der ersten 10 Minuten mit einer alsbaldigen Inaktivierung, welche bei anderen versatilen Peroxidasen beschrieben ist (Chen *et al.* 2010), wäre ineffizienter als eine Umsetzung bei 30 bis 40 °C, welche über einen längeren Zeitraum insgesamt mehr Substrat umsetzt. Die milderen Umsetzungstemperaturen sind enzymeschonender und somit über einen längeren Zeitraum in der Lage ist, mehr Substrat umzusetzen. Aus diesem Grund wurde auch die langfristige Aktivität bei verschiedenen Temperaturen getestet. Dabei stellte sich eine Umsetzungstemperatur von 30 °C als enzymeschonend und trotzdem hinreichend effizient heraus.

Die optimale Wasserstoffperoxidkonzentration wurde zu 35  $\mu$ M bestimmt und liegt damit in einem sehr niedrigen Bereich. Eine höhere Wasserstoffperoxidkonzentration stellte sich als inhibierend heraus. Die optimale Konzentration liegt in einem recht engen Konzentrationsbereich.

Bei versatilen Peroxidasen wurde bereits publiziert, dass sie, im Vergleich zu anderen Peroxidasen, eine eher niedrige Wasserstoffperoxidtoleranz besitzen (Gonzalez-Perez *et al.* 2014, Schüttmann *et al.* 2014, Sáez-Jiménez *et al.* 2015).

Bei zu hoher Wasserstoffperoxidkonzentration tritt zuerst eine reversible Inhibierung ein. Bei einer deutlich zu hohen Konzentration ist diese Inhibierung irreversibel und auch als Suizid-Inhibierung der Peroxidase bekannt (Arnao *et al.* 1990, Baynton *et al.* 1994). Aktuelle Bestrebungen zur Senkung der Wasserstoffperoxidempfindlichkeit haben gezeigt, dass durch *Cross-linking* von versatilen Peroxidasen mit anderen Enzymen wie Laccasen oder Glucoseoxidasen die Peroxidempfindlichkeit herabgesetzt werden kann (Taboada-Puig *et al.* 2011b).

Das UV/Vis-Spektrum der reinen versatilen Peroxidase zeigte einen deutlichen Extinktionsbande bei einer Wellenlänge von 408 nm, was der Wellenlänge der Soret-Bande entspricht. Die Soret-Bande deutet auf die Anwesenheit einer Häm-Bande hin. Weiter konnten in höheren Wellenlängenbereichen zwei weitere lokale Maxima detektiert werden, die Charge-Transfer-Banden. Diese sind ebenfalls typisch für Peroxidasen und wurden auch für versatile Peroxidasen publiziert (Pérez-Boada *et al.* 2005).

Für die Lagerung stellten sich pH-Werte im neutralen Bereich als am enzymeschonendsten heraus. Dies konnte auch bei einer versatilen Peroxidase von *Bjerkanda* sp. bestätigt werden (Taboada-Puig *et al.* 2011b). Bei der Lagerungstemperatur zeigten sich über einen Zeitraum von 20 Tagen nur geringe Unterschiede zwischen +4 °C, -20 °C und -80 °C. Bei längerer Lagerung von 40 Tagen konnte eine Temperatur von -80 °C den besten Erhalt der Aktivität erzielen. Jedoch waren hier die Unterschiede minimal. Das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff mit anschließender Lagerung bei -80 °C stellte die beste Methode dar. Hier könnten durch längere Expositionszeiträume möglicherweise deutlichere Ergebnisse erhalten werden. Zukünftig könnten Untersuchungen zu anderen Lagerungsmethoden wie zum Beispiel in einem Glycerinstock oder Gefriertrocknung weitere Erkenntnisse liefern.

### 4.3 Melaninabbau durch ICO VP

Der Melaninabbau durch pilzeigene Enzyme wurde bereits in einigen Publikationen erfolgreich durchgeführt. Die beschriebenen verantwortlichen Enzyme werden als Laccasen oder Peroxidasen wie Manganperoxidasen oder Ligninperoxidasen eingestuft (Rättö *et al.* 2001, Woo *et al.* 2004, Nagasaki *et al.* 2008, Kaneko *et al.* 2009, Khammuang & Sarnthima 2013). Die aus dem Kulturüberstand von *Irpex consors* isolierte versatile Peroxidase sollte im Rahmen dieser Arbeit zum Melaninabbau eingesetzt werden. Bisherige Ansätze zum Melaninabbau durch Peroxidasen wurden meist über Umsetzungszeiträume zwischen mehreren Stunden bis zwei Tagen durchgeführt (Liu *et al.* 1995, Rättö *et al.* 2001, Woo *et al.* 2004, White & Traquair 2006). Um eine Substratumsetzung über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen, ist eine Aufrechterhaltung der Wasserstoffperoxidkonzentration wichtig. Durch die Instabilität von Wasserstoffperoxid und dessen Verbrauch durch die Peroxidase ist eine *in-situ* Nachlieferung von Wasserstoffperoxid ideal, da eine höhere Startkonzentration aufgrund möglicher Inhibierung der Peroxidase nicht zielführend ist. Deshalb wurde ein 2-Enzym-System entwickelt, welches mit Glucoseoxidase (GOX) als kontinuierlichem Wasserstoffperoxidproduzenten arbeitet. Dabei muss eine ausreichende Glucosekonzentration bereitgestellt werden, aus welcher GOX kontinuierlich H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzieren kann. Ziel ist es, stets die optimale Konzentration an Wasserstoffperoxid durch die GOX zu liefern, welche von der Peroxidase umgesetzt wird. Um das Verhältnis der Aktivitäten dieser beiden Enzyme zu optimieren wurden Vorversuche durchgeführt. Die Umsetzungsbedingungen wurden dabei den Optima der versatilen Peroxidase angepasst. Hierbei stellte sich für das Substrat DMP ein Verhältnis von 1:1 am effektivsten heraus. Die Aktivität der VP wurde dabei mittels DMP-Assay und die Aktivität der GOX indirekt mittels ABTS-Assay bestimmt. Das erfolgreich etablierte 2-Enzym-System konnte somit für Abbauuntersuchungen mit längerer Umsetzungsdauer eingesetzt werden.

Das aus dem Überstand von *Irpex consors* extrahierte Enzym wurde als *proof-of-concept* in gereinigter Form im 2-Enzym-System mit Glucoseoxidase zum Melaninabbau eingesetzt.

Dabei konnte über einen Zeitraum von sechs Stunden eine deutliche Bleichung erzielt werden. Die Aktivitätsverhältnisse der beiden Enzyme wurden leicht variiert. Hierbei stellte sich ein Verhältnis von 1:1 ebenfalls als am besten heraus. Wurde im Verhältnis weniger Glucoseoxidase zugegeben, verlief der Melaninabbau weniger effektiv. Bei einer höheren Glucoseoxidase-Aktivität im Verhältnis zur Peroxidase-Aktivität (Faktor 5) konnte bei 540 nm ein schnellerer Abbau innerhalb der ersten 60 min gemessen werden. Nach 60 min ließ die Abnahme stark nach. Dabei wirkt das produzierte Wasserstoffperoxid, welches sich durch einen geringeren Verbrauch durch die Peroxidase ansammelte, mit der Zeit inhibierend auf die Peroxidase. Das ideale Verhältnis ist die Produktion exakt der Menge an Wasserstoffperoxid, welche von der Peroxidase umgesetzt wird. Das ideale Verhältnis an Glucoseoxidase-Aktivität zu Peroxidase-Aktivität ist jedoch auch substratabhängig. Daher ist es ratsam, bei verschiedenen Substraten trotzdem mehrere Enzymverhältnisse zu testen. Auch zu berücksichtigen ist, dass im Laufe einer Umsetzung der Substratgehalt abnimmt. Dadurch sinken die Umsetzungsgeschwindigkeit und auch der Wasserstoffperoxidbedarf im Laufe einer Umsetzung.

Der postulierte Abbaumechanismus von Melanin ähnelt dem von Lignin. Wie im Peroxidase-Molekül selbst, findet nach Übertragung im Melanin-Molekül ebenfalls ein *long range electron transfer* (LRET) statt, welcher die schwächste Bindungsstelle des Moleküls angreift. So können oxidative Modifikationen an phenolischen Gruppen stattfinden, Etherbindungen gelöst werden oder Demethoxylierungen erfolgen (Schoemaker 1990, Martínez *et al.* 2005, Tavzes *et al.* 2009). Die entstehenden Abbauprodukte des Melanins sind bisher nicht hinreichend untersucht. Durch Untersuchungen mit isotope-markiertem Melanin, welches durch *Aspergillus fumigatus* umgesetzt wurde, konnten die markierten Bestandteile zu 80% im Pilzmycel und zu 10% im Medium nachgewiesen werden. Die im Pilzmycel nachgewiesenen Bestandteile waren hier zu 50% in Zellproteinen, Chitin, Lipiden und polaren Metaboliten zu finden. Zu 50% wurden sie in pilzeigenes Allomelanin umgewandelt (Luther & Lipke 1980). Dabei zeigte *Aspergillus fumigatus* eine Schwarzfärbung aufgrund des selbst produzierten Allomelanins. Bei der Melaninumsetzung mit *Irpex consors* wurde jedoch keine Schwarzfärbung des Pilzmycels beobachtet.

Die Identifizierung der entstehenden Abbauprodukte war kein Bestandteil dieser Arbeit, stellt jedoch ein interessantes Forschungsfeld dar.

#### 4.4 Nachweis der Expressionssteigerung der pVP durch den Induktor Melanin

Die Induktion der Expression des Zielenzym durch das Substrat Melanin sollte auf molekularbiologischer Ebene bewiesen werden. In Mycelien, welche die Peroxidase im Vergleich zu einer Negativkontrolle überexpressieren, finden mehr Kopiervorgänge des jeweiligen codierenden Genabschnittes statt. Dadurch werden mehr entsprechende mRNA-Stränge produziert. Durch Quantifizierung der mRNA des verantwortlichen codierenden Abschnittes lässt sich dann, bei quantitativ mehr mRNA-Kopien als bei der Vergleichsprobe, eine gesteigerte Expression nachweisen. Die RT-*q*PCR gilt als am besten geeignete Technologie, um quantitativ geringe Konzentrationen an mRNA zu erfassen (Heid *et al.* 1996, Pfaffl 2004) und als Gold-Standard zur Messung von Genexpressionen (Qin *et al.* 2006). Die Quantifizierung von mRNA-Templates erfolgte in diesem Fall über die Normierung auf Referenzgene. Referenzgene sind Gene, deren Expressionslevel in allen Zellen und allen Wachstumsstadien in gleichem Maße erfolgen, und demnach deren Konzentrationen an mRNA in den Zellen auch konstant vorliegt (Vandesompele *et al.* 2002, Andersen *et al.* 2004). Über eine Relativierung mehrerer Referenzgene können so schwer vermeidbare Ungenauigkeiten in der Vorbereitung, wie zum Beispiel das exakte Einstellen der RNA-Konzentration oder Messungenauigkeiten, ausgeglichen werden. In dieser Arbeit wurden für die Relativierung drei Referenzgene gewählt (Vandesompele *et al.* 2002, Dheda *et al.* 2005, Castanera *et al.* 2012). An dem Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* wurden bereits einige Gene als Referenzgene getestet (Castanera *et al.* 2012, Castanera *et al.* 2015).

Da das Genom von *Irpex consors* nicht aufgeklärt ist, konnten die jeweiligen Genabschnitte in ICO nicht direkt gewählt und über die bekannte Nukleotidsequenzen die jeweiligen Primer

abgeleitet werden. Stattdessen wurde der mit *Irpex consors* nahe verwandte Basidiomyceten *Cerrena unicolor* gewählt, dessen Genom vollständig aufgeklärt ist (Ko & Jung 1999, Hibi *et al.* 2012).

Die ausgewählten Referenzgene aus *Pleurotus ostreatus* wurden gegen das Genom von *Cerrena unicolor* geblastet und für die Referenzgene Actin1, CytC und Phos die entsprechenden Sequenzen in CUN erhalten. Anhand dieser Sequenzen wurden Sequenzierprimer erstellt. Diese wurden dann mit genomischer DNA von *Irpex consors* umgesetzt, wobei möglichst große Bereiche der Genabschnitte in ICO aufgeklärt werden sollten. Nach Polymerase-Kettenreaktion wurden die amplifizierten Produkte sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit denen von *Cerrena unicolor* abgeglichen. Die Alignments der Gene zeigten gute Übereinstimmung mit den jeweiligen Vorlagen aus CUN (Alignments Abbildung 3.33, Abbildung 3.34 und Abbildung 3.35).

An den so erhaltenen Nucleotidsequenzen aus *Irpex consors* konnten die für die RT-*q*PCR benötigten *Real-time*-Primer abgeleitet werden. Es wurden Targetlängen von ca. 100 - 200 Basenpaaren gewählt. Außerdem wurde ein G/C-Gehalt der Primer von 40 - 60% und Schmelztemperaturen mit einer maximalen Abweichung von 2 °C angestrebt. Aufgrund der Länge und Position der Introns konnten nicht bei allen *Real-time*-Primerpaaren beide Primer exonübergreifend gestaltet werden, jedoch mindestens ein Primer eines Primerpaares. Die *Real-time*-Primer wurden an cDNA getestet und die erhaltenen Produkte durch Sequenzierung bestätigt.

Die Mycelproben zum Nachweis der Expressionssteigerung der VP wurden zum Kulturzeitpunkt  $t = 24$  h der Hauptkultur gezogen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Peroxidaseaktivität in den mit Melanin supplementierten Medien ein Maximum von über 60 Units pro Liter, während die Aktivitäten der Negativkontrollen bei null lagen.

Die RNA wurde entsprechend isoliert und ein DNA-Verdau mit anschließender Phenol-/Chloroformfällung durchgeführt. Die Qualitätskontrolle auf 3%igem Agarosegel keigte keinen Zerfall der RNA. Die Messung mittels RT-*q*PCR zeigte deutlich, dass die Proben, welche mit Melanin supplementiert waren, einen wesentlich späteren *threshold cycle* besaßen als die Negativkontrollen (Differenz etwa 6 Zyklen). Dies ist auf Rückstände von Melanin zurückzuführen.

Melanin wirkt, wie andere Polymere (beispielsweise Huminsäure), als starker Inhibitor in Polymerase-Kettenreaktionen. Die UV-absorbierenden Eigenschaften von Melanin können zu Interferenzen während der photometrischen Quantifizierung mittels *Real-time*-PCR führen. Allerdings ist die Inhibierung der DNA-Polymerase durch reversible Bindung an Melanin viel entscheidender (Eckhart *et al.* 2000, Dörrie *et al.* 2006). Zwar wurde durch die durchgeführte Phenol-/Chloroformfällung Melanin weitestgehend abgetrennt, jedoch konnte keine vollständige Entfernung erfolgen. Eventuell kann durch eine zweite Fällung das Problem weiter minimiert werden. Aufgrund der hohen Konzentrationsverluste bei der Fällung wurde darauf aber verzichtet.

Die bei den Melaninproben erhaltenen, späteren *threshold cycles* im Vergleich zu den Negativkontrollen werden bei der Berechnung über die Referenzgene wieder herausgerechnet, da sowohl das Peroxidasetarget als auch die Referenztargets gleichermaßen versetzt in der PCR reagieren und nur die Differenzen untereinander berechnet werden.

Allgemein können RNA-Konzentrationen absolut oder relativ quantifiziert werden. Die Methode der absoluten Quantifizierung erfolgt über eine interne oder externe Kalibriergerade (Morrison *et al.* 1998, Pfaffl & Hageleit 2001). Die Methode der relativen Quantifizierung bietet durch Relativierung über Referenzgene hingegen höhere Genauigkeit. Bei den relativen Quantifizierungsmethoden werden zwei Varianten häufig verwendet: die Delta-Delta- $C_T$ -Methode (Livak & Schmittgen 2001) und die Effizienz-korrigierte  $C_T$ -Methode (Pfaffl 2001). In dieser Arbeit wurde, aufgrund der höheren Genauigkeit, die relative Berechnungsmethode mit Effizienz-Korrektur nach Pfaffl (2001) durchgeführt.

Die berechneten Expressions-Verhältnisse betragen 5,1 bezogen auf Actin1, 5,5 bezogen auf CytC und 1,9 bezogen auf Phos. Von einer gesteigerten Expression wird allgemein ab einem Verhältnis von 2 ausgegangen. Dies ist bei den Berechnungen über Actin1 und CytC der Fall. Die gesteigerte Expression wurde zum Zeitpunkt 24 h nachgewiesen, welches auch den Zeitpunkt der höchsten Aktivität darstellt. Über das Referenzgen Phos konnte ein Ratio von lediglich 1,9 berechnet werden, was knapp unter der postulierten Grenze von 2 liegt.

Theoretisch müssten die Verhältnisse bei allen Referenzgenen den gleichen Wert besitzen. Die Abweichung bei Phos steht nicht im Widerspruch zu den anderen Ergebnissen. Das Ergebnis hierbei ist lediglich nicht eindeutig. Bei Referenzgenen wird von einer sehr stabilen und gleichmäßigen Expressionrate in Zellen ausgegangen. Allerdings zeigen einige Studien auch Unregelmäßigkeiten bei der Expression oft verwendeter Referenzgene wie zum Beispiel Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) unter experimentellen Bedingungen (Zhang & Snyder 1992, Bhatia *et al.* 1994, Bereta & Bereta 1995, Chang *et al.* 1998). Es müsste genauer untersucht werden, ob sich Phos in diesem Fall als Referenzgen eignet. Bei Castanera *et al.* (2015) wurde Phos als zuverlässiges Referenzgen eingestuft. Ein eventueller Einfluss der Expressionsrate von Phos durch die angewandten Kulturbedingungen mit dem Substrat Melanin ist weiter zu untersuchen. Es wurde festgestellt, dass die Stabilität von Genexpressionen auch bei Referenzgenen, je nach Gen, Spezies, Zellmaterial und Kulturbedingungen abweichen kann (Jain *et al.* 2006, Jian *et al.* 2008). Die berechneten relativen Expression-Verhältnisse der anderen beiden Referenzgene liegen nah beieinander und sind als valide einzustufen, sodass von einer induzierenden Wirkung von Melanin als Substrat auf die Expression der versatilen Peroxidase ausgegangen wird.

## 4.5 Weitere Applikationen der versatilen Peroxidase

### 4.5.1 Bleichung von natürlichen Farbstoffen

Zur Erweiterung des Substratspektrums der versatilen Peroxidase von *Irpex consors* wurde der Abbau mehrerer natürlicher Farbstoffe untersucht. Hierbei wurden Bixin, Indigokarmin, Curcumin und  $\beta$ -Carotin durch die versatile Peroxidase erfolgreich umgesetzt. Die Bleichungswirkung war bei  $\beta$ -Carotin am deutlichsten. Die Bleichung von  $\beta$ -Carotin durch Peroxidasen aus Basidiomyceten ist bereits erfolgreich umgesetzt worden: Dabei wurden Dyp-Typ-Peroxidasen (Zelena *et al.* 2009, Szweda *et al.* 2013) und versatile Peroxidasen (Zorn *et al.* 2003a) identifiziert.

Mittels Spektrometer kann die bei der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin sichtbare Bleichung der charakteristischen Gelbfärbung über die Abnahme des b-Wertes verfolgt werden. Gestartet wurde die Reaktion bei einem b-Wert von ca. 100. Die eingesetzte Peroxidaseaktivität wurde zu  $5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$  total (bestimmt mittels DMP-Assay) eingestellt. Bereits nach einer Stunde wurde der b-Wert mittels 2-Enzym-System über 50% reduziert. Bei Inokulierung mit VP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde der Anfangswert um ca. 45% reduziert. Die Kontrolle mit Wasserstoffperoxid konnte den b-Wert nach drei Stunden Umsetzungsdauer nur um etwa 10% senken. Bei den Durchführungen im VP/GOX-System bzw. mit VP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden nach drei Stunden in beiden Fällen Bleichungen um etwa 60% erreicht. Bei der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem 1-Enzym-System und dem 2-Enzym-System gemessen, im Gegensatz zu dem durchgeführten Abbau von Melanin, bei welchem eine deutlich effektivere Umsetzung durch das 2-Enzym-System erreicht werden konnte. Die effizientere Umsetzung durch das 2-Enzym-System könnte somit auch von der Art des Substrates abhängig sein. Wahrscheinlich entspricht auch das gewählte Aktivitätsverhältnis der beiden Enzyme bei diesem Substrat nicht dem Optimum. Bei der Abbaukurve des 2-Enzym-Systems flachte die Kurve nach ca. 50 min ab, was eine Über- oder Unterproduktion des *in-situ* produzierten Wasserstoffperoxids andeutet.

In Applikationsversuchen einer Dyp-Typ-Peroxidase an einer realen Molkeprobe stellte sich die benötigte Wasserstoffperoxidkonzentration als höher heraus, als in Modellversuchen ermittelt (Szweda *et al.* 2013). Mögliche Ursachen sind hierbei ein Weiterreagieren des Wasserstoffperoxids mit anderen Bestandteilen oder ein höheres Substratvorkommen neben dem eigentlichen Zielsubstrat  $\beta$ -Carotin. Eingestellt wurden die Verhältnisse der beiden Enzyme in einem Modellsystem mit DMP. Da jedoch der Bedarf an Wasserstoffperoxid auch abhängig von der Art des Substrates ist, wäre eine erneute Einstellung der Faktoren direkt in einem  $\beta$ -Carotinsystem die exakteste Annäherung an das optimale Enzymverhältnis.

#### 4.5.2 Identifizierung der $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte

Aromaaktive Substanzen aus Basidiomyceten sind inzwischen bekannt und gut untersucht, wie zum Beispiel Sekundärmetaboliten aus dem Weißfäulepilz *Pleurotus sapidus* (Onken & Berger 1999, Kaspera *et al.* 2005, Fraatz *et al.* 2009, Krings *et al.* 2009). Industriell existiert großes Interesse an  $\beta$ -Carotin-Abbauprodukten (Winterhalter & Rouseff 2001), da  $\beta$ -Carotin unter anderem zu flüchtigen, teilweise aromarelevanten Abbauprodukten umgesetzt werden kann. Durch die Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit einer versatilen Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* konnten flüchtige Abbauprodukte wie  $\beta$ -Ionon,  $\beta$ -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcylohexan und Dihydroactinidiolid sowie nicht-flüchtige Produkte, z.B.  $\beta$ -Apo-10'-carotenal identifiziert werden (Zorn *et al.* 2003b). Auch in weiteren Studien konnten diese Abbauprodukte nachgewiesen werden (Zorn *et al.* 2003a, Zelena *et al.* 2009), wobei  $\beta$ -Ionon in allen Untersuchungen das Hauptprodukt darstellte. Der Aromastoff  $\beta$ -Ionon wurde erstmals in der bulgarischen Rose isoliert und besitzt einen sehr geringen Geruchsschwellenwert von 0,007 ppb (Werkhoff *et al.* 1991). Das Abbauprodukt Dihydroactinidiolid besitzt einen angenehmen, an Heu und schwarzen Tee erinnernden Geruchseindruck. Um eine Bildung möglicher flüchtiger Aromastoffe durch die isolierte versatile Peroxidase aus *Irpex consors* zu untersuchen, wurde  $\beta$ -Carotin umgesetzt und die dabei entstehenden flüchtigen Produkte mittels HS-SPME-GC-MS und SBSE-TDU-CIS-GS-MS analysiert.

Bei beiden Methoden handelt es sich um nicht-erschöpfende Analysemethoden (Wells 2003). Die beiden hierbei angewandten Methoden unterscheiden sich unter anderem durch die Extraktionsmethode. Bei der *head-space solid phase microextraction* werden volatile Substanzen im Kopfraum des Probengefäßes erfasst, mittels *stir bar sorptive extraction* wird direkt in der Inkubationsflüssigkeit extrahiert.

In beiden Fällen konnten durch Datenbankabgleich und über die jeweiligen Kováts-Indices vier Produkte identifiziert werden:  $\beta$ -Ionon,  $\beta$ -Cyclocitral, 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon und Dihydroactinidiolid (Abbildung 4.4).



Abbildung 4.4 Identifizierte Abbauprodukte: a) 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon, b)  $\beta$ -Cyclocitral, c)  $\beta$ -Ionon, d) Dihydroactinidiolid

Zusätzlich zu den Umsetzungen mit versatiler Peroxidase wurden Negativkontrollen mitgeführt, welche ohne VP, sondern mit Wasserstoffperoxid, unter sonst gleichen Parametern, inkubiert wurden. Dabei wurde  $\beta$ -Carotin ebenfalls zu den identischen Produkten abgebaut, allerdings in wesentlich geringerem Maße.

Dieselben Substanzen wie die hier identifizierten Abbauprodukte wurden auch durch Zelena *et al.* (2009) bei der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin durch die Dyp-Typ-Peroxidasen MsP1 und MsP2 beschrieben.

Der Abbau von  $\beta$ -Carotin zu  $\beta$ -Ionon erfolgt über eine Radikalreaktion. Die C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub>-Doppelbindung in (Z)-/(E)-Konformation stellt dabei den thermodynamisch schwächsten Punkt dar (Mohamed 2001). Über eine Hydroperoxid-Zwischenstufe und anschließender Hock-Umlagerung kommt es zur Abspaltung von  $\beta$ -Ionon (Krauch & Nonnenmacher 1997) (Abbildung 4.5).

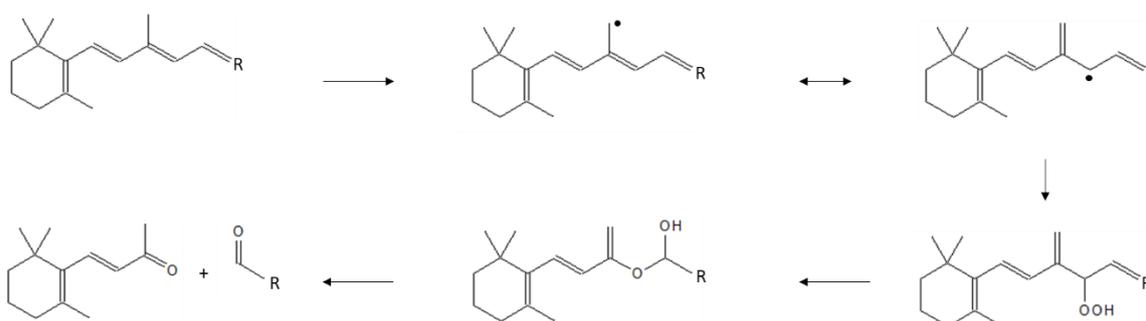


Abbildung 4.5 Spaltung von  $\beta$ -Carotin durch Radikalreaktion zu  $\beta$ -Ionon

Durch Epoxidierung von  $\beta$ -Ionon wird 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon gebildet. Dihydroactinodiolid entsteht als Sekundärmetabolit. Auch das nicht-volatile, in anderen Arbeiten publizierte Abbauprodukt  $\beta$ -Carotin-5,8-epoxid kann als mögliche Vorstufe für Dihydroactinodiolid fungieren (Bossler *et al.* 1995).

Die nicht-volatilen Abbauprodukte durch die Umsetzung mit ICO VP wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Generell konnten bei publizierten Umsetzungen von  $\beta$ -Carotin durch Peroxidasen aus Basidiomyceten nur sehr geringe Gehalte an nicht-flüchtigen Substanzen im Vergleich zu den Konzentrationen an flüchtigen Abbauprodukten detektiert werden. Die Abbauprodukte der nicht-flüchtigen Gruppe konnten dabei unter anderem als  $\beta$ -Apo-14'-carotenal,  $\beta$ -Apo-12'-carotenal,  $\beta$ -Apo-10'-carotenal,  $\beta$ -Carotin-monoepoxid sowie  $\beta$ -Carotin-5,6-epoxid identifiziert werden (Zorn *et al.* 2003b, Zelena *et al.* 2009). Eine weitere Auffälligkeit bei den bisherigen Untersuchungen des  $\beta$ -Carotin-Abbaus und der Quantifizierung der Abbauprodukte ist die auftretende Bilanzlücke, bei der nur ein gewisser Teil der eingesetzten Substratmenge als Abbauprodukte wiedergefunden werden konnte (Zorn *et al.* 2003a). Die fehlenden Informationen zum Erreichen der eingesetzten Eduktmenge konnten bisher nicht aufgeklärt werden. Bei den durchgeführten Untersuchungen zum  $\beta$ -Carotin-Abbau durch ICO VP sollten ebenfalls Ansätze zur Quantifizierung der volatilen Bestandteile erarbeitet werden. Hierbei erfolgte eine nähere Betrachtung der Produkte  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral.

### 4.5.3 Quantifizierungsansätze der $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte $\beta$ -Ionon und $\beta$ -Cyclocitral

Die Kalibriergeraden, welche zur Berechnung der Responsefaktoren  $R_f$  erstellt wurde, zeigen in allen Durchführungen mit Bestimmtheitsmaßen von  $>0,99$  eine hohe Präzision. Die Responsefaktoren der SMPE-Extraktion lagen mit Werten von 0,66 für  $\beta$ -Cyclocitral und 1,28 für  $\beta$ -Ionon näher am idealen Wert von 1 als die mittels SBSE erhaltenen Responsefaktoren. Da die Kalibriergeraden als sehr präzise verifiziert werden konnten, wurde die Reproduzierbarkeit der jeweiligen Extraktionsmethoden jedoch als solide eingestuft und eine Quantifizierung durchgeführt.

Es konnten Gesamtkonzentrationen an  $\beta$ -Ionon und  $\beta$ -Cyclocitral mittels HS-SMPE-GC-MS von ca.  $800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  und mittels SBSE-TDU-CIS-GS-MS von ca.  $485 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  bei einer Startkonzentration von  $19,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  bestimmt werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass nur zwei der vier detektierten volatilen Abbauprodukte quantifiziert wurden. Ebenfalls wurden nicht-flüchtige Abbauprodukte nicht untersucht und können somit auch nicht in die Gesamtbilanz miteinbezogen werden, wenngleich ihr Anteil an der Gesamtheit der Abbauprodukte vermutlich eher gering ist.

Die Quantifizierungsergebnisse der beiden Analysemethoden HS-SMPE-GC-MS und SBSE-TDU-CIS-GS-MS weichen deutlich voneinander ab. Die beiden Methoden in den hier durchgeführten Untersuchungen sind allerdings nicht zum direkten Vergleich untereinander geeignet. Beide Extraktionsverfahren sind stark von den verwendeten Parametern abhängig (Pawliszyn 2009, Nogueira 2015). Die Beschichtung des in der Flüssigkeit adsorbierenden Twisters besteht aus Polydimethylsiloxan (PDMS), die Faser zur *head-space*-Extraktion aus einem Divinylbenzol/Carboxen/Polydimethylsiloxan-Gemisch (DVB/CAR/PDMS). Die unterschiedlichen Beschichtungen weisen unterschiedliche Adsorptionseigenschaften gegenüber Analyten auf. Dies ist auch anhand der deutlichen Abweichungen der Responsefaktoren zu erkennen. Die niedrigen Responsefaktoren zu Thymol deuten in beiden Fällen auf eine nicht optimale Wahl des verwendeten internen Standards hin.

Um die Adsorptionsverhältnisse zwischen Analytsubstanzen und Standards möglichst vergleichbar zu halten, werden idealerweise Response-Faktoren mit einem Wert von 1 angestrebt. Hierbei können für weitere quantitative Untersuchungen mögliche Alternativen zum verwendeten Thymol getestet werden. Jedoch ist nicht nur die Art der Beschichtung unterschiedlich, auch die Parameter Inkubationsdauer, Extraktionsdauer und Extraktionstemperatur weichen voneinander ab. Dass die Extraktionsdauer einen großen Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen hat, wird zum Beispiel bei der  $\beta$ -Carotin-Bleichung durch eine Versatile Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* deutlich. Hierbei konnte bei einer Stunde Inkubationsdauer eine maximale Konzentration an  $\beta$ -Ionon gemessen werden. Danach nimmt diese jedoch wieder deutlich ab, sodass zu einem späterem Extraktionszeitpunkt eine geringere  $\beta$ -Ionon-Konzentration gemessen wurde (Zorn *et al.* 2003b). Verluste durch die Flüchtigkeit des Produkts oder durch weitere Abbaumechanismen sind hierbei mögliche Ursachen für diese Abnahme.

Zur optimalen Vergleichbarkeit müssten möglichst viele Parameter der beiden Analysemethoden gleich gehalten werden. Der Abbruch der Umsetzung durch die versatile Peroxidase durch Enzyminaktivierung mittels thermischer Inaktivierung ist aufgrund der hohen Flüchtigkeit der Analytsubstanzen nicht möglich. Eine weitere Möglichkeit zur Enzyminaktivierung stellt das Aussalzen mit Calciumchlorid dar. Hierbei wird gleichzeitig zur Enzyminaktivierung die Ionenstärke der zu extrahierenden Lösung erhöht. Dieses Aussalzen kann die Extrahierbarkeit mancher Substanzen, insbesondere Substanzen mit hohem  $K_{O/W}$ -Wert (Öl/Wasser-Koeffizient), deutlich erhöhen (Pérez *et al.* 2007, Quintana *et al.* 2007, Nogueira 2015). Durch nicht erfolgte Inhibierung des Enzyms wird Substrat während der Extraktion dementsprechend weiter umgesetzt und mehr Produkt entsteht. Die insgesamt kürzere Durchführungsdauer bei der HS-SMPE-GC-MS-Messung führte zu höheren gemessenen Produktkonzentrationen, während die längere Umsetzungsdauer bei der SBSE-TDU-CIS-GS-MS-Analyse zu deutlich niedrigeren Konzentrationen führte.

Wie bei Zorn *et al.* (2003b) gemessene Produktkonzentrationen mit einem Maxima, welche danach mit zunehmender Umsetzungsdauer wieder abnehmen, sind durchaus auch bei der hier untersuchten versatilen Peroxidase wahrscheinlich. Dies müsste jedoch mit identischen Konzentrationsmessungen in zeitlichen Abständen näher untersucht werden.

## 5 Ausblick

Die in dieser Arbeit untersuchte versatile Peroxidase aus *Irpex consors* bietet eine Vielzahl interessanter weiterer Untersuchungsfelder. Hier konnte der Abbau von Melanin untersucht werden, jedoch nicht, in welche Produkte Melanin abgebaut wird. Interessant ist dabei sowohl die *in-vivo* Umsetzung durch *Irpex consors* als auch die Bleichung durch die isolierte Peroxidase. Während in bereits publizierten Studien mit *Aspergillum fumigatus* mittels Isotopenmarkierung der Aufbau von pilzeigenem Allomelanin aus Melaninabbauprodukten nachgewiesen wurde (Luther & Lipke 1980), konnte bei der Melaninbleichung durch *Irpex consors* keine Färbung des Pilzmycels beobachtet werden. Das abgebaute Melanin konnte demnach auf anderem Wege verstoffwechselt werden.

Der Abbau des verwendeten Eumelanins konnte erfolgreich umgesetzt werden. Allerdings wurden andere Melanintypen nicht in die Untersuchungen mit einbezogen. Hier ist eine Ausweitung auf weitere Melaninarten wie zum Beispiel Allomelanin oder Phäomelanin interessant, um mögliche weitere Anwendungsgebiete zu erschließen.

Untersuchungen zur Kultivierung von *Irpex consors* mit höheren Konzentrationen an Ionen wie  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  oder  $Zn^{2+}$  können durchgeführt werden, da dabei die Peroxidaseaktivität positiv oder negativ beeinflusst werden kann. Auch weitere Kultivierungsparameter wie eine Minimierung der Kohlenstoff- oder Stickstoffquelle können variiert werden.

Durch die hohen Aktivitätsverluste während der Reinigung wäre eine heterologe Expression der versatilen Peroxidase interessant. So können größere Mengen an diesem Enzym für weitere Untersuchungen erhalten werden.

Der Einsatz des 2-Enzym-Systems kann auf weitere interessante Substrate ausgeweitet werden. Wichtig ist hierbei eine Überprüfung der eingestellten Enzym-Verhältnisse. Dies sollte auch für das Substrat  $\beta$ -Carotin optimiert werden.

Eine Erweiterung auf ein 3-Enzym-System ist ebenfalls denkbar, bei welchem die für die Glucoseoxidase benötigte Glucose *in-situ* mittels Lactase aus Lactose erzeugt wird. Dies ist zum Beispiel bei Bleichungen in Molkesystemen interessant.

Für die Quantifizierung der  $\beta$ -Carotin-Abbauprodukte wäre eine Optimierung der Extraktions- und Analyseparameter sinnvoll. Auch sollten andere interne Standards in Betracht gezogen werden, welche den Adsorptionsverhältnissen der zu untersuchenden Produkte besser entsprechen. Die Bilanzlücke der eingesetzten  $\beta$ -Carotin-Menge zu den erhaltenen Produktmengen kann weiter untersucht werden. Hierbei sollte auch eine Analyse der nicht-flüchtigen Abbauprodukte mit einbezogen werden.

Die praktische Anwendung der identifizierten Peroxidase kann zum Beispiel in Fruchtsäften und Fruchtpurees umgesetzt werden. Dabei bietet sich ebenfalls eine Verwendung des 2-Enzym-Systems an, welches jedoch auch hier auf die Matrix angepasst werden sollte. Bei positivem Farberhalt der Fruchtzubereitungen sind natürlich auch weitere Aspekte wie Erhalt der Textur, des Geschmacks sowie toxikologisch relevante Fragestellungen zu klären.



---

## 6 Literatur

- Ainsworth GC & Kirk PM** 2008: Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi. 10. Aufl., CABI, Wallingford.
- Andersen C, Jensen J & Orntoft T** 2004: Normalization of *real-time* quantitative reverse transcription-PCR Data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64: 5245–5250.
- Arnao MB, Acosta M, del Río JA, Varón R & García-Cánovas F** 1990: A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta* 1041: 43–47.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J & Schwede T** 2006: The SWISS-MODEL workspace. A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* (Oxford, England) 22: 195–201.
- Baynton KJ, Bewtra JK, Biswas N & Taylor KE** 1994: Inactivation of horseradish peroxidase by phenol and hydrogen peroxide. A kinetic investigation. *Biochimica et biophysica acta* 1206: 272–278.
- Bell A & Wheeler M** 1986: Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual review of phytopathology* 24: 411–451.
- Bereta J & Bereta M** 1995: Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenous nitric oxide in cytokine-activated endothelium. *Biochemical and biophysical research communications* 217: 363–369.
- Berger RG, Drawert F & Kollmannsberger H** 1989: The flavour of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 188: 122–126.

- Bhatia P, Taylor W, Greenberg A & Wright J** 1994: Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Analytical biochemistry* 216: 223–226.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Gallo Cassarino T, Bertoni M, Bordoli L & Schwede T** 2014: SWISS-MODEL. Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research* 42: W252-8.
- Blodig W, Doyle WA, Smith AT, Winterhalter K, Choinowski T & Piontek K** 1998: Autocatalytic formation of a hydroxy group at C beta of trp171 in lignin peroxidase. *Biochemistry* 37: 8832–8838.
- Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J & Schwede T** 2009: Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature protocols* 4: 1–13.
- Bosser A, Papolerey E & Belin J-M** 1995: A Simple Way to (+)-dihydroactinidiolide from  $\beta$ -ionone related to the enzymic co-oxidation of  $\beta$ -carotene in aqueous solution. *Biotechnology progress* 11: 689–692.
- Bradford 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.
- Butler MJ & Day AW** 1998: Fungal melanins: a review. *Canadian journal of microbiology* 44: 1115–1136.
- Butler MJ, Gardiner RB & Day AW** 2005: Degradation of melanin or inhibition of its synthesis. Are these a significant approach as a biological control of phytopathogenic fungi? *Biological control* 32: 326–336.

- Camarero S, Sarkar S, Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ & Martinez AT** 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: 10324–10330.
- Castanera R, López-Varas L, Pisabarro AG & Ramírez L** 2015: Validation of reference genes for transcriptional analyses in *Pleurotus ostreatus* by using reverse transcription-quantitative PCR. *Applied and environmental microbiology* 81: 4120–4129.
- Castanera R, Pérez G, Omarini A, Alfaro M, Pisabarro AG, Faraco V, Amore A & Ramírez L** 2012: Transcriptional and enzymatic profiling of *Pleurotus ostreatus* laccase genes in submerged and solid-state fermentation cultures. *Applied and environmental microbiology* 78: 4037–4045.
- Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW & Tsay HJ** 1998: Up-regulation of *beta*-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncology reports* 5: 469–471.
- Chen J, Wei C & Marshall** 1991: Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *American chemical society* 11: 1897–1907.
- Chen M, Yao S, Zhang H & Liang X** 2010: Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chinese journal of chemical engineering* 18: 824–829.
- Choinowski T, Blodig W, Winterhalter K & Piontek K** 1999: The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C  $\beta$  of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of molecular biology* 286: 809–827.
- Chung TY, Eiserich JP & Shibamoto T** 1993: Volatile compounds isolated from edible korean Chamchwi (*Aster Scaber Thunb*). *Journal of agricultural and food chemistry* 41:1693–1697.

- Dadachova E & Casadevall A** 2008: Ionizing radiation. How fungi cope, adapt, and exploit with the help of melanin. *Current opinion in microbiology* 11: 525–531.
- Dao L & Friedman M** 1992: Chlorogenic acid content of fresh and processed potatoes determined by ultraviolet spectrophotometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 40: 2152–2156.
- De La Rubia, Teresa de, Linares A, Pérez J, Muñoz-Dorado J, Romera J & Martínez J** 2002: Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavidio-alba*. *Research in microbiology* 153: 547–554.
- Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, Rook GAW & Zumla A** 2005: The implications of using an inappropriate reference gene for *real-time* reverse transcription PCR data normalization. *Analytical biochemistry* 344: 141–143.
- Dörrie J, Wellner V, Kämpgen E, Schuler G & Schaft N** 2006: An improved method for RNA isolation and removal of melanin contamination from melanoma tissue. Implications for tumor antigen detection and amplification. *Journal of immunological methods* 313: 119–128.
- Eckhart L, Bach J, Ban J & Tschachler E** 2000: Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochemical and biophysical research communications* 271: 726–730.
- Edman P** 1949: A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Archives of biochemistry* 22: 475.
- Eggert C, Temp U & Eriksson K** 1996: The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Applied and environmental microbiology* 4: 1151–1158.
- Eisenman HC & Casadevall A** 2012: Synthesis and assembly of fungal melanin. *Applied microbiology and biotechnology* 93: 931–940.

**Eleftherianos I & Revenis C** 2011: Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *Journal of innate immunity* 3: 28–33.

**Eriksson K-EL, Blanchette RA, Ander P & Timell TE** 1990: Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

**Erjavec J, Kos J, Ravnikar M, Dreo T & Sabotič J** 2012: Proteins of higher fungi-from forest to application. *Trends in biotechnology* 30: 259–273.

**Felix C, Hyde J, Sarna T & Sealy R** 1978: Interactions of melanin with metal ions. Electron spin resonance evidence for chelate complexes of metalloins with free radicals. *American chemical society* 12: 3922–3926.

**Fischer KH & Grosch W** 1987: Volatile compounds of importance in the aroma of mushrooms (*Psalliota biospora*). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 20: 233–236.

**Fraatz MA, Riemer SJ, Stöber R, Kaspera R, Nimtze M, Berger RG & Zorn H** 2009: A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *Journal of molecular catalysis* 61: 202–207.

**Frankos V, Schmitt D, Haws L, McEvily A, Iyengar R, Miller S, Munro I, Clydesdale F, Forbes A & Sauer R** 1991: Generally recognized as safe (GRAS) evaluation of 4-hexylresorcinol for use as a processing aid for prevention of melanosis in shrimp. *Regulatory toxicology and pharmacology* 14: 202–212.

**Friedman M & Molnar-Perl I** 1990: Inhibition of browning by sulfur amino acids. 1. Heated amino acid-glucose systems. *Journal of agricultural and food chemistry* 38: 1642–1647.

**Gessard C** 1903: Sur la formation du pigment mélanique dans les tumeurs du cheval. *Comptes rendus de l'académie des sciences* 136: 1086–1088.

- Gold M & Alic M** 1993: Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Microbiological reviews 57: 605–622.
- Gómez-Toribio V, Martínez AT, Martínez MJ & Guillén F** 2001: Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. European journal of biochemistry 268: 4787–4793.
- Gonzalez-Perez D, Garcia-Ruiz E, Ruiz-Dueñas FJ, Martinez AT & Alcalde M** 2014: Structural determinants of oxidative stabilization in an evolved versatile peroxidase. ACS catalysis 4: 3891–3901.
- Goodman G & Bercovich D** 2008: Melanin directly converts light for vertebrate metabolic use. Heuristic thoughts on birds, Icarus and dark human skin. Medical hypotheses 71: 190–202.
- Heid C, Stevens J, Livak K & Williams P** 1996: *Real-time* quantitative PCR. Genome research 6: 986–994.
- Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, Bergbauer M & Szewzyk U** 1998: Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. Applied and environmental microbiology 64: 2788–2793.
- Hibi M, Hatahira S, Nakatani M, Yokozeki K, Shimizu S & Ogawa J** 2012: Extracellular oxidases of *Cerrena* sp. complementarily functioning in artificial dye decolorization including laccase, manganese peroxidase, and novel versatile peroxidases. Biocatalysis and agricultural biotechnology 1: 220–225.
- Hider RC & Lerch K** 1989: The inhibition of tyrosinase by pyridinones. Biochemistry Journal 257: 289–290.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R** 1993: Kinetic PCR analysis: *Real-time* monitoring of DNA amplification reaction. Biotechnology 11: 1026–1030.

- Hill H** 1992: The function of melanin or six blind people examine an elephant. *Bioessays* 14: 49–56.
- Hoegger P, Majcherczyk A, Dwivedi R, Svobodová K & Kilaru, S., Kües, U** 2007: Wood production, wood technology, and biotechnological impacts. *Enzymes in wood degradation*. Göttingen University Press, Göttingen.
- Hosseini MS, Araabi BN & Soltanian-Zadeh H** 2010: Pigment melanin. Pattern for iris recognition. *IEEE transactions on instrumentation and measurement* 59: 792–804.
- Hurrell RF & Finot PA** 1984: Nutritional consequences of the reactions between proteins and oxidized polyphenolic acids. *Advances in experimental medicine and biology* 177: 423–435.
- Imami A, Riemer S, Schulze M, Amelung F, Gorshkov V, Rühl M, Ammenn J & Zorn H** 2015: Depolymerization of lignosulfonates by submerged cultures of the basidiomycete *Irpex consors* and cloning of a putative versatile peroxidase. *Enzyme and microbial technology* 81: 8–15.
- Ito S, Fujita K, Yoshioka M, Sienko D & Nagatsu T** 1986: Identification of 5-S- and 2-S-cysteinyldopamine and 5-S-glutathionyldopamine formed from dopamine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 375: 134–140.
- Iyengar R, Bohmont C & McEvily A** 1991: 4-Hexylresorcinol and prevention of shrimp blackspot: Residual analyses. *Journal of food composition and analysis* 4: 148–157.
- Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK & Khurana JP** 2006: Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative *real-time* PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 345: 646–651.
- Jian B, Liu B, Bi Y, Hou W, Wu C & Han T** 2008: Validation of internal control for gene expression study in soybean by quantitative *real-time* PCR. *BMC molecular biology* 9: 59.

- Johansson T & Nyman PO** 1996: A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene* 170: 31–38.
- Kahn V** 1995: Effect of kojic acid on the oxidation of DL-DOPA, norepinephrine, and dopamine by mushroom tyrosinase. *Pigment cell research* 8: 234–240.
- Kaneko S, Cheng M, Murai H, Takenaka S, Murakami S & Aoki K** 2009: Purification and characterization of an extracellular laccase from *Phlebia radiata* strain BP-11-2 that decolorizes fungal melanin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 73: 939–942.
- Kaspera R, Krings U, Pescheck M, Sell D, Schrader J & Berger RG** 2005: Regio- and stereoselective fungal oxyfunctionalisation of limonenes. *Zeitschrift für Naturforschung* 60: 459-466.
- Khammuang S & Sarnthima R** 2013: Decolorization of synthetic melanins by crude laccases of *Lentinus polychrous* Lév. *Folia microbiologica* 58: 1–7.
- Kishi K, Kusters-van Someren M, Mayfield MB, Sun J, Loehr TM & Gold MH** 1996: Characterization of manganese(II) binding site mutants of manganese peroxidase. *Biochemistry* 35: 8986–8994.
- Ko K & Jung H** 1999: Phylogenetic re-evaluation of *Trametes consors* based on mitochondrial small subunit ribosomal DNA sequences. *FEMS microbiology letters* 170: 181–186.
- Kollias N & Baqer A** 1985: Spectroscopic characteristics of human melanin *in-vivo*. *Journal of investigative dermatology* 85: 38–42.
- Konananayakam M & Sastry S** 1988: Kinetics of shrinkage of mushrooms during blanching. *Journal of food science* 53: 1406–1411.
- Körner AM & Pawelek J** 1980: Dopachrome conversion. A possible control point in melanin biosynthesis. *Journal of investigative dermatology* 75: 192–195.

- Kováts E** 1958: Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica chimica acta* 206: 1915–1932.
- Krauch H & Nonnenmacher E** 1997: Reaktionen der organischen Chemie. Ein Beitrag zur Terminologie der organischen Chemie. 6. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.
- Krings U, Lehnert N, Fraatz MA, Hardebusch B, Zorn H & Berger RG** 2009: Autoxidation versus biotransformation of alpha-pinene to flavors with *Pleurotus sapidus*. Regioselective hydroperoxidation of alpha-pinene and stereoselective dehydrogenation of verbenol. *Journal of agricultural and food chemistry* 57: 9944–9950.
- Laemmli U** 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T & Lee KG** 2005: Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum L.*) and thyme leaves (*Thymus vulgaris L.*) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91: 131–137.
- Lerner A & Fitzpatrick T** 1950: Biochemistry of melanin formation. *Physiological reviews* 30: 91–126.
- Lis H & Sharon N** 1993: Protein glycosylation. *European journal of biochemistry* 218: 1–27.
- Liu Y, Lee S & Liao Y** 1995: Isolation of a melanolytic fungus and its hydrolytic activity on melanin. *Mycologia* 5: 651–654.
- Livak KJ & Schmittgen TD** 2001: Analysis of relative gene expression data using *real-time* quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402–408.
- Luther J & Lipke H** 1980: Degradation of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology* 40: 145–155.

**Martínez A** 2002: Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and microbial technology* 30: 425–444.

**Martínez MJ, Ruiz-Duenas FJ, Guillen F & Martínez AT** 1996: Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European journal of biochemistry* 237: 424–432.

**Martínez A** 2007: High redox potential peroxidases. In: *Industrial enzymes: Structure, function and applications* 477–488.

**Martínez A, Speranza M, Ruiz-Duenas F, Ferreira P, Camareso S, Guillén F, Martínez M, Gutiérrez A & del Río J** 2005: Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology* 8: 195–204.

**Mason H** 1948: The chemistry of melanin III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *Journal of biological chemistry* 172: 83–99.

**Mason H, Fowlks W & Peterson E** 1955: Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *Journal of the americal chemical society* 107: 4015–4027.

**McDonell MW, Simon MN & Studier FW** 1977: Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of molecular biology* 110: 119–146.

**McEvily AJ, Iyengar R & Otwell WS** 1992: Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical reviews in food science and nutrition* 32: 253–273.

**Mester T & Field J** 1998: Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* Species strain BOS55 in the absence of manganese. *Journal of biological chemistry* 273: 15412–15417.

**Meyer zum Gottesberge A** 1988: Physiology and pathophysiology of inner ear melanin. *Pigment cell research* 1: 238–249.

- Morrison TB, Weis JJ & Wittwer CT** 1998: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-958.
- Müller E & Loeffler W** 1992: *Mykologie. Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Nagasaki K, Kumazawa M, Murakami S, Takenaka S, Koike K & Aoki K** 2008: Purification, characterization, and gene cloning of *Ceriporiopsis* sp. strain MD-1 peroxidases that decolorize human hair melanin. *Applied and environmental microbiology* 74: 5106–5112.
- Neumüller O-A** 1972: *Römpps Chemie-Lexikon.* 7. Aufl., Franckh, Stuttgart.
- Nicolaus R** 1986: *Melanins. Chemistry of natural products.* Hermann, Paris.
- Nicolaus RA & Piattelli M** 1962: Structure of melanins and melanogenesis. *Journal of polymer science* 58: 1133–1139.
- Nie G, Reading NS & Aust SD** 1999: Relative stability of recombinant versus native peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of biochemistry and biophysics* 365: 328–334.
- Nogueira JMF** 2015: Stir-bar sorptive extraction. 15 years making sample preparation more environment-friendly. *TrAC trends in analytical chemistry* 71: 214–223.
- Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, Anver MR, Bahn J, Wielgus A, Cadet J, Douki T, Mouret S, Tucker MA, Popratiloff A, Merlino G & Fabo EC** 2012: Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nature communications* 3: 884-894.
- Onken J & Berger R** 1999: Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of biotechnology* 69: 163–168.

- Parrish F, Wiley B, Simmons E & Long L** 1966: Production of aflatoxines and kojic acid by species of *Aspergillus* und *Penicillium*. *Applied microbiology* 14: 139.
- Pawliszyn J** 2009: Handbook of solid phase microextraction. Theory of solid phase microextraction. Chemical industry press, Beijing.
- Pérez RA, Navarro T & Lorenzo Cd** 2007: HS-SPME analysis of the volatile compounds from spices as a source of flavour in "Campo Real" table olive preparations. *Flavour and fragrance journal* 22: 265–273.
- Pérez-Boada M, Ruiz-Dueñas FJ, Pogni R, Basosi R, Choinowski T, Martínez MJ, Piontek K & Martínez AT** 2005: Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds. Site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of molecular biology* 354: 385–402.
- Pfaffl MW** 2001: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29: e45.
- Pfaffl MW** 2004: Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospectrum* 10: 92–95.
- Pfaffl MW & Hageleit M** 2001: Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology letters* 23: 275–282.
- Pollegioni L, Tonin F & Rosini E** 2015: Lignin-degrading enzymes. *The FEBS journal* 282: 1190–1213.
- Priestap HA, van Baren CM, Di Leo Lira P, Coussio J & Bandoni AL** 2003: Volatile constituents of *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry* 63: 221–225.
- Prota G** 1980: Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *Journal of investigative dermatology* 75: 122–127.

**Prota G** 1988: Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. Medical research reviews 8: 525–556.

**Prota G** 1992: Melanins and melanogenesis. Academic press Inc, San Diego.

**Prota G & Nicolaus R** 1967: Advances in biology of skin. On the biogenesis of Pheomelanins. The Pigmentary System. Pergamon press, Oxford.

**Prota G & Thomson RH** 1976: Melanin pigmentation in mammals. Endeavour 35: 32–38.

**Qin L-X, Beyer RP, Hudson FN, Linford NJ, Morris DE & Kerr KF** 2006: Evaluation of methods for oligonucleotide array data via quantitative *real-time* PCR. BMC bioinformatics 23: 1-12.

**Qin X, Zhang J, Zhang X & Yang Y** 2014: Induction, purification and characterization of a novel manganese peroxidase from *Irpex lacteus* CD2 and its application in the decolorization of different types of dye. PLoS one 11: 1-13.

**Quintana JB, Rodil R, Muniategui-Lorenzo S, López-Mahía P & Prada-Rodríguez D** 2007: Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas chromatography-mass spectrometry. Journal of chromatography 1174: 27–39.

**Raper H** 1928: The aerobic oxidases. Physiology 8: 245–282.

**Rättö M, Chatani M, Ritschkoff A-C & Viikari L** 2001: Screening of micro-organisms for decolorization of melanins produced by bluestain fungi. Applied microbiology and biotechnology 55: 210–213.

**Rehm H** 2002: Der Experimentator. Proteinbiochemie, Proteomics. 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

**Ruiz-Duenas FJ, Guillen F, Camarero S, Pérez-Boada M, Martinez MJ & Martinez AT**

1999a: Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied and environmental microbiology* 65: 4458–4464.

**Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ & Martinez AT** 1999b: Molecular characterization of a novel

peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular microbiology* 31: 223–235.

**Ruiz-Dueñas FJ, Morales M, Mate MJ, Romero A, Martínez MJ, Smith AT & Martínez AT**

2008: Site-directed mutagenesis of the catalytic tryptophan environment in *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase. *Biochemistry* 47: 1685–1695.

**Sáez-Jiménez V, Acebes S, Guallar V, Martínez AT & Ruiz-Dueñas FJ** 2015: Improving the oxidative stability of a high redox potential fungal peroxidase by rational design. *PLoS one* 10: e0124750.

**Sapers G** 1993: Browning of foods: Control by sulfites. Antioxidants and other means. *Food technology* 10: 75–84.

**Sato T, Hara S, Matsui T, Sasaki G, Saijo S, Ganbe T, Tanaka N, Sugano Y & Shoda M**

2004: A unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. Heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 60: 149–152.

**Schieberle P & Grosch W** 1987: Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 185: 111–113.

**Schmaler-Ripcke J, Sugareva V, Gebhardt P, Winkler R, Kniemeyer O, Heinekamp T &**

**Brakhage AA** 2009: Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology* 75: 493–503.

- Schnermann P & Schieberle P** 1997: Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa mass by aroma extract dilution analyses. *Journal of agricultural and food chemistry* 45: 867–872.
- Schoemaker H** 1990: On the chemistry of lignin biodegradation. *Recueil des travaux chimiques des pays-bas* 109: 255–272.
- 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* 103: 79–84.
- Schwarze FW, Engels J & Mattheck C** 2000: Fungal strategies of wood decay in trees. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Simon JD & Peles DN** 2010: The red and the black. *Accounts of chemical research* 43: 1452–1460.
- Solano F** 2014: Melanins. Skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New journal of science* 2014: 1–28.
- Southern E** 1979: Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* 100: 319–323.
- Sugano Y, Nakano R, Sasaki K & Shoda M** 2000: Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum*. *Applied and environmental microbiology* 66: 1754–1758.
- Sugumaran M** 1991: Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis. *FEBS letters* 295: 233–239.
- Sugumaran M** 2002: Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment cell research* 15: 2–9.

**Sundaramoorthy M, Kishi K, Gold MH & Poulos TL** 1997: Crystal structures of substrate binding site mutants of manganese peroxidase. *Journal of biological chemistry* 272: 17574–17580.

**Szweda RT, Schmidt K & Zorn H** 2013: Bleaching of colored whey and milk by a multiple-enzyme system. *European food and research technology* 237: 377–384.

**Taboada-Puig R, Junghanns C, Demarche P, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM & Agathos SN** 2011a: Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase. Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. *Bioresource technology* 102: 6593–6599.

**Taboada-Puig R, Lú-Chau T, Moreira MT, Feijoo G, Martínez MJ & Lema JM** 2011b: A new strain of *Bjerkandera* sp. production, purification and characterization of versatile peroxidase. *World journal of microbiology and biotechnology* 27: 115–122.

**Tanaka T, Takeuchi M & Ichishima E** 2014: Inhibition study of tyrosinase from *Aspergillus oryzae*. *Agricultural and biological chemistry* 53: 557–558.

**Tavzes Č, Šilc F, Kladnik A, Fackler K, Messner K, Pohleven F & Koestler RJ** 2009: Enzymatic degradation of mould stains on paper analysed by colorimetry and DRIFT-IR spectroscopy. *International biodeterioration & biodegradation* 63: 873–879.

**Theorell H & Maehly A** 1950: Untersuchungen an künstlichen Peroxydasen. *Acta chemica scandinavica* 422–434.

**Tsukihara T, Honda Y, Sakai R, Watanabe T & Watanabe T** 2008: Mechanism for oxidation of high-molecular-weight substrates by a fungal versatile peroxidase, MnP2. *Applied and environmental microbiology* 74: 2873–2881.

**Ullrich F & Grosch W** 1987: Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 184: 277–282.

**Valero E, Varon R & Garcia-Carmona F** 1992: Kinetic study of the effect of metabisulfite on polyphenol oxidase. *Journal of agricultural and food chemistry* 40: 904–908.

**Valim MF, Rouseff RL & Lin J** 2003: Gas chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. *Journal of agricultural and food chemistry* 51: 1010–1015.

**Vámos-Vigyázó L** 1995: Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables. In: Lee CY & Whitaker JR (Hrsg) *Enzymatic Browning and Its Prevention*. American chemical society, Washington, DC 49-62.

**Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F, Poppe B, van Roy N, Paepe A de & Speleman F** 2002: Accurate normalization of *real-time* quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3: 1-12.

**Wainwright M** 1992: *An introduction to fungal biotechnology*. Wiley, Chichester.

**Wang Z, Dillon J & Gaillard ER** 2006: Antioxidant properties of melanin in retinal pigment epithelial cells. *Photochemistry and photobiology* 82: 474–479.

**Wariishi H, Valli K & Gold M** 1992: Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of biological chemistry* 33: 23688–23695.

**Wells MJM** 2003: *Sample preparation techniques in analytical chemistry. Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids*. 1. Aufl., Wiley-Interscience

**Werkhoff P, Bretschneider W, Güntert, M., Hopp, R. & Surburg H** 1991: Chirospecific analysis in flavor and essential oil chemistry Part B. Direct enantiomer resolution of trans-alpha-ionone and trans-alpha-damascone by inclusion gas chromatography. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 192: 111–115.

**White GJ & Traquair JA** 2006: Necrotrophic mycoparasitism of *Botrytis cinerea* by cellulolytic and ligninocellulolytic Basidiomycetes. Canadian journal of microbiology 52: 508–518.

**Whitwam RE, Brown KR, Musick M, Natan MJ & Tien M** 1997: Mutagenesis of the Mn<sup>2+</sup>-binding site of manganese peroxidase affects oxidation of Mn<sup>2+</sup> by both compound I and compound II. Biochemistry 36: 9766–9773.

**Wilhelm J & Pingoud A** 2003: Real-time polymerase chain reaction. Chembiochemistry 4: 1120–1128.

**Winterhalter P & Rouseff RL** 2001: Carotenoid-derived aroma compounds. American chemical society, Washington, DC.

**Woo H, Cho J, Lee B & Kim EK** 2004: Decolorization of melanin by lignin peroxidase from *Phaenerochaete chrysosporium*. Biotechnology and bioprocess engineering 9: 256–260.

**Zelena K, Hardebusch B, Hülscäu B, Berger RG & Zorn H** 2009: Generation of norisoprenoid flavors from carotenoids by fungal peroxidases. Journal of agricultural and food chemistry 57: 9951–9955.

**Zhang J & Snyder S** 1992: Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Proceedings of the national academy of science 89: 9382–9385.

**Zorn H, Langhoff S, Scheibner M & Berger RG** 2003a: Cleavage of beta,beta-carotene to flavor compounds by fungi. Applied microbiology and biotechnology 62: 331–336.

**Zorn H, Langhoff S, Scheibner M, Nimitz M & Berger RG** 2003b: A peroxidase from *Lepista irina* cleaves  $\beta,\beta$ -carotene to flavor compounds. Biological chemistry 284: 1049–1056.

**Zorn H, Peters T, Nimitz M & Berger RG** 2005: The secretome of *Pleurotus sapidus*. Proteomics 5: 4832–4838.





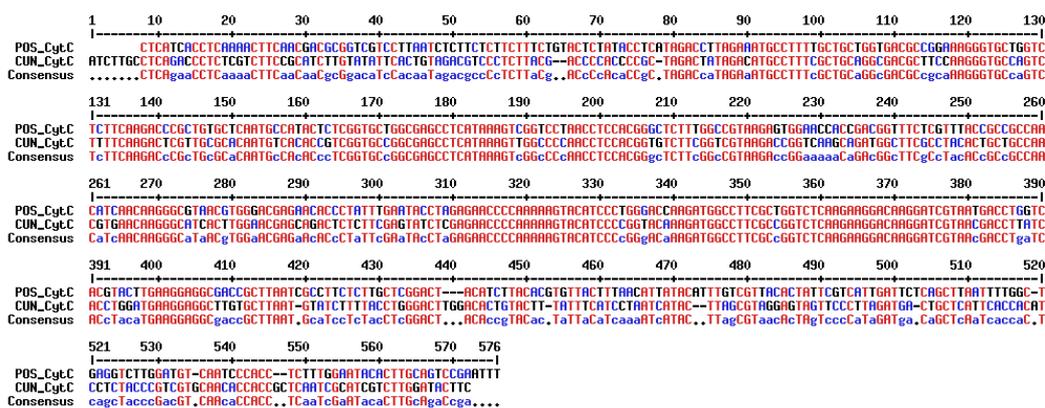


Abbildung 7.2 Sequenzabgleich CytC aus *Pleurotus ostreatus* gegen CytC aus *Cerrena unicolor*. Rot: Übereinstimmungen

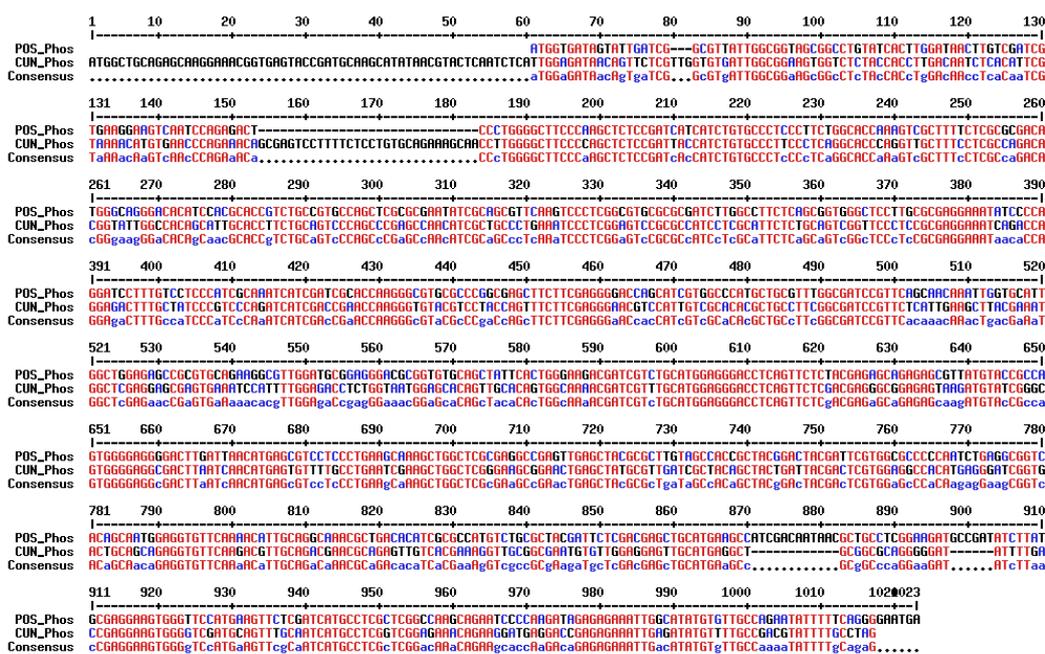


Abbildung 7.3 Sequenzabgleich Phos aus *Pleurotus ostreatus* gegen Phos aus *Cerrena unicolor*. Rot: Übereinstimmungen



Abbildung 7.4 Sequenzabgleich Actin1 aus *Ipex consors* gegen Actin1 aus *Cerrena unicolor*. Rot: Übereinstimmungen

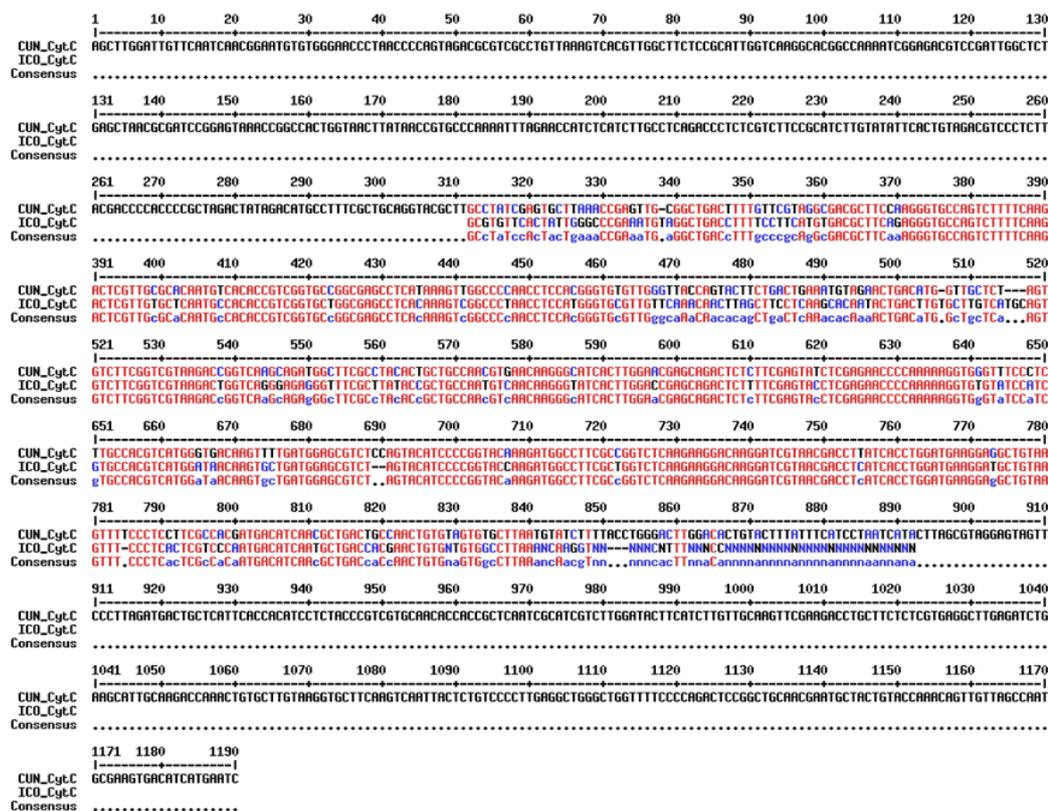


Abbildung 7.5 Sequenzabgleich CytC aus *Irpex consors* gegen Actin1 aus *Cerrena unicolor*. Rot: Übereinstimmungen



Abbildung 7.6 Sequenzabgleich Phos aus *Irpex consors* gegen Actin1 aus *Cerrera unicolor*. Rot: Übereinstimmungen

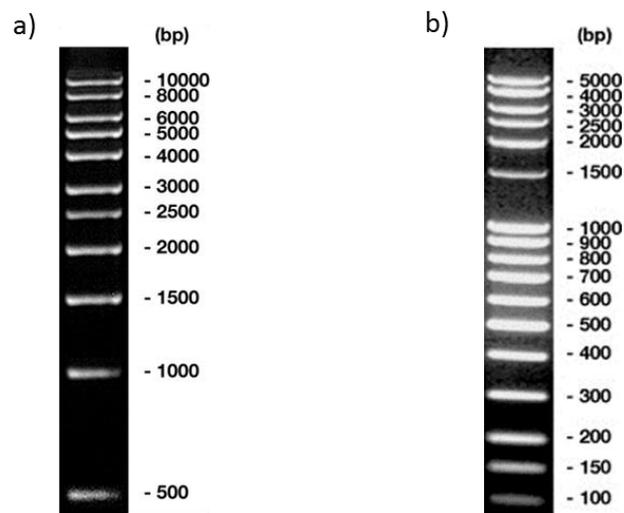


Abbildung 7.7 DNA-Größenstandards für Agarose-Gelelektrophorese. a) 1 kbp DNA-Leiter, b) 100 bp DNA-Leiter (extended). Bildquelle: *Gebrauchsanweisung*, Carl Roth

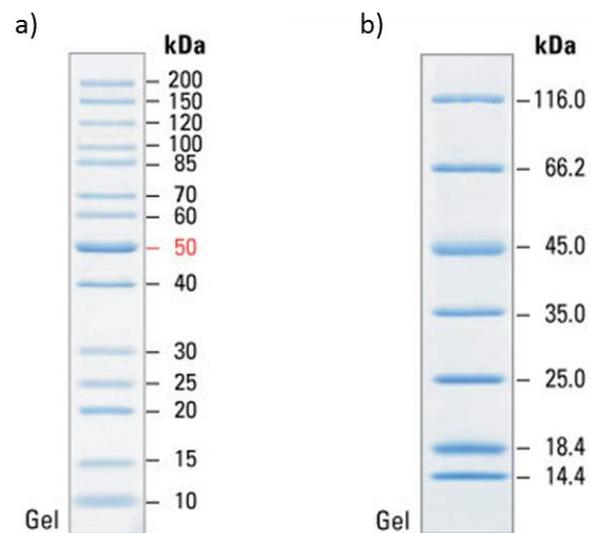


Abbildung 7.8 Proteingrößenstandards für denaturierende SDS-PAGE.. a) PageRuler Unstained Protein Ladder, b) Unstained Protein Molecular Weight Marker. Bildquelle: *Product Information* Thermo Fisher)

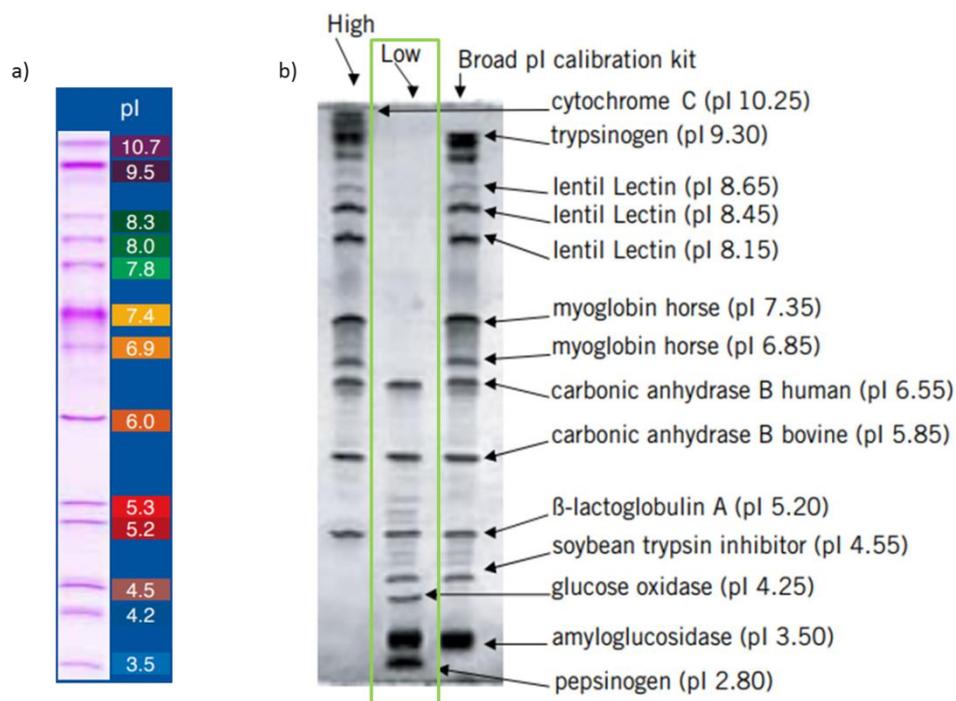


Abbildung 7.9 Standards für isoelektrische Fokussierung (IEF). a) SERVA IEF-Marker 3-10 liquid mix. Bildquelle: *Manual*, Invitrogen b) Amersham IEF Calibration Kit Low Range pl. Bildquelle: *Product Booklet*, GE Healthcare Life Science

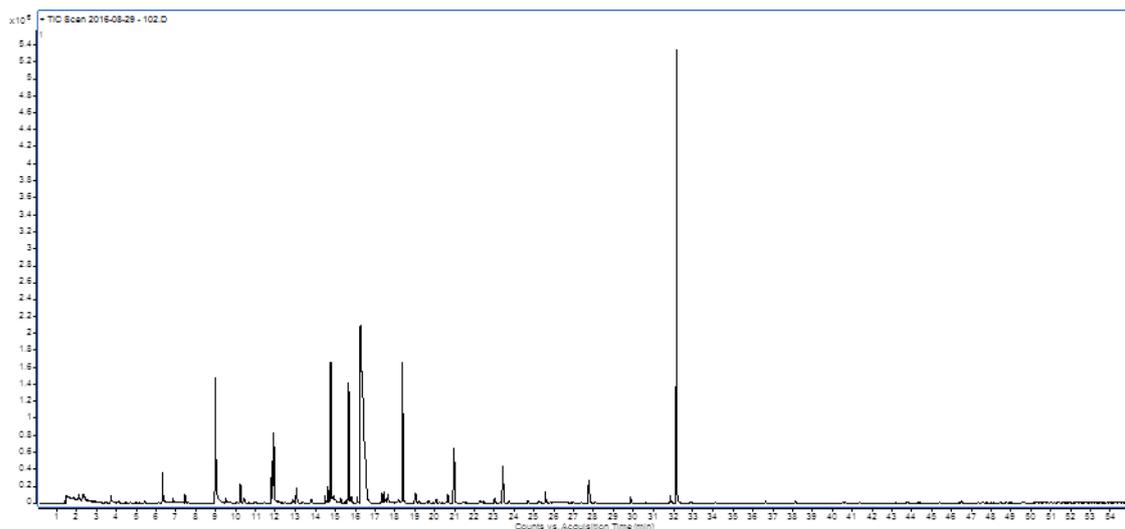


Abbildung 7.10 Blank Reaktionsansatz (2.8.10.3.3) ohne Substrat, ohne Enzym, mit Tween®80, gemessen mittels HS-SPME-GC-MS

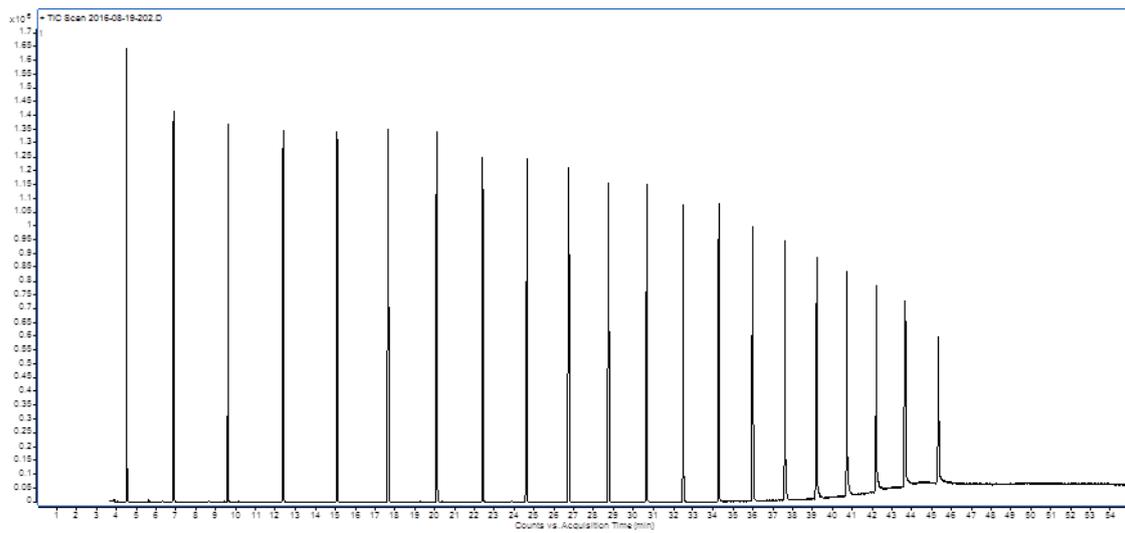


Abbildung 7.11 Alkanreihe mit allen homologen n-Alkanen von C8 bis C26 ( $40 \text{ mg}^* \text{L}^{-1}$  in Hexan), gemessen mittels HS-SPME-GC-MS

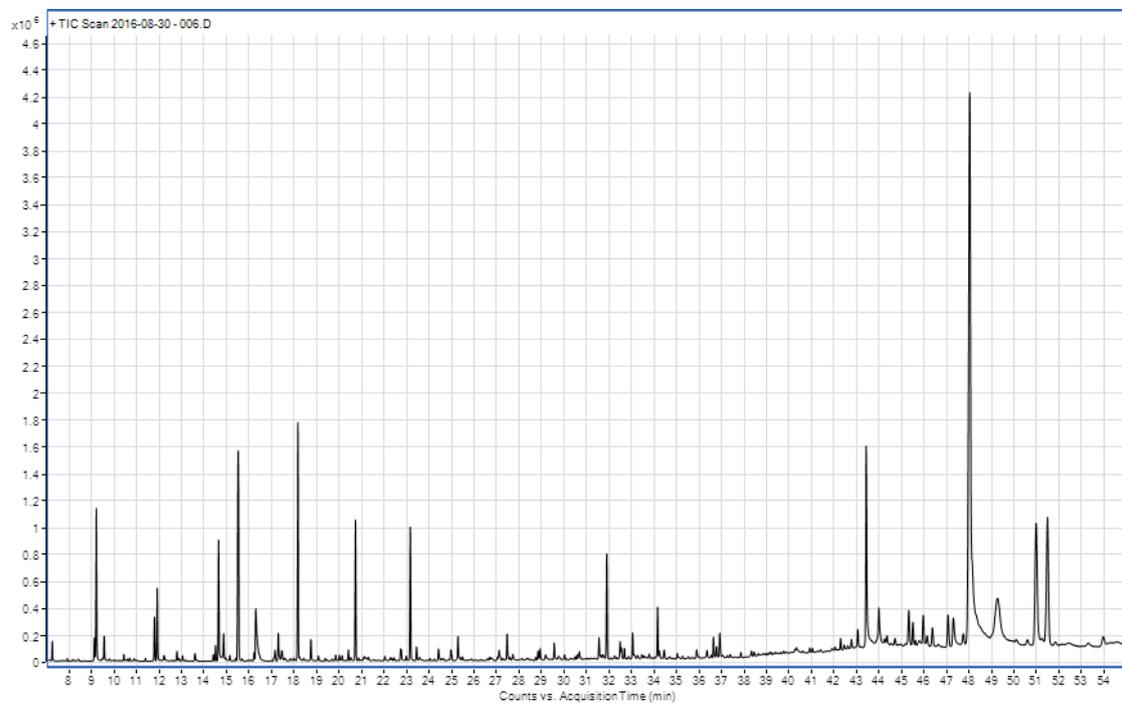


Abbildung 7.12 Blank Reaktionsansatz (2.8.10.3.4) ohne Substrat, ohne Enzym, mit Tween®80, gemessen mittels SBSE-TDU-CIS-GC-MS

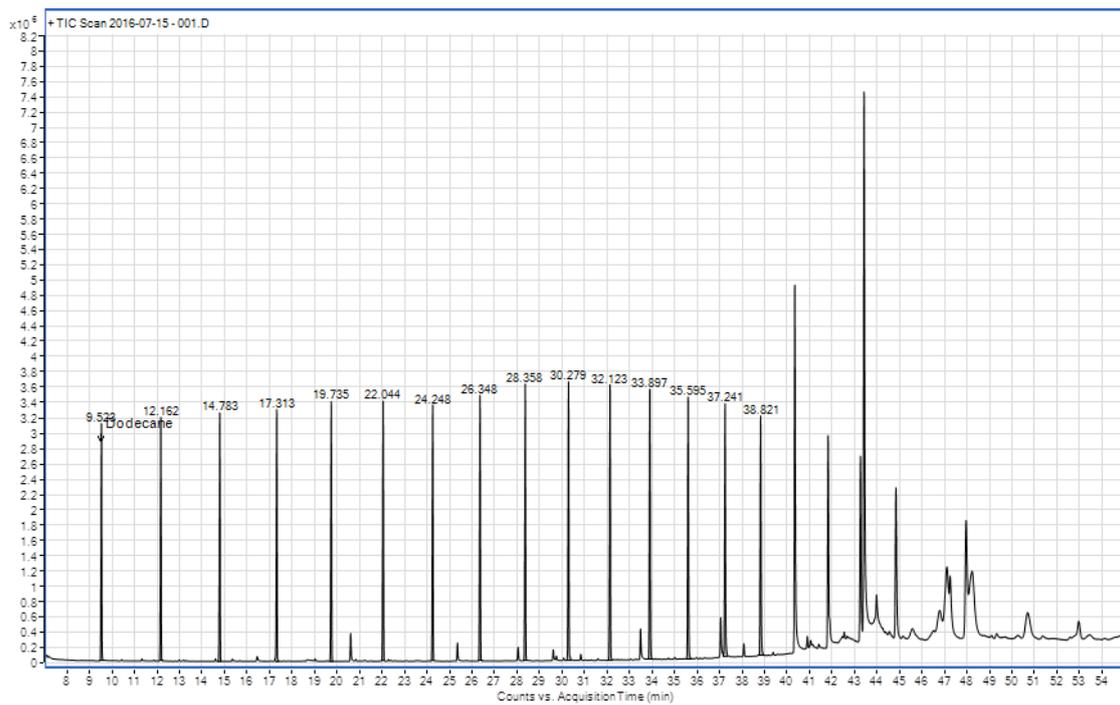


Abbildung 7.13 Alkanreihe mit allen homologen n-Alkanen von C8 bis C26 (40 mg\*L<sup>-1</sup> in Hexan), gemessen mittels SBSE-TSU-CIS-GC-MS

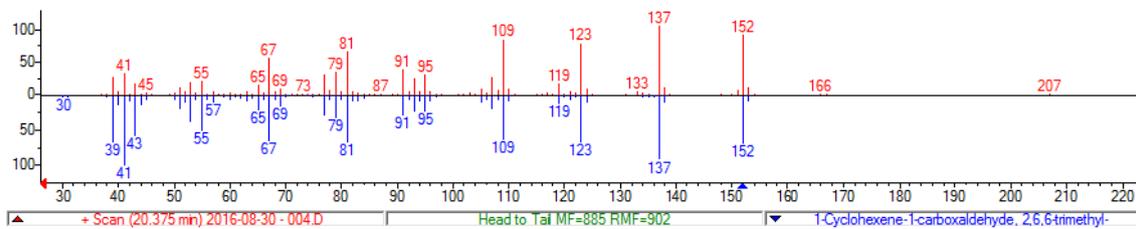


Abbildung 7.14 Massenspektrum  $\beta$ -Cyclocitral, Rot analysierte Substanz, Blau NIST-Datenbankident  $\beta$ -Cyclocitral

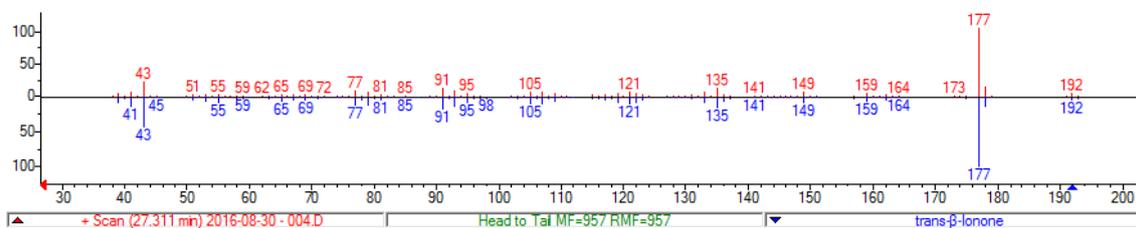


Abbildung 7.15 Massenspektrum  $\beta$ -Ionon, Rot analysierte Substanz, Blau NIST-Datenbankident  $\beta$ -Ionon

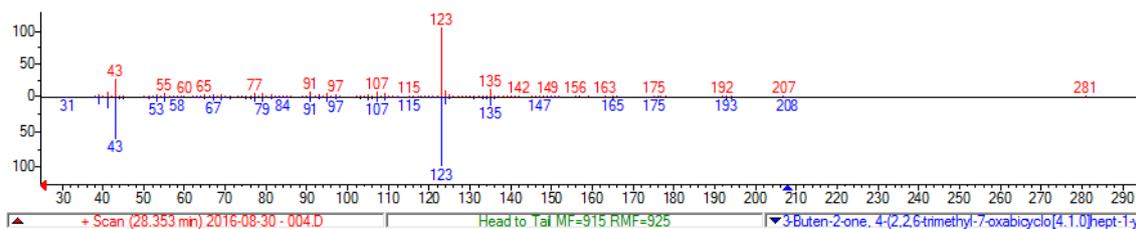


Abbildung 7.16 Massenspektrum 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon, Rot analysierte Substanz, Blau NIST-Datenbankident 5,6-Epoxy- $\beta$ -ionon

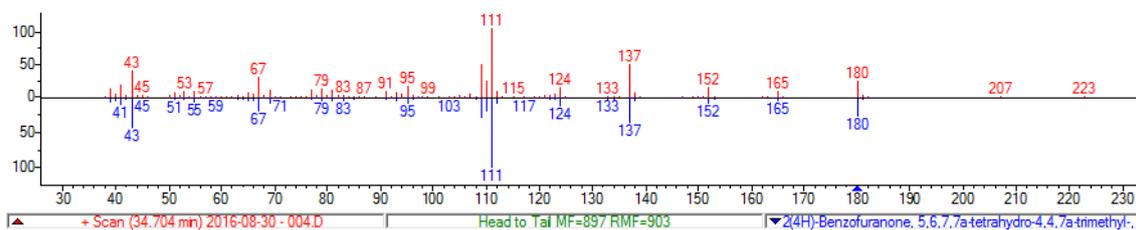


Abbildung 7.17 Massenspektrum Dihydroactinidiolid, Rot analysierte Substanz, Blau NIST-Datenbankident Dihydroactinidiolid