

**Molekulare Charakterisierung neuartiger
Biokatalysatoren aus Basidiomyceten**

Dissertation
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
M. Sc. **Stephanie Johanna Luise Riemer**

2010

Dekan: Prof. Dr. V. Wolters

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Zorn
Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger
Institut für Lebensmittelchemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

Gießen, Oktober 2010

Stephanie Riemer

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank Vielen, die ich während meiner Tätigkeit am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover, in der Arbeitsgruppe Technische Biochemie der Technischen Universität Dortmund und dem Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie während des Stipendiats der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) kennen lernen durfte.

Ich danke besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Zorn für das spannende und vielseitige Forschungsthema, für Förderung und Forderung, für sein stets offenes Ohr und seinen Optimismus. Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine konstruktiven Anregungen. Frau Prof. Dr. Sylvia Schnell danke ich für den Beitritt zur Prüfungskommission sowie Herrn Prof. Dr. Peter Friedhoff für den Prüfungsvorsitz.

Bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung und im Besonderen für die Möglichkeit, den eigenen Horizont zu erweitern und ein großartiges Netzwerk zu knüpfen, das über den Stipendenschwerpunkt „Nachhaltige Bioprozesse“ hinaus geht. Frau Dr. Hedda Schlegel-Starmann, Herrn Prof. Dr. Andreas Liese und Herrn Prof. Dr. Andreas Schmid danke ich für die hilfreichen Ratschläge während der Seminare und zu meinen Berichten.

Mit Rat und Tat stehen mir seit der hannoverschen Zeit Dr. Henning Bouws, Dr. Marco Fraatz, Dr. Diana Linke und Dr. Bärbel Hülsdau zur Seite – dafür vielen lieben Dank.

In Dortmund danke ich Kathrin Kissmann und Regina Stöber für die Unterstützung im Labor und – speziell bei Fragen zur Biologie aus der Sicht eines Ingenieurs – Stefan Konieczny.

In Gießen bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie und -biotechnologie für das freundschaftliche Verhältnis und die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt dem Damenquartett mit Herrn – Katharina Schmidt, Andrea Bosse, Christiane Lauber, Katrin Kunkel und Alexander Heuger – für die lehrreiche und schöne Zeit im Labor sowie außerhalb desselbigen.

Bei Herrn Dr. Manfred Nimtz vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig bedanke ich mich für die Peptidsequenzierung mittels ESI-MS/MS.

Mein größter und herzlichster Dank gilt zum einen meinen Eltern Susanne und Dr. Dietmar Kopp, die an mich glauben und immer für mich da sind – danke Papa für das schnellste Korrekturlesen der Welt – zum anderen meinem geliebten Mann und Ruhepol Jens Riemer, der mich durch seine Liebe, seine Unterstützung, seine Geduld und sein Verständnis zu einem übergelücklichen Menschen macht. Jetzt ist es geschafft!

Veröffentlichungen

Publikationen

Fraatz MA, Riemer SJL, Stöber R, Kaspera R, Nimtz M, Berger RG, Zorn H (2009) A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *J Mol Catal B Enzym* 61:202-207.

Merz J, Schembecker G, Riemer SJL, Nimtz M, Zorn H (2009) Purification and identification of a novel cutinase from *Coprinopsis cinerea* by adsorptive bubble separation. *Sep Purif Technol* 69:57-62.

Tagungsbeiträge

Linke D, Kopp SJL, Zorn H, Berger RG (2007) Enzyme aus Basidiomyceten – Biokatalysatoren der Zukunft. *Lebensmittelchemie* 61:135-136.

Kopp SJL, Kissmann K, Berger RG, Zorn H (2008) Neuartige β -Glucanasen für die Wein- und Fruchtsaftherstellung. *Lebensmittelchemie* 62:139.

Barth EE, Kopp S, Agar DW (2008) Development and characterisation of a microscale permselective enzymatic membrane reactor. 1st SynTOP Smart Synthesis and Technologies for Organic Processes, *VDI Berichte* 2039:151-153.

Fraatz MA, Kopp SJL, Berger RG, Zorn H (2009) Enzymatische Synthese von Nootkaton. *Lebensmittelchemie*. *Lebensmittelchemie* 63:130-131.

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

Schmidt K, Fraatz MA, Riemer SJL, Zelena K, Linke D, Berger RG, Zorn H (2010) Biochemical and molecular biological characterization of a novel oxygenase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Proceedings of the 9th Wartburg-Symposium, Eisenach, in press*.

Riemer SJL, Zorn H (2010) Molekulare Charakterisierung einer neuartigen Endo- β -Glucanase aus dem Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium*. *Lebensmittelchemie, in press*.

Schmidt K, Kalthoff L, Fraatz MA, Riemer SJL, Berger RG, Zorn H (2010) Charakterisierung einer neuartigen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. *Lebensmittelchemie, in press*.

Patent

Zorn H, Fraatz MA, Berger RG, Riemer SJL, Krings U, Marx S (2009) Enzymatische Synthese von Nootkaton. EP 08171148.

Zusammenfassung

Basidiomyceten als die am höchsten entwickelten Pilze stellen aufgrund ihrer komplexen Ausstattung an intra- und extrazellulären Enzymen wertvolle Werkzeuge für die Lebensmittelbiotechnologie dar. Da das stark viskositäts-erhöhende β -1,3-1,6-D-Glucan Cinerean die Herstellung von Säften und Weinen erschwert, wurden 29 Basidiomyceten in einem Screeningverfahren mit Cinerean als Induktor auf β -Glucanaseaktivität untersucht. 19 von ihnen zeigten potentielle β -Glucanaseaktivität, die mit Hilfe des für Endoaktivität spezifischen Substrats Laminarin azur (β -1,3-1,6-D-Glucan kovalent verknüpft mit Remazol Brillantblau R) näher charakterisiert wurde.

Kulturüberstände von *Phanerochaete chrysosporium* zeigten die höchste Endoaktivität gegenüber Laminarin azur. Bei einem pH-Optimum von 5,0 wurde ein Temperatur-Optimum von 63 °C bis 68 °C ermittelt. Im Kulturüberstand wurden nach isoelektrischer Fokussierung 2 Enzyme nachgewiesen, die Aktivität gegenüber Laminarin zeigten. Die jeweiligen isoelektrischen Punkte betragen 6,7 und 5,5. Die Analyse der Laminarinabbauprodukte mittels Größenausschlusschromatographie, gekoppelt mit einem Verdampfungslichtstredetektor (SEC-ELSD), wies auf eine Endoaktivität hin. Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie wurde eine Endo- β -Glucanase mit einem Molekulargewicht von 39 kDa (GFC) bzw. 42 kDa (denaturierende SDS-PAGE) bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt und nach tryptischem Verdau mittels ESI-MS/MS *de novo* ansequenziert. Die erhaltenen Peptidsequenzen zeigten hohe Homologien zu einer Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*.

Basierend auf den ermittelten Peptidsequenzen wurde die für die Endo- β -Glucanase kodierende cDNA mit 948 bp kloniert. Nach Anpassung der Nukleotidsequenz an die Codon Usage von *E. coli* wurde die Endo- β -Glucanase heterolog exprimiert und mittels Western Blot nachgewiesen.

Aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* wurde die kodierende cDNA einer Oxygenase, die (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton zu transformieren vermag, mit 1.191 bp kloniert. Die cDNA-Sequenz zeigte eine hohe Homologie zu einer mutmaßlichen Lipoxygenase aus dem nah verwandten Pilz *Pleurotus ostreatus*. Für die heterologe Expression der Oxygenase wurde die Nukleotidsequenz an die Codon Usage von *Hansenula polymorpha* angepasst. Die Expression wurde mittels Western Blot und oxygenasespezifischen Antikörpern nachgewiesen. Sowohl gegenüber (+)-Valencen als auch gegenüber dem für Lipoxygenasen typischen Substrat Linolsäure zeigte das rekombinante Enzym keine Aktivität.

Abstract

Due to their complex arsenal of intra- and extracellular enzymes, fungi of the class of basidiomycetes represent promising tools for applications in food biotechnology. The production of juices and wine may be hindered by the presence of the highly viscous β -1,3-1,6-D-glucan cinerean. Therefore, 29 basidiomycetes were screened for β -glucanase activity using cinerean as an elicitor. 19 of them showed β -glucanase activity which were examined more closely with laminarin azure (β -1,3-1,6-D-glucan covalently linked with Remazol Brilliant Blue R), a specific substrate for endo-activity.

Culture supernatants from *Phanerochaete chrysosporium* showed highest endo-activity against the chemically modified β -1,3-1,6-D-glucan laminarin azure. Optimal hydrolysis was observed at a pH value of 5.0 and temperature between 63 °C and 68 °C. Isoelectric focusing revealed 2 active enzymes with isoelectric points of 6.7 and 5.5, respectively. Analysis of the laminarin cleavage products by means of size exclusion chromatography coupled with an evaporative light scattering detector (SEC-ELSD) indicated an endo-activity of the enzyme. The molecular weight of an endo- β -glucanase was determined to be 39 kDa (SEC) and 42 kDa (SDS-PAGE), respectively. The enzyme was purified to electrophoretic homogeneity by gel filtration chromatography (GFC). Peptide sequences obtained by ESI-MS/MS after tryptic digestion revealed high homologies to further endo-1,3(4)- β -glucanase from *Phanerochaete chrysosporium*.

The 948 bp cDNA of the endo- β -glucanase was amplified by PCR and cloned. The nucleotide sequence was adapted to the codon usage of *E. coli*. The endo- β -glucanase was heterologously expressed and successful expression was shown by western blot analysis.

From the basidiomycete *Pleurotus sapidus* the 1191 bp-cDNA of an oxygenase, which oxidizes (+)-valencene to the grapefruit flavor (+)-nootkatone, was cloned.

The cDNA sequence showed high homology to a putative lipoxygenase to the closely related fungi *Pleurotus ostreatus*. The nucleotide sequence was adapted to the codon usage of *Hansenula polymorpha*, and the oxygenase was heterologously expressed. Successful expression was shown by western blot analysis. However, enzymatic activity for the oxidation of (+)-valencene was not detected.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Bisherige Kenntnisse	1
1.2 Zielsetzung	5
2 Methoden	7
2.1 Chemikalien, Geräte, Mikroorganismen	7
2.2 Kultivierung von Asco- und Basidiomyceten.....	13
2.2.1 SNL-Medium.....	13
2.2.2 SNL-Agar	13
2.2.3 Spurenelementlösung	13
2.2.4 Minimalmedium für die Produktion von Cinerean.....	14
2.2.5 Spurenelementlösung II	14
2.2.6 Minimalmedium für die Induktion von Glucanasen.....	14
2.2.7 Screening-Agar für die Induktion von Glucanasen.....	15
2.2.8 Agar ohne Induktor (Referenz-Agar).....	15
2.2.9 Stammhaltung Asco- und Basidiomyceten	15
2.2.10 Stammscreening Basidiomyceten.....	16
2.2.11 Vorkultur	16
2.2.12 Hauptkultur <i>Botrytis cinerea</i>	16
2.2.13 Hauptkultur Stammscreening/ <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17
2.2.14 Hauptkultur <i>Pleurotus sapidus</i>	17
2.2.15 Kulturernte <i>Botrytis cinerea</i> – Cinereangewinnung	17
2.2.16 Kulturernte <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17
2.2.17 Kulturernte und Zellaufschluss <i>Pleurotus sapidus</i>	18
2.3 Kultivierung von <i>E. coli</i>	18
2.3.1 LB-Medium	18
2.3.2 LB-Agar.....	18
2.3.3 Ampicillin-Stammlösung.....	18
2.3.4 LB _{amp} -Medium.....	19

2.3.5	LB _{amp} -Agar	19
2.3.6	Expressionsmedium _{amp}	19
2.3.7	Stammhaltung	19
2.3.8	Übernachtkultur	20
2.3.9	Glycerol-Stock	20
2.3.10	Expressionskultur	20
2.3.11	Kulturernte und Zellaufschluss (Ultraschall/osmotischer Schock)	20
2.4	Kultivierung von <i>Hansenula polymorpha</i>	21
2.4.1	YPD-Medium	21
2.4.2	YPG-Medium für die Expression	21
2.4.3	YPD-Agar	22
2.4.4	Stammhaltung	22
2.4.5	Vorkultur	22
2.4.6	Hauptkultur	22
2.4.7	Kulturernte und Zellaufschluss	22
2.5	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts	23
2.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
2.7	Citrat-Phosphat-Puffer	25
2.8	Enzymassays	26
2.8.1	Stammscreening – Bestimmung der Endo- β -Glucanaseaktivität	26
2.8.2	Reagenzien für den Nelson-Somogyi-Test	27
2.8.3	Bestimmung der Gesamtglucanaseaktivität	28
2.8.3.1	pH-Optimum	30
2.8.3.2	Temperatur-Optimum	30
2.8.3.3	Rekombinante Glucanase	30
2.8.4	Spaltmuster Endo-/Exo-1,3- β -Glucanasen	31
2.8.4.1	Größenausschlusschromatographie mit Verdampfungslichtstredetektor (SEC-ELSD)	32
2.8.5	Transformation von (+)-Valencen	32
2.8.5.1	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)	33
2.8.6	Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität	33

2.9	Konzentrierung und Umpufferung	35
2.10	Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....	35
2.10.1	Gelfiltrationschromatographie (GFC)	35
2.10.2	Affinitätschromatographie mittels Amylosesäule.....	37
2.10.3	Affinitätschromatographie mittels Benzamidinsäule.....	37
2.11	Elektrophorese.....	38
2.11.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
2.11.2	Halbnative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	41
2.11.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF).....	41
2.11.4	Coomassiefärbung.....	42
2.11.5	Silberfärbung	42
2.11.6	Aktivitätsfärbung	43
2.12	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.13	cDNA-Synthese.....	45
2.13.1	RNA-Isolierung.....	45
2.13.2	Überprüfung der RNA-Qualität.....	45
2.13.3	Erststrangsynthese	45
2.13.4	LD-PCR	46
2.14	Isolierung genomischer DNA.....	46
2.15	Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
2.15.1	PCR	46
2.15.2	Kolonie-PCR.....	47
2.16	DNA-Fragmentisolierung	48
2.17	Gentransfer	49
2.17.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	49
2.17.2	Ligation mittels TA-Cloning.....	50
2.17.3	Transformation in <i>E. coli</i> TOP10.....	50
2.17.4	Blau/Weiß-Screening	50
2.17.5	Plasmidisolierung.....	51
2.17.6	Sequenzierung.....	51
2.18	Heterologe Expression.....	51
2.18.1	Restriktionsverdau	52

2.18.2	Ligation von Expressionsvektoren	52
2.18.3	Transformation in <i>E. coli</i> K12 TB1	53
2.18.4	Kolonie-PCR	53
2.19	Western Blot	53
2.19.1	Antikörper	53
2.19.2	Western Blot	54
3	Ergebnisse	57
3.1	Produktion von Cinerean	57
3.2	Screening von Basidiomyceten auf β-Glucanaseaktivität	58
3.2.1	Plattenscreening auf β -Glucanaseaktivität	58
3.2.2	Screening in Submerskultur auf Endo- β -Glucanaseaktivität	59
3.3	Charakterisierung der Endo-β-Glucanase aus <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	62
3.3.1	Endo- β -Glucanaseaktivität von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ...	62
3.3.2	Gesamtglucanaseaktivität von <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	63
3.3.3	pH-Optimum der von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> sekretierten Endo- β -Glucanase	65
3.3.4	Temperatur-Optimum der von <i>Phanerochaete chrysosporium</i> sekretierten Endo- β -Glucanase	66
3.3.5	Bestimmung des isoelektrischen Punktes.....	67
3.3.6	Spaltpmuster Endo-/Exo- β -Glucanasen.....	68
3.3.6.1	Exoglucanasepräparat aus <i>Penicillium funiculosum</i> (Emersfermentation).....	71
3.3.6.2	Exoglucanasepräparat aus <i>Penicillium funiculosum</i> (Submersfermentation)	72
3.3.6.3	Exoglucanasepräparat aus <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	73
3.3.6.4	Exoglucanasepräparat aus <i>Trichoderma harzianum</i> mit Pektinase aus <i>Aspergillus niger</i>	74
3.3.6.5	Exoglucanasepräparat aus <i>Trichoderma harzianum</i> (Glucanex)	75
3.3.6.6	Endoglucanasepräparat (TU Braunschweig)	76
3.3.6.7	Endoglucanasepräparat aus <i>Helix pomatia</i>	76

3.3.6.8	Kulturüberstand von <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	78
3.4	Proteinbiochemische Charakterisierung der Endo-β-Glucanase aus <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	79
3.4.1	Reinigung mittels Gelfiltrationschromatographie (GFC)	79
3.4.2	Sequenzierung und Homologievergleich	82
3.5	Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten	84
3.6	Molekularbiologische Charakterisierung der Endo-β-Glucanase aus <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	87
3.6.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	87
3.6.2	Ableitung der Primer	88
3.6.3	Isolierung eines cDNA-Fragments der Endo- β -Glucanase	88
3.6.4	Isolierung der cDNA der Endo- β -Glucanase	89
3.6.5	Berechnung eines Strukturmodells	94
3.6.6	Phylogenetische Einordnung	96
3.7	Heterologe Expression der Endo-β-Glucanase aus <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	96
3.7.1	Klonierung in <i>E. coli</i>	96
3.7.2	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	98
3.7.3	Nachweis von Glucanaseaktivität	100
3.8	Molekulare Charakterisierung einer Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	102
3.8.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	102
3.8.2	Ableitung der Primer	103
3.8.3	Isolierung eines cDNA-Fragments der Oxygenase	105
3.8.4	Primer Walking	106
3.8.5	Isolierung der cDNA der Oxygenase	109
3.8.6	Berechnung eines Strukturmodells	110
3.8.7	Heterologe Expression in <i>Hansenula polymorpha</i>	112
3.8.8	Nachweis von Aktivität	115
4	Diskussion	117
4.1	Enzyme für die Weinbereitung	117
4.2	Glykosidhydrolasen	118

4.2.1	Klassifizierung.....	118
4.2.2	Unterscheidung Endo-/Exoaktivität	121
4.3	Screening von Basidiomyceten auf Endo-β-Glucanaseaktivität	124
4.4	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> L13-2.....	127
4.5	Endo-β-Glucanase aus <i>Phanerochaete chrysosporium</i>.....	128
4.5.1	Proteinbiochemische Eigenschaften	130
4.5.2	Molekularbiologische Charakterisierung	133
4.5.3	Heterologe Expression.....	141
4.6	Oxygenase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	143
4.6.1	Molekularbiologische Charakterisierung	144
4.6.2	Nachweis mittels polyklonaler Antikörper.....	150
4.6.3	Heterologe Expression.....	152
4.7	Nachhaltigkeit	152
5	Ausblick	155
6	Literatur.....	157

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, Niederlande
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	Dithiotreitol
EBI	European Bioinformatics Institute
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI-MS	Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FSU	Friedrich-Schiller-Universität, Jena
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAU	Georg-August-Universität, Göttingen
GC	Gaschromatographie
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GWLU	Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPAEC	Hochleistungsanionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaare

kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
LB	Luria Bertani
LD	Long Distance
MEK	Methylethylketon
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molekulargewichtsgrenze
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SNL	Standardnährlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLC	Dünnschichtchromatographie
Tris	C,C,C-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
VE	vollentsalzt
verd.	verdünnt
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
w/v	Masse pro Volumen (bei Prozentangaben)
X- β -Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Die Abkürzung der Aminosäuren entsprach dem internationalen Ein- oder Dreibuchstabencode. Eine Zahl hinter der Aminosäure kennzeichnet ihre Position innerhalb der Proteinsequenz.

1 Einleitung

1.1 Bisherige Kenntnisse

„Um Missverständnissen vorzubeugen und lästige Umschreibungen zu vermeiden schlägt Vortragender vor, die ungeformten oder nicht organisierten Fermente, deren Wirkung ohne Anwesenheit von Organismen und außerhalb derselben erfolgen kann, als Enzyme zu bezeichnen.“ – Damit führte der Physiologe Wilhelm Friedrich Kühne während der Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg im Jahre 1876 den Begriff Enzym ein, der soviel wie „in Hefe“ bedeutet (Kühne 1877). Erst im Jahre 1926 bewies der Chemiker James Batcheller Sumner anhand des Enzyms Urease, dass es sich bei Enzymen um Proteine handelt, die als Biokatalysatoren wirken (Sumner 1926). Seit den frühen 1980er Jahren verbreitete sich die Anwendung von Enzymen in der Industrie (Pass 1981). Die so genannte „Weiße Biotechnologie“ strebt seitdem an, konkurrenzfähige, umweltfreundliche und nachhaltige Alternativen gegenüber herkömmlichen petrochemischen Prozessen zu ermöglichen. Dazu werden Enzyme mit neuartigen katalytischen Eigenschaften benötigt. Gemäß einer Studie der internationalen Unternehmensberatung McKinsey & Company könnten Methoden der Weißen Biotechnologie mit hohen jährlichen Wachstumsraten zu einem Anteil von bis zu 20% in der gesamten chemischen Industrie eingesetzt werden (Frazzetto 2003).

Eine ergiebige Quelle für Enzyme mit hohem Anwendungspotential in der Weißen Biotechnologie stellt insbesondere die Abteilung Basidiomyceten (Ständerpilze) dar, von denen bisher 30.000 Arten bekannt sind (Kirk *et al.* 2008). Aufgrund der Komplexität ihrer Substrate wie Holz und terpenreiche Biopolymere sind sie in der Lage, eine eindrucksvolle Auswahl an einzigartigen Enzymen – einschließlich Hydrolasen (Pérez *et al.* 2002) und Oxidoreduktasen (Scheibner *et al.* 2008) – zu produzieren. Dabei sind die häufig extrazellulären Enzyme außergewöhnlich stabil (Jacobs und Callewaert 2009). Zudem akzeptieren sie

zahlreiche nachwachsende Rohstoffe als Kohlenstoffquelle und als Substrate in Transformationsreaktionen (Bouws *et al.* 2008).

Eines der ältesten Beispiele der Lebensmittelbiotechnologie ist die Herstellung von Wein. Die Datierung der ersten Weinherstellung geht auf die Neusteinzeit zwischen 5400 bis 5000 v. Chr. in Hajji Firuz Tepe im Zagros-Gebirge (Iran) zurück (McGovern *et al.* 1996). Die Fermentation von Most zu Wein ist ein komplexer biochemischer Prozess, bei dem zahlreiche Enzyme involviert sind. Die Enzyme, die sich sowohl positiv als auch negativ auf die Qualität des Weines auswirken können, stammen aus den Trauben, ihrer Mikroflora und den Mikroorganismen, die an der Gärung beteiligt sind (van Rensburg und Pretorius 2000). Um den Gärungsprozess steuern und damit eine gleichbleibende Qualität von Wein gewährleisten zu können, werden seit den 1970er Jahren kommerzielle Enzympräparationen eingesetzt, die zum einen die positive Wirkung der natürlich vorkommenden Enzymaktivitäten begünstigen. Zum anderen dienen sie dazu, das Ergebnis unerwünschter und zu Problemen führender Enzymaktivitäten zu reduzieren (Moreno-Arribas und Polo 2005).

Als besonders problematisch bei der Herstellung von Säften und Weinen gilt das vom Schimmelpilz *Botrytis cinerea* extrazellulär gebildete, stark viskositätserhöhende β -1,3-1,6-D-Glucan Cinerean mit einem Molekulargewicht von bis zu 1.000 kDa (Dubourdieu *et al.* 1981, Abb. 1.1). Durch das Cinerean werden die Prozessvorgänge Filtration, Klärung und Stabilisierung von Most und Wein stark beeinträchtigt.

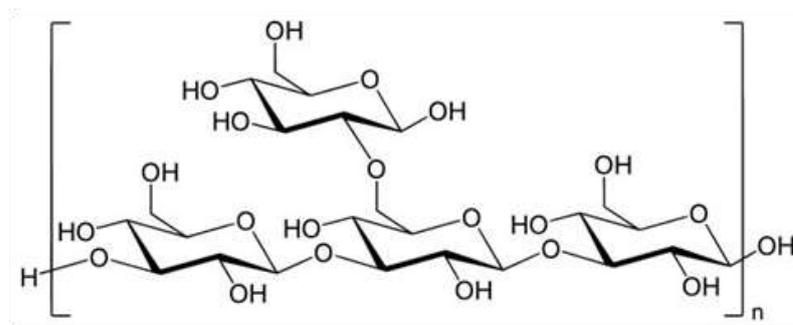


Abb. 1.1: β -1,3-1,6-D-Glucan

In der Kellereitechnik kann der Abbau dieses Glucans mit Hilfe von β -Glucanase-Präparaten aus verschiedenen *Trichoderma*-Arten, die zu der Abteilung Ascomyceten gehören, erfolgen (Moreno-Arribas und Polo 2005). Nach der Durchführungsverordnung der EU-Kommission (EG) Nr. 606/2009 zur europäischen Marktorganisations-Verordnung für Wein (EG) Nr. 1493/1999 handelt es sich bei β -Glucanasen um Enzyme der EC Klasse 3.2.1.58 und demnach um 1,3- β -Glucosidasen, die vom nichtreduzierenden Ende des Glucans nach Inversion des anomeren Zentrums α -Glucose freisetzen. Diese Exoaktivität hat lange Standzeiten von bis zu einer Woche zur Folge (Villettaz *et al.* 1984). Glucanasen mit einer Endoaktivität, die das Cinerean im Inneren des Moleküls hydrolysieren und damit schneller zu einer verbesserten Filtrierbarkeit von Most führen könnten, sind bislang laut Verordnung nicht zugelassen.

Ein anderes Gebiet, bei dem das enzymatische Potenzial von Pilzen zum Einsatz kommt, ist die Herstellung von Aromen. Aromen finden in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Parfümindustrie sowie bei der Herstellung von Wasch- und Reinigungsmitteln vielseitige Verwendung. „Natürliche Aromastoffe“ werden gegenüber chemisch synthetisierten Aromastoffen vom Endverbraucher bevorzugt. Gemäß der europäischen Verordnung (EG) Nr. 1334/2008 handelt es sich um einen „natürlichen Aromastoff“, wenn er durch geeignete physikalische, enzymatische oder mikrobiologische Verfahren aus pflanzlichen, tierischen oder mikrobiologischen Ausgangsstoffen gewonnen wird und wenn er natürlich vorkommt, d. h. in der Natur nachgewiesen wurde. Biotechnologisch erzeugte Aromastoffe werden demnach als „natürliche Aromastoffe“ deklariert, was einen Wettbewerbsvorteil gegenüber chemosynthetisch hergestellten Aromastoffen darstellt.

Unter den Aromastoffen bilden Terpenkohlenwasserstoffe und ihre Oxidationsprodukte, die Terpenoide, eine bedeutende Gruppe. Aus dem Speisepilz *Pleurotus sapidus* wurde in vorangegangenen Arbeiten eine Oxygenase identifiziert, die durch Oxyfunktionalisierung des Sesquiterpens (+)-Valencen den be-

gehrten Aromastoff (+)-Nootkaton erzeugt (Kaspera 2004, Fraatz 2007, Abb. 1.2).

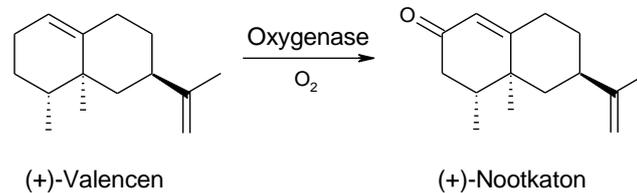


Abb. 1.2: Oxyfunktionalisierung von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch eine Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Die Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde proteinbiochemisch charakterisiert. Die *de novo*-Sequenzierung des bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigten Enzyms lieferte 16 Peptidsequenzen, die teilweise Homologien zu mutmaßlichen Lipxygenasen aus Ascomyceten zeigten (Fraatz 2007).

(+)-Valencen fällt als Neben- bzw. Abfallprodukt bei der Herstellung von Orangensaft im Tonnenmaßstab an. (+)-Nootkaton ist bei einem leicht bitteren Geschmack und einem extrem niedrigen sensorischen Schwellenwert von etwa $1 \mu\text{g L}^{-1}$ Wasser eine wichtige Komponente des Grapefruitaromas (Ohloff 1994). Die niedrigen Konzentrationen von (+)-Nootkaton in allen bekannten natürlichen Quellen erlauben keine wirtschaftliche Extraktion. Um den hohen Bedarf zu decken, wird (+)-Nootkaton derzeit ausschließlich chemosynthetisch hergestellt. Dazu sind eine Reihe umweltgefährdender, karzinogener und ätzender Chemikalien wie Chrom(VI), Tetrachlorkohlenstoff und Acetanhydrid notwendig (Hunter und Brogden 1965). Ein biotechnologisches Verfahren zur Produktion von (+)-Nootkaton im industriellen Maßstab wurde bislang nicht etabliert.

1.2 Zielsetzung

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung von zwei neuartigen Enzymen aus Basidiomyceten. Zum einen sollte in einem Screening eine Endo- β -Glucanase identifiziert und anschließend proteinbiochemisch charakterisiert werden, die das β -1,3-1,6-D-Glucan Cinerean zu hydrolysieren vermag. Die Reinigung des Enzyms diente der Ermittlung von Peptidsequenzen, anhand derer die kodierende cDNA-Sequenz der Endo- β -Glucanase zu identifizieren war.

Zum anderen sollte ausgehend von vorangegangenen Arbeiten (Fraatz 2007) die kodierende cDNA-Sequenz einer Oxygenase aus dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* identifiziert werden. Abschließend sollte die heterologe Expression beider Enzyme in *E. coli* bzw. *Hansenula polymorpha* erfolgen.

2 Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte, Mikroorganismen

Tab. 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung, Rotiphorese Gel 40	40% in Wasser; 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar Kobe I	reinst	Applichem, Darmstadt
Agarose LE	-	Biozym, Hessisch Oldendorf
Ammoniumnitrat	> 99%, p. a.	Applichem
Ammoniumperoxodisulfat	> 98%, p. a.	Applichem
Ampicillin, Natriumsalz	99%	Roth
L-Asparagin-Monohydrat	> 99%, reinst	Applichem
Bradford-Reagenz, Roti-Nanoquant	5x Konzentrat	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid (X- β -Gal)	> 99%, f. d. Biochemie	Roth
Bromphenolblau, Natriumsalz	f. d. Elektrophorese	Roth
Calciumchlorid-Dihydrat	> 99,5%, p. a.	Applichem
Citronensäure	> 99,5%, Ph. Eur.	Roth
Coomassie Brilliantblau G 250	reinst	Applichem
Coomassie Brilliantblau R 250	reinst	Applichem
Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	> 98 %, lyophilisiert	Roth
Diammoniummolybdat	99,998%	Acros Organics, Nidderau
Diethylether	> 99,5%, p. a.	Roth
Dimethylformamid	> 99,8%, p. a.	Roth
Dinatriumarsenat-Heptahydrat	98%	Alfa Aesar, Karlsruhe

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Dinatriumphosphat-Dihydrat	> 99,5%, p. a.	Applichem
Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	> 99,5%, Ph. Eur.	Roth
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	> 99%, p. a.	Applichem
Essigsäure	100%, p.a.	Roth
Ethanol	> 99,8%, m. MEK vergällt	Schmidt Chemikalien, Dillenburg
Ethanol	> 99,5%, Ph. Eur.	Roth
Ethanol	gradient grade	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (EDTA)	> 99%, p. a.	Applichem
Formaldehyd	37%, p. a.	Roth
Formamid	> 99,5%, deionisiert f. d. Molekularbiologie	Applichem
D(+)-Glucose-Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Roth
Glycerol	> 98%, Ph. Eur.	Roth
Glycin	> 99%, p. a.	Roth
Hefeextrakt	reinst	Fisher Scientific, Schwerte
Isopropanol	> 99,8%, p. a.	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	> 99%, f. d. Molekular- biologie	Roth
Kaliumchlorid	99-100,5%, Ph. Eur.	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat	p. a.	Roth
Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	> 99%, p. a.	Roth
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	> 99%, p. a.	Applichem
Laminarin	-	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Laminarin azur	-	Sigma-Aldrich
Linolsäure	99%	Acros Organics
Lipoxygenase	> 50.000 U mg ⁻¹	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	> 99,5%, f. d. Moleku- larbiologie	Applichem

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Magnesiumsulfat-Hydrat	> 99%, getrocknet, reinst	Roth
D(+)-Maltose-Monohydrat	> 95%, f. d. Biochemie	Roth
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	> 98%, p. a.	Roth
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	> 99%, p. a.	Applichem
β -Mercaptoethanol	99%, p. a.	Roth
Natriumazid	> 99%, reinst	Applichem
Natriumcarbonat	> 99%, wasserfrei	Roth
Natriumchlorid	99-100,5%, Ph. Eur.	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Ph. Eur.	Merck
Natriumhydrogencarbonat	> 99,5%, p. a.	Roth
Natriumhydroxid	> 99%, p. a.	Roth
Natriumsulfat	> 99%, p. a.	Roth
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	> 99%, Ph. Eur.	Roth
(+)-Nootkaton	> 99%, puriss.	Sigma-Aldrich
Orcinol	97%	Sigma-Aldrich
n-Pentan	> 99%, p. a.	Roth
Pepton	f. d. Mikrobiologie	Roth
Rinderserumalbumin (BSA)	> 98%, f. d. Molekularbiologie	Roth
Salzsäure	> 25%, p. a.	Roth
Schizophyllan	Glucangehalt 6,1 g L ⁻¹	Erbslöh, Geisenheim
Schwefelsäure	98%	Roth
Silbernitrat	> 99,9%, p. a.	Roth
Stickstoff	5.0	Linde, Pullach
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	> 99%	Applichem
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	> 99,3%, buffer grade	Roth
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	> 99%, p. a.	Roth
Wasserstoff	5.0	Linde
(+)-Valencen	95%	Döhler, Darmstadt

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Xylencyanol	f. d. Elektrophorese	Merck
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	> 99,5%, p. a.	Applichem

Tab. 2.2: Geräte

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	Laboklav 160	SHP Steriltechnik, Magdeburg
Autoklav	Laboklav 25	SHP Steriltechnik
Dispergiergerät	T 25 digital Ultra-Turrax	IKA, Staufen
Dispergierwerkzeug	S 25 N - 18 G	IKA
Kühl-Thermo-Mixer	MKR 13	HLC BioTech, Bovenden
Gefriertrocknungsanlage	VaCo 2	Zirbus Technology, Bad Grund
Geldokumentation	DeVision G	Decon Science Tec, Hohengandern
Gelkammer	PerfectBlue Mini S	Peqlab, Erlangen
IEF-Gel- elektrophoresekammer	Multiphor II	GE Healthcare, München
Inkubator	INE 500	Memmert, Schwabach
Inkubationsschüttler	Multitron 2	Infors HAT, Einsbach
PCR-Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
PCR-Werkbank	PCR-Workstation	Peqlab
pH-Meter	SevenEasy pH	Mettler Toledo, Gießen
Pipette 0,1-2,5 µL	Research	Eppendorf
Pipette 2-20 µL	Research	Eppendorf
Pipette 20-200 µL	Research	Eppendorf
Pipette 100-1000 µL	Research	Eppendorf
Reinstwassersystem	arium 611VF	Sartorius, Göttingen
Gelelektrophoresekammer	PerfectBlue Twin S	Peqlab
Spannungsquelle	EV262	Peqlab
Spannungsquelle	EV231	Peqlab
Spektralphotometer	Specord 50	Analytik Jena, Jena

Gerät	Modell	Firma
Software Spektralphotometer	WinASPECT 2.2.1.0	Analytik Jena
Sterile Werkbank	HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Tank-Elektroblotter	PerfectBlue Web S	Peqlab
Tischzentrifuge	Allegra X-15R	Beckman Coulter, Krefeld
Tischzentrifuge	Microfuge 22R	Beckman Coulter
Ultraschallgerät	Sonifier B-12 Cell Disruptor	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA
Ultraschallsonde	Sonifier Converter Modell L	Branson Ultrasonics Corporation
Ultratiefkühlschrank	Forma 906	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	J2-MC	Beckman Coulter

Tab. 2.3: Mikroorganismen

Stamm	Abkürzung	Herkunft
<i>Botrytis cinerea</i> 877	BCI	DSMZ, Braunschweig
<i>Botrytis cinerea</i> 5145	BCI	DSMZ
<i>Agrocybe aegerita</i> 4021	AAE	Sylvan, Horst, Niederlande
<i>Armillaria mellea</i> 100.12	AME	CBS, Utrecht, Niederlande
<i>Clitocybe illudens</i> 3398	CIL	DSMZ
<i>Collybia fusipes</i> 414.79	CFU	CBS
<i>Hericium erinaceus</i> 260.74	HER	CBS
<i>Lentinula edodes</i>	LED	Weser-Champignon, Hessisch Oldendorf
<i>Lentinula edodes</i> 225.51	LED	CBS
<i>Lentinula edodes</i> A 20-5	LED	Gottfried Wilhelm Leibniz Universität (GWLU), Hannover
<i>Lepista nuda</i> 300.58	LNU	CBS
<i>Marasmius alliaceus</i> 413	MAL	GWLU
<i>Marasmius scorodonius</i> 137.83	MSC	CBS
<i>Marasmius scorodonius</i> 166.44	MSC	CBS

Stamm	Abkürzung	Herkunft
<i>Marasmius scorodoni</i> 850.87	MSC	CBS
<i>Meripilus giganteus</i> 561.86	MGI	CBS
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> L 13-2	PCH	Friedrich-Schiller-Universität (FSU), Jena
<i>Pholiota squarrosa</i> 5127	PSQ	DSMZ
<i>Pleurotus eryngii</i> 366.47	PER	DSMZ
<i>Pleurotus euosmus</i> 5331	PEU	DSMZ
<i>Pleurotus floridanus</i> Nr. 17	PFL	Georg-August-Universität (GAU), Göttingen
<i>Pleurotus lampas</i> 323.49	PLA	CBS
<i>Pleurotus ostreatus</i> 1020	POS	DSMZ
<i>Pleurotus sajor-caju</i> 5339	PSC	DSMZ
<i>Pleurotus sapidus</i> 8266	PSA	DSMZ
<i>Polyporus</i> sp. I	PSP	GWLU
<i>Polyporus umbellatus</i> 483.72	PUM	CBS
<i>Sparassis crispa</i> 408.71	SCR	CBS
<i>Trametes</i> sp. 480.63	TSP	CBS
<i>Trametes versicolor</i> E39	TVE	GWLU
<i>Wolfiporia cocos</i> 279.55	WCO	CBS
<i>Escheria coli</i> TOP10	<i>E. coli</i>	Invitrogen, Darmstadt
<i>Escheria coli</i> K12 TB1	<i>E. coli</i>	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
<i>Hansenula polymorpha</i>	-	Artes Biotechnology, Langenfeld

2.2 Kultivierung von Asco- und Basidiomyceten

2.2.1 SNL-Medium

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s. 2.2.3)	1 mL L ⁻¹

Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

Modifiziert nach Sprecher und Hanssen (1982)

2.2.2 SNL-Agar

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s. 2.2.3)	1 mL L ⁻¹

Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge

Agar-Agar 15,0 g L⁻¹

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

Modifiziert nach Sprecher und Hanssen (1982)

2.2.3 Spurenelementlösung

Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	80 mg L ⁻¹
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	90 mg L ⁻¹
Mangan(II)-sulfat-Monohydrat	30 mg L ⁻¹
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	5 mg L ⁻¹
EDTA	400 mg L ⁻¹

Steril filtrieren

2.2.4 Minimalmedium für die Produktion von Cinerean

Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,5 g L ⁻¹
Ammoniumnitrat	1,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung II (s. 2.2.5)	1 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 5,0 mit 1 M HCl	
D(+)-Glucose-Monohydrat	22,0 g L ⁻¹
Autoklavieren, Glucoselösung separat (121 °C, 20 min)	
Modifiziert nach Stahmann <i>et al.</i> (1992)	

2.2.5 Spurenelementlösung II

Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat	500 mg L ⁻¹
Zink(II)-sulfat-Heptahydrat	500 mg L ⁻¹
Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat	20 mg L ⁻¹
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	20 mg L ⁻¹
Steril filtrieren	

2.2.6 Minimalmedium für die Induktion von Glucanasen

Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Ammoniumnitrat	2,4 g L ⁻¹
Cinerean (s. 2.2.15)	1,0 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s. 2.2.3)	1 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge	
Cinerean 15 s mit Ultra-Turrax dispergieren	
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.2.7 Screening-Agar für die Induktion von Glucanasen

Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Ammoniumnitrat	2,4 g L ⁻¹
Cinerean (s. 2.2.15)	1,0 g L ⁻¹
bzw. Schizophyllan	200 mL L ⁻¹ (entspr. 1,2 g L ⁻¹ Glucan)
Spurenelementlösung (s. 2.2.3)	1 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge	
Agar-Agar	15,0 g L ⁻¹
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.2.8 Agar ohne Induktor (Referenz-Agar)

Kaliumdihydrogenphosphat	1,5 g L ⁻¹
Magnesiumsulfat-Hydrat	0,5 g L ⁻¹
Ammoniumnitrat	2,4 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s. 2.2.3)	1 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 6,0 mit 1 M Natronlauge	
Agar-Agar	15,0 g L ⁻¹
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.2.9 Stammhaltung Asco- und Basidiomyceten

Die SNL-Agarplatten (s. 2.2.2) wurden jeweils mit einem ca. 1 cm² großem, mit Myzel bewachsenem Stück einer SNL-Agarplatte der verwendeten Stämme angeimpft. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 24 °C inkubiert. Die bewachsenen Platten wurden bei 4 °C gelagert.

2.2.10 Stammscreening Basidiomyceten

Die Screening- und Referenz-Agarplatten (s. 2.2.7 und 2.2.8) wurden jeweils mit einem ca. 1 cm² großem, mit Myzel bewachsenem Stück einer SNL-Agarplatte der verwendeten Stämme angeimpft. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 24 °C inkubiert. Die Stämme wurden solange neu auf Screening- und Referenz-Agarplatten überimpft, bis der Wachstumsunterschied zwischen Screening- und Referenz-Agarplatten eindeutig war. Entsprechende Stämme wurden anschließend submers gescreent (s. 2.2.13).

2.2.11 Vorkultur

Für die Vorkulturen wurden 250 mL Enghals-Erlenmeyerkolben mit 100 mL SNL-Medium (s. 2.2.1) verwendet. Das Medium wurde mit einem ca. 1 cm² Stück von der jeweiligen Stammplatte (s. 2.2.9) inokuliert, indem das Agarstückchen mittels Ultra-Turrax 20 s lang zerkleinert wurde. Die Kulturen wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes zwischen 3 und 7 Tagen unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm inkubiert.

2.2.12 Hauptkultur *Botrytis cinerea*

Für die Hauptkulturen wurden 500 mL Enghals-Erlenmeyerkolben mit 250 mL Minimalmedium (s. 2.2.4) verwendet. Von der entsprechenden Vorkultur (s. 2.2.11) wurden ca. 25 mL entnommen und 10 min bei 4.000 rpm (2.559 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Mit dem resultierenden Myzel wurde das Minimalmedium inokuliert. Die Kulturen wurden unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm bis zu einem Glucosegehalt von 0,5% (Glucose-Teststreifen, Diabur-Test 5000, Roche, Mannheim) inkubiert.

2.2.13 Hauptkultur Stammscreening/*Phanerochaete chrysosporium*

Für die Hauptkulturen wurden 250 mL Enghals-Erlenmeyerkolben mit 100 mL Minimalmedium (s. 2.2.6) verwendet. Von der jeweiligen Vorkultur (s. 2.2.11) wurden ca. 10 mL entnommen und 10 min bei 4.000 rpm (2.559 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Mit dem resultierenden Myzel wurde das Minimalmedium inokuliert. Die Kulturen wurden zwischen 10 und 18 Tagen unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm inkubiert.

2.2.14 Hauptkultur *Pleurotus sapidus*

Für die Hauptkulturen wurden 500 mL Enghals-Erlenmeyerkolben mit 250 mL SNL-Medium (s. 2.2.1) verwendet. Das Medium wurde mit 25 mL der entsprechenden Vorkultur (s. 2.2.11) inokuliert. Die Kolben wurden 4 Tage unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm inkubiert (Fraatz 2007).

2.2.15 Kulturerernte *Botrytis cinerea* – Cinereangewinnung

Zur Abtrennung des Myzels vom Kulturüberstand wurden die Kulturen über ein Stofftuch filtriert. Unter Rühren bei 4 °C wurde zu 2 Volumenteilen Filtrat 1 Volumenteil 96%iges Ethanol gegeben. Das ausgefällte Cinerean wurde an der Oberfläche abgeschöpft und anschließend lyophilisiert (4 Tage, Stellflächentemperatur -20 °C, Kühlspirale -45 °C). Das Lyophilisat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.16 Kulturerernte *Phanerochaete chrysosporium*

Zur Abtrennung des Myzels vom Kulturüberstand wurden die Kulturen über einen Büchnertrichter filtriert. Der Kulturüberstand wurde in einer Saugflasche aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.17 Kulturernte und Zellaufschluss *Pleurotus sapidus*

Zur Abtrennung des Myzels vom Kulturüberstand wurden die Kulturen über ein Stofftuch filtriert. Das Myzel wurde dreimal mit VE-Wasser gewaschen und anschließend bei -20 °C eingefroren. Zum Zellaufschluss wurde das gefrorene Myzel bei einer Stellflächentemperatur von -20 °C und einer Kondensatortemperatur von -45 °C 2-3 Tage lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bei -20 °C gelagert.

2.3 Kultivierung von *E. coli*

2.3.1 LB-Medium

Trypton	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹
Natriumchlorid	10 g L ⁻¹
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.3.2 LB-Agar

LB-Medium (s. 2.3.1)	1 L
Agar-Agar	15 g
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.3.3 Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	100 mg mL ⁻¹
Steril filtrieren, Lagerung bei -20 °C	

2.3.4 LB_{amp}-Medium

LB-Medium (s. 2.3.1)	1 L
Ampicillin-Stammlösung (s. 2.3.3)	1 mL

Die Ampicillin-Stammlösung wurde direkt vor der Verwendung in das autoklavierte LB-Medium gegeben.

2.3.5 LB_{amp}-Agar

LB-Agar (s. 2.3.2)	1 L
Ampicillin-Stammlösung (s. 2.3.3)	1 mL

Die Ampicillin-Stammlösung wurde vor dem Gießen der Platten in den auf ca. 50 °C abgekühlten LB-Agar gegeben. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

2.3.6 Expressionsmedium_{amp}

Trypton	10,0 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5,0 g L ⁻¹
Natriumchlorid	5,0 g L ⁻¹
D(+)-Glucose-Monohydrat	2,2 g L ⁻¹
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	
Ampicillin-Stammlösung (s. 2.3.3)	1 mL L ⁻¹

Die Ampicillin-Stammlösung wurde direkt vor der Verwendung in das autoklavierte Expressionsmedium gegeben (121 °C, 20 min).

2.3.7 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte für Stämme ohne Vektor auf LB-Agarplatten (s. 2.3.2), für Stämme mit Vektor auf LB_{amp}-Agarplatten (s. 2.3.5). Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.3.8 Übernachtkultur

3 mL LB-Medium (s. 2.3.1) bzw. LB_{amp}-Medium (s. 2.3.4) wurden im 15 mL Falcon Tube mit einer einzelnen Kolonie von einer LB- bzw. LB_{amp}-Platte (s. 2.3.2 bzw. 2.3.5) angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 225 rpm.

2.3.9 Glycerol-Stock

Zur Konservierung wurden Glycerol-Stocks von Stämmen angelegt. Dazu wurden 600 µL einer frischen Übernachtkultur (s. 2.3.8) mit 400 µL sterilem 50%igem Glycerol vermischt. Die Mischung wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.10 Expressionskultur

Für die Expressionskulturen wurden 250 mL Enghals-Erlenmeyerkolben mit 80 mL Expressionsmedium_{amp} (s. 2.3.6) verwendet, die mit 800 µL einer Übernachtkultur (s. 2.3.8) von *E. coli* K12 TB1 mit dem gewünschten Fusionsplasmid inokuliert wurden. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 225 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 inkubiert und anschließend mit 0,3 mM IPTG (IPTG-Stammlösung 24 mg mL⁻¹, steril filtriert) induziert. Nach der Induktion erfolgte die Kultivierung für 12 h bei 20 °C und 225 rpm.

2.3.11 Kulturernte und Zellaufschluss (Ultraschall/osmotischer Schock)

Die Zellen der Expressionskultur wurden bei 4.000 *g* und 4 °C 10 min abzentrifugiert. Bei den pMAL-c4X-Konstrukten erfolgte der Aufschluss mittels Ultraschall. Die periplasmatische Fraktion der pMAL-p4X-Konstrukte wurde durch einen osmotischen Aufschluss gewonnen.

Für den Ultraschallaufschluss wurden die Zellen in 20 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,4 mit 200 mM Natriumchlorid und 1 mM EDTA resuspendiert (10 mL Puffer pro *g* Biofeuchtmasse) und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auf-

tauen in kaltem Wasser wurde die Zellsuspension unter ständiger Eiskühlung 5 x 15 s mittels Ultraschall (Stufe 4) aufgeschlossen. Das Lysat wurde 30 min bei 4 °C und 9.000 g zentrifugiert und der Überstand wurde als Rohextrakt dekantiert.

Für den periplasmatischen Aufschluss wurden die Zellen in 30 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 20% Saccharose (80 mL Puffer pro g Biofeuchtmasse) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,5 M EDTA zu einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Zellsuspension 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 8.000 g und 4 °C 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in eiskalter 5 mM Magnesiumsulfatlösung aufgenommen (80 mL Magnesiumsulfatlösung pro g Biofeuchtmasse) und 10 min in einem Eisbad geschüttelt. Die periplasmatische Fraktion wurde nach Zentrifugation bei 8.000 g und 4 °C für 20 min in Form des Überstands erhalten.

2.4 Kultivierung von *Hansenula polymorpha*

2.4.1 YPD-Medium

Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
Pepton	20 g L ⁻¹
D(+)-Glucose-Monohydrat	22 g L ⁻¹
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.4.2 YPG-Medium für die Expression

Hefeextrakt	10 g L ⁻¹
Pepton	20 g L ⁻¹
Glycerol	20 g L ⁻¹
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.4.3 YPD-Agar

YPD-Medium (s. 2.4.1)	1 L
Agar-Agar	15 g
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

2.4.4 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte auf YPD-Agarplatten (s. 2.4.3). Die Platten wurden 1-2 Tage bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.4.5 Vorkultur

Für die Vorkulturen wurden 500 mL Enghals-Erlenmeyerkolben mit 50 mL YPD-Medium (s. 2.4.1) verwendet, die mit Kolonien von einer YPD-Platte (s. 2.4.3) angeimpft wurden. Die Inkubation erfolgte 16-20 h bei 37 °C und 180 rpm.

2.4.6 Hauptkultur

Für die Hauptkulturen wurden 500 mL Enghals-Erlenmeyerkolben mit 100 mL YPG-Medium (s. 2.4.2) verwendet. Die Vorkultur wurde bei einer OD_{600} zwischen 10 und 15 bei 4 °C und 4.000 rpm (2.559 g) 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 1 mL sterilem Reinstwasser resuspendiert. Das YPG-Medium wurde mit der Menge konzentrierter Zellsuspension inokuliert, die in einer OD_{600} zwischen 0,5 und 1 resultierte. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 25 °C und 180 rpm.

2.4.7 Kulturernte und Zellaufschluss

Am Ende der Kultivierung wurde die OD_{600} mit einer 1:40-Verdünnung der Kulturbrühe bestimmt. Die Zellen wurden bei 4 °C, 4.000 rpm (2.559 g) 10 min abzentrifugiert und in dem Volumen Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5) resuspendiert, das zu einer OD_{600} von 60 führte. In ein 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 500 µL Zellsuspension auf das gleiche Volumen Glasperlen (\emptyset 0,25-

0,5 mm, Roth) gegeben und 15 x 30 s mittels Vortexer aufgeschlossen. Nach Zugabe von weiteren 500 μL Aufschlusspuffer wurde 15 x 15 s gevortext. Der Überstand wurde nach Absinken der Glasperlen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als Gesamtzellextrakt bezeichnet. Während des Zellaufschlusses erfolgte eine ständige Kühlung auf Eis.

2.5 Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehalts

Der Gesamtkohlenhydratgehalt wurde mit dem photometrischen Orcinol-Schwefelsäure-Test bestimmt (Chaplin und Kennedy 2003). Die konzentrierte Schwefelsäure dient dazu, das Glucan in der Probe zu hydrolysieren. Die Hydrolyseprodukte reagieren anschließend mit Orcinol zu gefärbten Verbindungen, die photometrisch analysiert werden. Für die Bestimmung der Cinereanzkonzentration in den Kulturüberständen von *Botrytis cinerea* wurde die Glucose im Medium mittels Dialyse (ZelluTrans, Roth V-Serie, MWCO 1 kDa, Roth) entfernt. 2 g L^{-1} Orcinol wurden in konzentrierter Schwefelsäure gelöst. 200 μL auf Eis gekühlte Probe wurden mit 800 μL auf Eis gekühlter Orcinollösung vermischt und für 15 min auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlung der Proben auf Eis wurden die Extinktionen bei 420 nm gegen Wasser als Referenz bestimmt. Die Regressionsgerade wurde durch die Auftragung der Extinktion_{420nm} von Glucose-Standardlösungen (0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Reinstwasser) gegen den Glucosegehalt erhalten (beispielhaft Abb. 2.1). Die Orcinollösung wurde maximal eine Woche bei 4 °C gelagert.

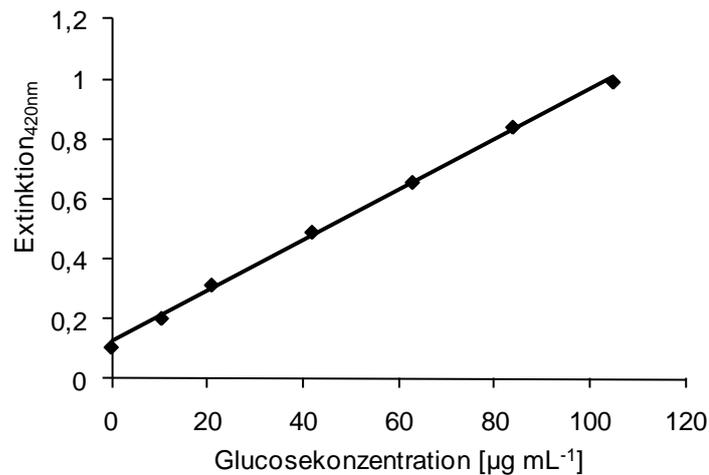


Abb. 2.1: Kalibriergerade Orcinol-Schwefelsäure-Test

$$(y = 0,0084x + 0,1236; R^2 = 0,9983)$$

2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die kommerziell erhältliche Lösung Roti-Nanoquant verwendet, die auf einer Modifikation der Proteinbestimmung nach (Bradford 1976) beruht. 200 μL Probe wurden mit 800 μL Arbeitslösung Roti-Nanoquant (1:5-Verdünnung von Roti-Nanoquant 5x-Konzentrat mit Reinstwasser) versetzt und gemischt. Die Extinktionen wurden bei 590 nm und 450 nm gegen Wasser als Referenz bestimmt. Die Regressionsgerade wurde durch die Auftragung des Quotienten $\text{Extinktion}_{590\text{nm}/450\text{nm}}$ von BSA-Standardlösungen in Reinstwasser (0-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) gegen den Proteingehalt erhalten (beispielhaft Abb. 2.2). Für Proben, die Citrat-Phosphat-Puffer enthielten (s. 2.7), wurde für die BSA-Standardlösungen statt Reinstwasser ebenfalls dieser Puffer verwendet.

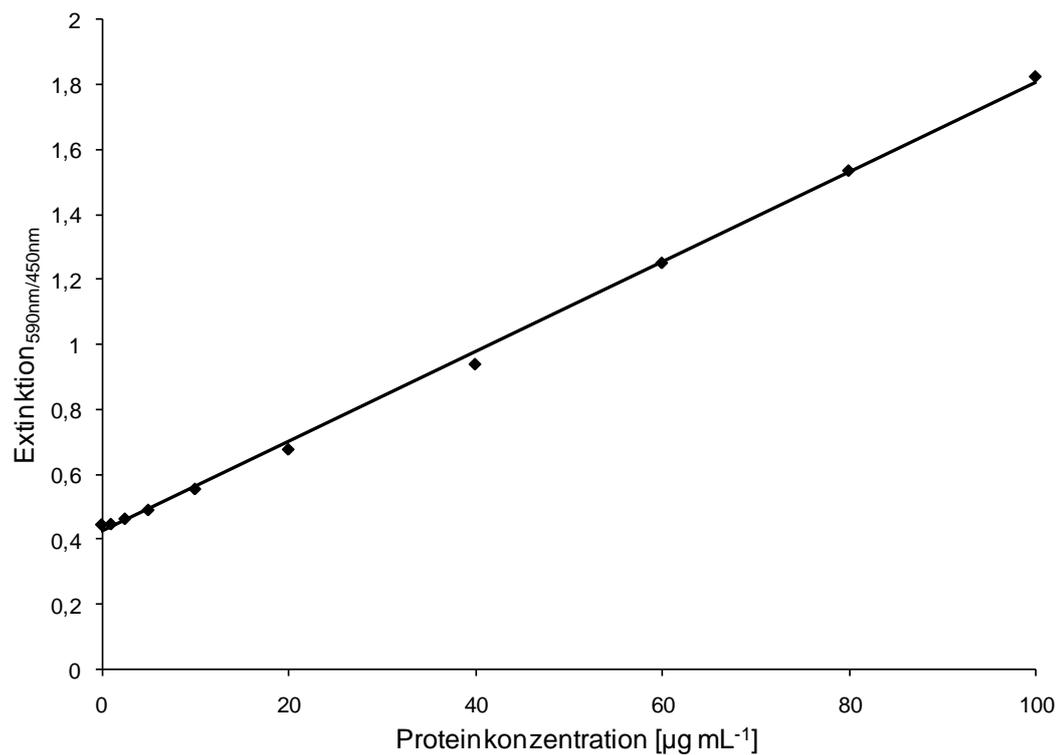


Abb. 2.2: Kalibriergerade Proteinbestimmung nach Bradford

$$(y = 0,0138x + 0,4224; R^2 = 0,9987)$$

2.7 Citrat-Phosphat-Puffer

Für die Herstellung des Citrat-Phosphat-Puffers wurden je nach gewünschtem pH-Wert 0,1 M Citronensäure und 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat in unterschiedlichen Anteilen gemischt. Aus dem Mischungsverhältnis resultierten die Konzentrationen an Citronensäure und Dinatriumhydrogenphosphat in den entsprechenden Pufferlösungen (Tab. 2.4). Die Konzentration der Pufferlösung wurde durch Verdünnen mit VE-Wasser eingestellt.

Tab. 2.4: Citrat-Phosphat-Puffer

pH	Citronensäure (0,1 M)		Dinatriumhydrogenphosphat (0,2 M)	
	Volumen [mL]	Konzentration [mM]	Volumen [mL]	Konzentration [mM]
3,0	80,30	80	19,70	39
4,0	62,00	62	38,00	76
4,5	55,05	55	44,95	90
5,0	49,00	49	51,00	102
5,5	43,45	43	56,55	113
6,0	37,40	37	62,60	125

2.8 Enzymassays

2.8.1 Stammscreening – Bestimmung der Endo- β -Glucanaseaktivität

Die Kulturüberstände des Stammscreenings (s. 2.2.13) wurden auf Endo- β -Glucanaseaktivität untersucht. Als Enzymsubstrat wurde das unlösliche Laminarin azur verwendet. Laminarin ist ein β -1,3-1,6-D-Glucan aus der Braunalge *Laminaria digitata* und in diesem Fall kovalent mit dem blauen Farbstoff Remazol Brilliantblau R verknüpft. Die durch Endo- β -Glucanaseaktivität gebildeten blauen Abbauprodukte wurden photometrisch quantifiziert (Sigma-Aldrich 1997).

Inkubationsansatz

Laminarin azur	4,5 mg
0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5,0	135 μ L
Probelösung	15 μ L

Inkubation 40 h bei 37 °C

96% EtOH	900 μ L
----------	-------------

Mischen

Zentrifugieren 15 min bei 14.000 rpm (14.565 g)

Photometrische Messung des dekantierten Überstands bei 595 nm

Blindprobe: entsprechende Inkubation und Messung von hitzeinaktivierten Kulturüberständen (15 min kochen im 1,5 mL Reaktionsgefäß)

Die Enzymaktivität E_A wurde nach folgender Gleichung berechnet, wobei 1 Unit als die Enzymmenge definiert ist, die pro Stunde bei pH 5,0 und 37 °C eine Extinktionsänderung von 0,01 hervorruft:

$$E_A [\text{U mL}^{-1}] = \frac{(E_{595 \text{ nm, Probe}} - E_{595 \text{ nm, Blindprobe}})}{t \cdot \Delta E \cdot V}$$

E: Extinktion

t: Inkubationszeit [h]

ΔE : Extinktionsdifferenz

V: Volumen der Probelösung [mL]

2.8.2 Reagenzien für den Nelson-Somogyi-Test

Reagenz A

20 g Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat und 30 g Natriumcarbonat wurden in ca. 300 mL Reinstwasser gelöst. Anschließend wurden 20 g Natriumhydrogencarbonat hinzugegeben. In einem weiteren Gefäß wurden 180 g Natriumsulfat in 500 mL kochendem Reinstwasser gelöst. Nach Abkühlung wurden beide Lösungen gemischt und mit Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt.

Reagenz B

5 g Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat und 45 g Natriumsulfat wurden in 250 mL Reinstwasser gelöst.

Reagenz C

Reagenz A und B wurden im Volumenverhältnis 4:1 direkt vor Gebrauch gemischt.

Reagenz D

2,5 g Diammoniummolybdat wurden in 45 mL Reinstwasser gelöst. Unter Rühren wurden vorsichtig 2,1 mL konz. Schwefelsäure dazugegeben. 0,3 g Dinatriumarsenat-Heptahydrat wurden in 2,5 mL VE-Wasser gelöst und mit der Diammoniummolybdat-Lösung gemischt. Diese Lösung wurde für 24 bis 28 h bei 37 °C inkubiert und in einer braunen Glasflasche gelagert. Direkt vor Gebrauch wurde dieses Reagenz 1:2 mit einer 0,75 M Schwefelsäure verdünnt.

Die Reagenzien in ihrer konzentrierten unvermischten Form sind stabil (Chaplin und Kennedy 2003).

2.8.3 Bestimmung der Gesamtglucanaseaktivität

Die Bestimmung der Enzymaktivität beruht auf einem Inkubationsansatz bestehend aus dem löslichen Substrat Laminarin (β -1,3-1,6-D-Glucan aus der Braunalge *Laminaria digitata*) und der zu untersuchenden Enzymlösung (Sigma-Aldrich 1995). Die durch die Glucanaseaktivität gebildeten reduzierenden Zucker wurden mittels Nelson-Somogyi-Test photometrisch quantifiziert (Chaplin und Kennedy 2003). Da sowohl von Endo- als auch von Exo-Glucanasen reduzierende Zucker gebildet werden, wurde mit Hilfe dieser Methode die Gesamtglucanaseaktivität bestimmt.

Inkubationsansatz

Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 (s. 2.7)	37,5 μ L
2,5%ige Laminarinlösung (m/v)	12,5 μ L
Inkubation 5 min bei 60 °C	
Probelösung	12,5 μ L
Inkubation 15 min bei 60 °C	

Nelson-Somogyi-Test

Reagenz C (s. 2.8.2)	200 μL
Wasser	180 μL
Inkubationsansatz	20 μL

Kochen 15 min

Auf Eis auf Raumtemperatur abkühlen

Reagenz D (s. 2.8.2)	200 μL
Reinstwasser	600 μL

Photometrische Messung bei 520 nm

Blindprobe: entsprechende Inkubation und Messung von hitzeinaktivierten Kulturüberständen (15 min kochen im 1,5 mL Reaktionsgefäß)

Kalibrierkurve mittels Glucose-Standardlösungen gegen Wasser als Referenz (10-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Glucose in Reinstwasser, beispielhaft Abb. 2.3)

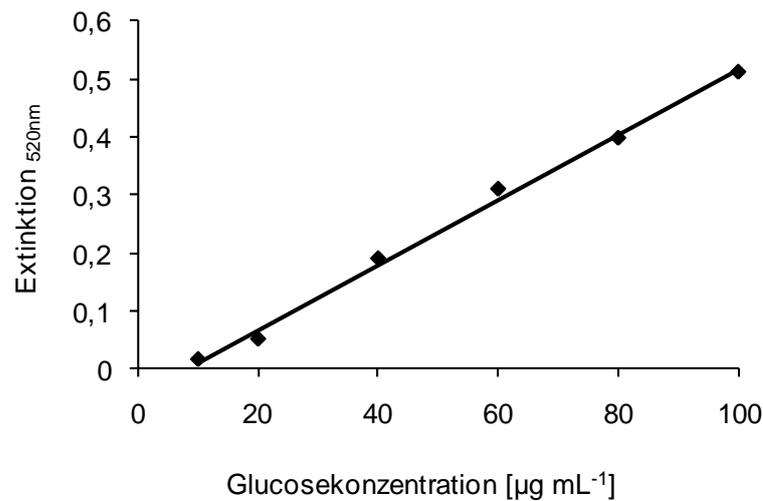


Abb. 2.3: Kalibriergerade Nelson-Somogyi-Test

$$(y = 0,0056x - 0,0445; R^2 = 0,996)$$

Die Enzymaktivität E_A wurde nach folgender Gleichung berechnet, wobei 1 Unit als die Enzymmenge definiert ist, die pro Minute aus Laminarin bei pH 5,0 und 60 °C 1 μ mol reduzierende Zucker (Glucoseäquivalent) freisetzt:

$$E_A [\text{U mL}^{-1}] = \frac{c_{\text{red. Zucker}} \cdot V_1 \cdot V_2}{t \cdot V_3 \cdot V_4} \cdot \frac{1}{M_{\text{Glucose}}}$$

$c_{\text{red. Zucker}}$: Konzentration reduzierender Zucker [mg L^{-1}]

V_1 : Gesamtvolumen für den photometrischen Test [mL]

V_2 : Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes [mL]

t : Inkubationszeit [min]

V_3 : Volumen der Probelösung [mL]

V_4 : Volumen des Inkubationsansatzes im photometrischen Test [mL]

M_{Glucose} : Molekulargewicht von Glucose [g mol^{-1}]

2.8.3.1 pH-Optimum

Abweichend von 2.8.3 erfolgte die Inkubation mit Kulturüberstand bei 37 °C für 45 min mit den entsprechenden Pufferlösungen (s. 2.7).

2.8.3.2 Temperatur-Optimum

Die Inkubation erfolgte abweichend von 2.8.3 mit Kulturüberstand für 15 min bei pH 5,0 und den gewünschten Temperaturen.

2.8.3.3 Rekombinante Glucanase

Proben mit der rekombinanten Glucanase wurden ergänzend zu 2.8.3 bei weiteren Temperaturen (30 °C, 40 °C), einem anderen pH-Wert (0,05 M Tris-HCl pH 7,5) und zusätzlichen Inkubationszeiten (30 min, 60 min, 120 min) untersucht.

2.8.4 Spaltpmuster Endo-/Exo-1,3- β -Glucanasen

Die spezifischen Spaltpmuster von Endo- und Exo-1,3- β -Glucanasen bei der Inkubation mit Laminarin wurden mittels SEC-ELSD analysiert. Für die Probelösung wurden die Enzympräparate (Tab. 2.5) bzw. der Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium* (s. 2.2.16) in 1:10 verdünntem Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 (s. 2.7) verdünnt, um die Glucanaseaktivität (s. 2.8.3) auf 0,5 U pro Reaktionsansatz von insgesamt 500 μ L einzustellen. Die Reaktion bei 40 °C im Wasserbad wurde durch Zugabe von 100 μ L Laminarinlösung (2,5% m/v) gestartet und nach 0 min, 30 min, 1 h bzw. 3 h durch 15-minütiges Kochen gestoppt. Für die Blindprobe bei den Inkubationszeiten 30 min bis 3 h wurde eine durch 15-minütiges Kochen inaktivierte Probelösung eingesetzt.

Tab. 2.5: Enzympräparate; *) enthält eine Exo-1,3- β - und eine Exo-1,6- β -Glucosidase

Enzympräparat	Bezugsquelle
Exoglucanase aus <i>Penicillium funiculosum</i> , Emersfermentation*	Erbslöh Geisenheim, Geisenheim
Exoglucanase aus <i>Penicillium funiculosum</i> , Submersfermentation*	Erbslöh Geisenheim
Exoglucanase aus <i>Trichoderma longibrachiatum</i> *	Erbslöh Geisenheim
Exoglucanase aus <i>Trichoderma harzianum</i> mit Pektinase aus <i>Aspergillus niger</i> *	DSM, Heerlen, Niederlande
Exoglucanase aus <i>Trichoderma harzianum</i> * (Glucanex)	Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark
„Endoglucanase“	Prof. Rau, Institut für Biochemie und Biotechnologie, TU Braunschweig
Endoglucanase aus <i>Helix pomatia</i>	Sigma-Aldrich

Alle Reaktionsansätze wurden vor der Analyse 1:5 mit Reinstwasser verdünnt und durch einen 0,45 μ m Spritzenvorsatzfilter filtriert.

2.8.4.1 Größenausschlusschromatographie mit Verdampfungslichtstredetektor (SEC-ELSD)

Gerät:	LaChrom mit quarternärer Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, Interface D-7000 (Merck-Hitachi, Darmstadt)
Detektion:	Verdampfungslichtstredetektor (ELSD) Sedex 55 (Sedere, Alfortville, Frankreich)
Datenaufnahme:	HPLC System Manager HSM Version 4.1 (Merck-Hitachi)
Säule:	PL aquagel-OH 20, 5 μm , 300 mm x 7,5 mm Vorsäule 8 μm , 50 mm x 7,5 mm (Varian Deutschland, Darmstadt)
Injektionsvolumen:	20 μL
Flussrate:	1,0 mL min^{-1}
Detektion:	50 °C, 2 bar Luftdruck
Eluent:	100% Reinstwasser

Für die Kalibrierung der Größenausschluss säule wurden D(+)-Glucose und die Dextran-Standards 1 kDa, 5 kDa und 12 kDa (Sigma-Aldrich) jeweils zweimal mit einer Konzentration von 1 g L^{-1} injiziert. Die Kalibriergerade ergab sich aus einer Auftragung des Logarithmus des Molekulargewichts gegen die Retentionszeit.

2.8.5 Transformation von (+)-Valencen

Die Fähigkeit der rekombinanten Oxygenase, (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton zu transformieren, wurde mittels Gaschromatographie untersucht. Für den Transformationsansatz wurden 500 μL Gesamtzellextrakt (s. 2.4.7), 3 mg Natriumcholat, 2 μL (+)-Valencen sowie 1 mL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 in 4 mL Schraubdeckelgläschen gemischt und 16 Stunden bei 24 °C und 150 rpm inkubiert. In der Positivkontrolle wurden 50 mg Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* und 1,5 mL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 neben 3 mg Natriumcholat und 2 μL (+)-Valencen eingesetzt. Für die Extraktion wurden zu dem Transformationsansatz 100 μL Thymol (37,52 mg Thymol/50 mL Pentan/Diethylether 1:1,12 (v/v)) als interner

Standard und 2 mL Pentan/Diethylether (1:1,12 v/v) gegeben und 10 min bei 24 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 4.000 rpm (2.559 g) zentrifugiert. Die obere organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und gaschromatographisch analysiert (Fraatz 2007).

2.8.5.1 Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID)

Gerät:	Agilent 7890A (Agilent Technologies, Waldbronn)
Injektor:	Agilent 7683B Series Injector (split/splitless), splitless (30 s), 250 °C
Detektion:	Flammenionisationsdetektor (FID), 250 °C, H ₂ 40 mL min ⁻¹ , Luft 400 mL min ⁻¹ , N ₂ 25 mL min ⁻¹
Datenaufnahme:	Chemstation B.04.01 (Agilent Technologies)
Säule:	Carbowax 20M 30 m x 0,25 mm ID, Filmdicke 0,25 µm (Agilent Technologies J&W Scientific)
Injektionsvolumen:	1 µL
Trägergas:	H ₂ , Vordruck 32,331 kPa, Fluss 2 mL min ⁻¹
Temperaturprogramm:	100 °C (2 min), 5 °C min ⁻¹ auf 150 °C (0 min), 3 °C min ⁻¹ auf 200 °C (0 min), 30 °C min ⁻¹ auf 235 °C (10 min)

2.8.6 Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität

Die Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität basiert auf Messung der Extinktion von konjugierten Dienen bei 234 nm, die während der Inkubation von Linolsäure mit dem Enzym über Hydroperoxide gebildet werden. Der Assay wurde nach Daglia *et al.* (2005) durchgeführt. Für die Positivkontrolle wurde eine Lipoxygenase aus Sojabohne (Roth, > 50.000 U mg⁻¹, für die Biochemie) mit einer Aktivität von 100 U mL⁻¹ in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 verwendet. Als Vergleichsprobe wurden 50 mg Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* (s. 2.2.17) und 3 mg Natriumcholat in 1,5 mL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 15 min bei 24 °C und 150 rpm rehydratisiert. Nach Zentrifugation bei 4.000 rpm (2.559 g) für 10 min

wurde der Überstand 1:10 mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5 verdünnt in den Enzymtest eingesetzt. Der Gesamtzellextrakt der rekombinanten Oxygenase (s. 2.4.7) wurde vor der Messung mit 2 mg Natriumcholat versetzt, nochmals 3 x 15 s gevortext und anschließend 2 min bei 4 °C und 14.000 rpm (14.565 g) zentrifugiert.

Stammlösung Substrat

Linolsäure	19 µL
0,01% (v/v) Tween 20	20 µL
Reinstwasser	5 mL
1 M NaOH	500 µL

Arbeitslösung Substrat

Stammlösung Substrat	110 µL
50 mM Tris-HCl pH 7,5	ad 4 mL

Referenz

0,01% (v/v) Tween 20	20 µL
Reinstwasser	5,019 mL
1 M NaOH	500 µL

Die Extinktionszunahme einer linolsäurehaltigen Probelösung wurde bei 234 nm verfolgt. 50 µL Enzymlösung wurden in einer Quarzküvette für 3 min im temperierbaren Küvettenhalter des Photometers auf 25 °C vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 950 µL Arbeitslösung Substrat und guter Durchmischung gestartet. Die Extinktionszunahme wurde über einen Zeitraum von 10 min ermittelt. Die mögliche Bildung von Hydroperoxiden während der Inkubation ohne Enzymzugabe wurde mittels Messung der Blindprobe ermittelt und vom Messergebnis der Probe subtrahiert. Die Blindprobe setzte sich aus 50 µL 50 mM Tris-HCl pH 7,5 und 950 µL Arbeitslösung Substrat zusammen. Alle Messungen von Proben und Blindproben erfolgten gegen die Referenz.

Die Lipoxygenaseaktivität E_A wurde mit folgender Formel berechnet:

$$E_A [\text{U mL}^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot V_g}{V_p \cdot d \cdot \varepsilon} \cdot 1000$$

ΔE : Extinktionszunahme [min^{-1}]

V_g : Gesamtvolumen in der Küvette [mL]

V_p : Probevolumen [mL]

d : Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ε : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient von Linolsäurehydroperoxiden
(25.000 L mol⁻¹cm⁻¹)

2.9 Konzentrierung und Umpufferung

Für Konzentrierung und Umpufferung wurden Macrosep-Zentrifugations-einheiten mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet (Pall, Dreieich). Sie wurden vor der ersten Verwendung 3 x mit VE-Wasser gespült. Die Einheiten wurden bei 4.000 rpm (2.559 g) und 4 °C zentrifugiert.

2.10 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Gerät: BioLogic DuoFlow (BioRad, München)

Detektion: Extinktionsmessung bei 280 nm

Fraktionssammler: BioLogic BioFrac fraction collector (BioRad)

Datenaufnahme: BioLogic DuoFlow Version 5.10 (BioRad)

2.10.1 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Die GFC wurde für die Reinigung und die Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* eingesetzt.

Für die Reinigung wurde der Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium* konzentriert und auf den Elutionspuffer gepuffert (s. 2.9).

Säule:	Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, München)
Säulenmaterial:	Superdex 200 (Trennbereich 10-600 kDa)
Säulenvolumen:	24 mL
Probenschleife:	100 µL
Flussrate:	0,5 mL min ⁻¹
Fraktionsgröße:	2 mL
Elutionspuffer:	49 mM Citronensäure/102 mM Dinatriumhydrogenphosphat pH 5,0

Methode:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Autozero
- 3) Injektion der Probe; Spülen der Probenschleife mit 0,8 mL Elutionspuffer
- 4) Elutionspuffer, 30 mL

Die Bestimmung der Glucanaseaktivität (s. 2.8.3) erfolgte mit allen gesammelten Fraktionen. Die aktiven Fraktionen wurden gegebenenfalls gepoolt, konzentriert (s. 2.9) und bei 4 °C gelagert.

Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurden Proteinmolekulargewichtsstandards (Serva, Heidelberg) in Konzentrationen von 5 mg mL⁻¹ bzw. Thyroglobulin mit 8 mg mL⁻¹ (Sigma-Aldrich) jeweils im Elutionspuffer gelöst und injiziert. Die Retentionskoeffizienten K_{av} der Standardproteine mit

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

V_e : Elutionsvolumen des Referenzproteins [mL]

V_0 : Ausschlussvolumen [mL]

V_t : Gesamtvolumen der Säule [mL]

wurden gegen die Logarithmen der Molekulargewichte aufgetragen. Die Kalibriergerade wurde mittels linearer Regression erstellt. Die Bestimmung des Ausschlussvolumens erfolgte mit dem Standardprotein Thyroglobulin. Ein Teil dieses Proteins eluiert mit einem Molekulargewicht von 1.338 kDa als Dimer von der Säule. Dieses Molekulargewicht liegt außerhalb des Trennbereichs der Säule (Trennbereich: 10-600 kDa). Das Elutionsvolumen des Dimers entspricht somit dem Ausschlussvolumen der Superdex 200-Säule (Scheibner 2006).

2.10.2 Affinitätschromatographie mittels Amylosesäule

Die Amylosesäule wurde manuell zur Reinigung der rekombinanten Endo- β -Glucanase eingesetzt. Das Amyloseharz mit einer Bindungskapazität von mindestens 3 mg mL⁻¹ Bettvolumen wurde in eine Säule mit einem Volumen von 13,5 mL blasenfrei unter 20%igem Ethanol gegossen, das Bettvolumen betrug ca. 8 mL. Die Säule wurde mit 8 Säulenvolumen Säulenpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4 mit 200 mM Natriumchlorid und 1 mM EDTA) gewaschen. Der Rohextrakt des Ultraschallaufschlusses (s. 2.3.11) wurde vor Probenaufgabe 1:5 mit dem Säulenpuffer verdünnt. Zu der periplasmatischen Fraktion (s. 2.3.11) wurde vor Probenaufgabe 1/50 des Volumens an Säulenpuffer gegeben. Nach Probenaufgabe wurde die Säule mit 12 Säulenvolumen Säulenpuffer gespült. Die Elution des Maltosebindepoteins erfolgte mit Säulenpuffer, der 10 mM Maltose enthielt. Während der Elution wurden Fraktionen à 3 mL gesammelt. Protein enthaltende (s. 2.6) Fraktionen wurden gepoolt und konzentriert (s. 2.9).

2.10.3 Affinitätschromatographie mittels Benzamidinsäule

Zur Abtrennung der Peptidase Faktor Xa nach Abspaltung des Maltosebindepoteins von der rekombinanten Endo- β -Glucanase wurde eine Benzamidinsäule verwendet. Die Probelösung wurde vor Säulenaufgabe auf den Bindungs- und Waschpuffer gepuffert (s. 2.9).

Säule:	HiTrap Benzamide FF (high sub) (GE Healthcare)
Säulenmaterial:	Benzamidin Sepharose 4 Fast Flow (high sub)
Säulenvolumen:	1 mL
Probenschleife:	1 mL
Flussrate:	1 mL min ⁻¹
Fraktionsgröße:	4 mL (Beginn bei 5,0 mL, Ende bei 17,5 mL)
Bindungs- und Waschpuffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,4 mit 500 mM Natriumchlorid
Elutionspuffer:	50 mM Glycin pH 3,0

Methode:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Bindungs- und Waschpuffer, 5,0 mL
- 3) Autozero
- 4) Injektion der Probe; Spülen der Probenschleife mit 2,5 mL Elutionspuffer
- 5) Bindungs- und Waschpuffer, 10,0 mL
- 6) Elutionspuffer, 5,0 mL

Die Fraktionen wurden gepoolt, konzentriert und auf Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 (s. 2.7) umgepuffert (s. 2.9). Anschließend erfolgte die Bestimmung der Gesamtglucanaseaktivität (s. 2.8.3).

2.11 Elektrophorese

2.11.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) mit dem PerfectBlue Twin S-System von Peqlab und den folgenden Lösungen durchgeführt.

Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS-Lösung)

APS 400 g

Reinstwasser ad 1 L

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

Lower Tris

Tris 181,7 g

SDS 4,0 g

Reinstwasser ad 1 L

Einstellen auf pH 8,8 mit HCl

Upper Tris

Tris 60,55 g

SDS 4,00 g

Reinstwasser ad 1 L

Einstellen auf pH 6,8 mit HCl

10x Laufpuffer

Tris 30,2 g

Glycin 144,2 g

SDS 10,0 g

VE-Wasser ad 1 L

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

Probenauftragspuffer

1 M Tris-HCl, pH 6,8 1,0 mL

20%ige SDS-Lösung (w/v) 2,0 mL

Bromphenolblau 20 mg

Glycerol 2,3 mL

VE-Wasser ad 8,0 mL

Die Gesamtkonzentration von Acrylamid und Bisacrylamid betrug im Trenngel 10% bzw. 12% und im Sammelgel 6% (Tab. 2.6). Die Konzentration von Bisacrylamid in der Gesamtkonzentration (Crosslinker-Konzentration) betrug in den Gelen 2,6%.

Tab. 2.6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Sammelgel 6%
Reinstwasser	3,0 mL	2,7 mL	1,8 mL
Lower Tris	1,5 mL	1,5 mL	-
Upper Tris	-	-	750,0 μ L
Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)	1,5 mL	1,8 mL	450,0 μ L
APS-Lösung	15,0 μ L	15,0 μ L	10,0 μ L
TEMED	7,5 μ L	7,5 μ L	4,0 μ L

Probenvorbereitung

15 μ L Probe wurden mit 12 μ L Probenauftragspuffer versetzt, 5 min gekocht und anschließend auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 3 μ L einer 1 M DTT-Lösung wurden abhängig vom Proteingehalt der Probe 10-30 μ L in eine Geltasche gegeben.

Elektrophorese

Die Pufferkammer wurde mit 1x Laufpuffer gefüllt, so dass die Geltaschen mit Puffer bedeckt waren. Nach der Gelbeladung wurde für die Fokussierung der Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel eine Stromstärke von 10 mA pro Gel angelegt. Anschließend wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald das Bromphenolblau des Probenauftragspuffers aus dem Gel hinauslief.

Bestimmung des Molekulargewichts

Die Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-PAGE erfolgte anhand eines Proteinstandards (5 μ L, Roti-Mark Standard, Roth bzw. PageRuler unstained protein ladder, Fermentas, St. Leon-Rot bzw. für anschließenden

Western Blot PageRuler Plus prestained protein ladder, Fermentas). Die Logarithmen der Molekulargewichte der Standardproteine wurden gegen ihre Laufstrecke aufgetragen. Anhand der Regressionsgeraden wurde das Molekulargewicht der Zielproteine ermittelt.

2.11.2 Halbnative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die halbnative SDS-PAGE wurde analog 2.11.1 mit den folgenden Änderungen durchgeführt:

1. Zubereitung 10x Laufpuffer und Probenauftragspuffer mit der Hälfte an SDS (5 g L^{-1} SDS bzw. 1 mL 20%ige SDS-Lösung)
2. Probenvorbereitung ohne Aufkochen und Zusatz von DTT-Lösung
3. Elektrophorese bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$

2.11.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Für die isoelektrische Fokussierung wurden Polyacrylamidgele mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3-10) und einer Schichtdicke von $150 \text{ }\mu\text{m}$ verwendet (Serva). Die Vorbereitung der IEF-Gele erfolgte gemäß Herstellerangaben. Auf das Gel wurden pro Tasche $10 \text{ }\mu\text{L}$ Probe aufgetragen. Zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts wurden auf die IEF-Gele $5 \text{ }\mu\text{L}$ eines Proteinstandards (Protein test mixture for pI-determination, pH 3-10, Serva Electrophoresis, Heidelberg) aufgetragen. Die isoelektrischen Punkte der Standardproteine wurden gegen ihre Laufstrecke aufgetragen. Mit Hilfe der daraus resultierenden Regressionsgeraden wurden die isoelektrischen Punkte der Zielproteine abgeschätzt.

Elektrophoresebedingungen, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$:

1. 500 V , 1 mA , 3 W , 500 Vh – Entsalzung
2. 2.000 V , 2 mA , 4 W , 5.000 Vh – Trennung

2.11.4 Coomassiefärbung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 1 h unter leichtem Schütteln in einer Lösung aus 40% Ethanol, 10% konz. Essigsäure und 290 mg L^{-1} Coomassie Brilliant Blue R fixiert und gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit einer Lösung aus 25% Ethanol und 8% konz. Essigsäure entfärbt. Das gefärbte Gel wurde zur Dokumentation eingescannt.

2.11.5 Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurden die folgenden Lösungen verwendet (modifiziert nach Blum *et al.* (1987)):

Lösung I

Methanol	50%
Essigsäure konz.	10%
Formaldehyd (37%ig)	$0,5 \text{ mL L}^{-1}$

Lösung II

Ethanol	30%
---------	-----

Lösung III

Natriumthiosulfat-Pentahydrat	$0,2 \text{ g L}^{-1}$
-------------------------------	------------------------

Lösung IV

Silbernitrat	$2,0 \text{ g L}^{-1}$
Formaldehyd (37%ig)	$750 \text{ } \mu\text{L L}^{-1}$

Lösung V

Natriumcarbonat	$60,0 \text{ g L}^{-1}$
Formaldehyd (37%ig)	$0,5 \text{ mL L}^{-1}$
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	$1,0 \text{ mg L}^{-1}$

Lösung VI

Methanol	10%
Essigsäure konz.	12%

Die Lösungen III, IV und V wurden jeweils frisch hergestellt.

Färbung

- 1) Gel 20 min in Lösung I fixieren
- 2) 2 x 10 min in Lösung II waschen
- 3) 1 min in Lösung III inkubieren
- 4) 3 x 20 s mit VE-Wasser waschen
- 5) 20 min in Lösung IV inkubieren
- 6) 2 x 20 s mit VE-Wasser waschen
- 7) Gel in Lösung V entwickeln, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind
- 8) 15 min in Lösung VI fixieren
- 9) 3 x 5 min mit VE-Wasser waschen

Das gefärbte Gel wurde zur Dokumentation eingescannt.

2.11.6 Aktivitätsfärbung

Zur Identifizierung der Glucanasen wurde ein halbnatives SDS- oder ein IEF-Gel geteilt und mit einem Teil eine Aktivitätsfärbung durchgeführt. Die andere Gelhälfte wurde mit Coomassie oder Silber gefärbt. Parallel zu den gefärbten Banden wurden aus dem ungefärbten Gel Banden ausgeschnitten und entsprechend 2.8.3 inkubiert. Zum qualitativen Nachweis gebildeter reduzierender Zucker wurden abweichend von 2.8.3 direkt zum Inkubationsansatz 50 µL Reagenz C gegeben, ebenfalls 15 min gekocht und anschließend mit 50 µL Reagenz D sowie 150 µL Wasser versetzt. Vorhandene Aktivität wurde durch blaue Färbung sichtbar.

2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Folgende Lösungen wurden für die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt.

50x TAE-Puffer

Tris	242 g L ⁻¹
Essigsäure, konz.	57,1 mL L ⁻¹
0,5 M EDTA, pH 8	100,0 mL L ⁻¹

Der 50x TAE-Puffer wurde vor der Verwendung 1:50 mit VE-Wasser verdünnt (1x TAE-Puffer).

6x Auftragspuffer (Sambrook und Russell 2001)

Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
Glycerol	3 mL
VE-Wasser	ad 10 mL

1,0-1,6% Agarose wurden in 1x TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Pro 10 mL Lösung wurden nach Abkühlen auf ca. 60 °C 0,5 µL 1%ige Ethidiumbromidlösung zugegeben. Das Gel wurde in einer Vorrichtung mit eingehängtem Kamm gegossen. PCR-Proben mit dem CoralLoad PCR-Puffer wurden direkt auf das Gel aufgetragen, sonstige vor der Auftragung im Verhältnis Probe/Puffer 5:1 mit dem 6x Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Gelgröße bei 80-140 V, indem die Gelvorrichtung horizontal in eine Elektrophoresekammer gehängt wurde, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt war. Die Fragmentgrößen wurden anhand eines Größenstandards (100 bp DNA extended DNA-Leiter für PCR-Amplifikate, 1 kbp DNA-Leiter für Restriktionsverdau, Roth) abgeschätzt. Zur Geldokumentation wurde eine Anlage der Firma Decon Science Tec verwendet, die mit einem UV-Transilluminator (312 nm), einer Kamera und der Software DeVision G Vers. 2.0 ausgestattet war.

2.13 cDNA-Synthese

2.13.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte aus Myzel von *Phanerochaete chrysosporium* bzw. *Pleurotus sapidus*, das am Tag maximaler Glucanaseaktivität ($8,4 \text{ U mL}^{-1}$) bzw. maximaler Produktausbeute (Nootkatonkonzentration 53 mg L^{-1}) nach Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton geerntet wurde. Für die Isolierung wurden ca. 100 mg Myzel mit flüssigem Stickstoff gefroren und mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden, Handbuch 04/2006) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Für das Myzel von *Phanerochaete chrysosporium* wurde zum Aufschluss der Puffer RLC verwendet, für das Myzel von *Pleurotus sapidus* der Puffer RLT.

2.13.2 Überprüfung der RNA-Qualität

Für die Überprüfung der RNA-Qualität wurden $7,5 \text{ }\mu\text{L}$ RNA mit $1,5 \text{ }\mu\text{L}$ 6x Auftragspuffer versetzt und auf einem 1%igem Agarosegel einer Elektrophorese unterworfen (s. 2.12). Im Falle der RNA aus *Pleurotus sapidus* wurde durch den industriellen Kooperationspartner N-Zyme, Darmstadt, ergänzend eine Kapillargelelektrophorese mittels RNA 6000 LabChip Kit und Bioanalyzer 2100 (Agilent) durchgeführt.

2.13.3 Erststrangsynthese

Die Erststrangsynthese wurde mittels SMART PCR cDNA Synthesis Kit durchgeführt (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich, Protokoll PT3041-1, Version PR762287). Von *Phanerochaete chrysosporium* wurden $3 \text{ }\mu\text{L}$ RNA eingesetzt, von *Pleurotus sapidus* $0,75 \text{ }\mu\text{L}$ (s. 2.13.1). Anstelle der MMLV reversen Transkriptase wurde abweichend vom Protokoll die SuperScript II bzw. SuperScript III reverse Transkriptase (Invitrogen) mit dem dazugehörigen Arbeitspuffer verwendet.

2.13.4 LD-PCR

Die Amplifizierung der cDNA mittels LD-PCR erfolgte ebenfalls mittels SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Protokoll PT3041-1, Version PR762287).

Cyclerprogramm

Lid: 105 °C

95 °C 1 min

22 Zyklen (*Phanerochaete chrysosporium*) bzw. 20 Zyklen (*Pleurotus sapidus*):

95 °C 15 s

65 °C 30 s

68 °C 6 min

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

2.14 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurde der peqGOLD Fungal DNA Mini Kit genutzt (Peqlab, Erlangen, Handbuch V.07.06). 100 mg Myzel von *Phanerochaete chrysosporium* wurden mit flüssigem Stickstoff gefroren und unter Zugabe von 600 µL FG1-Puffer sowie 10 µL β -Mercaptoethanol gemörsert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden gemäß Handbuch durchgeführt. Die DNA-haltige Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.15 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.15.1 PCR

Die Amplifizierung gewünschter DNA-Abschnitte zwischen zwei Oligonukleotidprimern erfolgte mittels PCR. Die Primer wurden so kombiniert, dass die Schmelztemperatur (T_M) maximal um 2 °C variierte.

Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte anhand der 2 °C + 4 °C-Regel:

$$T_M = N \times [\text{GC}] \times 4 \text{ °C} + N \times [\text{AT}] \times 2 \text{ °C} \text{ mit } N = \text{Anzahl der Basen}$$

Die Elongationszeit wurde an die erwartete Fragmentlänge angepasst (Geschwindigkeit Taq: 1.000 bp min⁻¹).

PCR-Ansatz

Template	0,30 µL
dNTPs (je 10 mM)	0,60 µL
10x CoralLoad PCR-Puffer	3,00 µL
Primer a (10 µM)	1,20 µL
Primer b (10 µM)	1,20 µL
HotStarTaq Plus (5 U µL ⁻¹)	0,15 µL
Reinstwasser	ad 30,00 µL

Cyclerprogramm

Lid: 105 °C

95 °C 5 min

40 Zyklen:

 95 °C 60 s

 x - 5 °C 60 s

 72 °C 30-90 s

72 °C 5 min

4 °C halten

Mit x = Mittelwert der Schmelztemperaturen der Primer [°C]

2.15.2 Kolonie-PCR

Nach Ligation eines Fragmentes in den TA-Vektor (s. 2.17.2) und Transformation in *E. coli* (s. 2.17.3) wurde mittels Kolonie-PCR die Insertion des Vektors in die Zellen überprüft. Die PCR erfolgte mit M13-Primern (Vektorsequenz) und

einer an die Amplifikatlänge von Fragment und M13-Flankierung angepassten Elongationszeit. Als Template wurden Zellen von *E. coli* aus einer einzelnen Kolonie „gepickt“ und im PCR-Ansatz suspendiert.

PCR-Ansatz

Template	Zellen von <i>E. coli</i>
dNTPs (je 10 mM)	0,4 µL
10x CoralLoad PCR-Puffer	2,0 µL
M13-Primer a (10 µM)	1,0 µL
M13-Primer b (10 µM)	1,0 µL
HotStarTaq Plus (5 U µL ⁻¹)	0,2 µL
Reinstwasser	ad 20,0 µL

Cyclerprogramm

Lid: 105 °C

95 °C 5 min

40 Zyklen:

 95 °C 1 min

 45 °C 1 min

 72 °C 1-2 min

72 °C 5 min

4 °C halten

2.16 DNA-Fragmentisolierung

Die PCR-Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt und die relevanten DNA-Fragmente wurden aus dem Gel geschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben (Qiagen, Handbuch 03/2006). Für die Elution wurden 30 µL Reinstwasser verwendet.

2.17 Gentransfer

2.17.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden folgende Lösungen verwendet.

Lösung 1

Calciumchlorid-Dihydrat	1,47 g
Tris-HCl	0,03 g
VE-Wasser	ad 100 mL

Einstellen auf pH 7,4 mit 1 M NaOH
Autoklavieren (121 °C, 20 min)

Lösung 2

Calciumchlorid-Dihydrat	1,47 g
Tris-HCl	0,03 g
Glycerol	10 mL
VE-Wasser	ad 100 mL

Einstellen auf pH 7,4 mit 1 M NaOH
Autoklavieren (121 °C, 20 min)

20 mL LB-Medium (s. 2.3.1) in einem 100 mL Enghals-Erlenmyerkolben wurden mit einer einzelnen Kolonie des entsprechenden *E. coli*-Stamms von einer frisch ausgestrichenen LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. 200 mL LB-Medium in einem 500 mL Enghals-Erlenmeyerkolben wurden mit dieser Übernachtskultur beimpft, so dass ein OD₆₀₀-Wert von 0,05 eingestellt war. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 225 rpm bis eine OD₆₀₀ von 0,8-0,9 erreicht war. Die Kultur wurde in sterile Falcon Tubes gefüllt und für 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen bei 4.000 rpm (2.559 g) und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden vorsichtig in 5% des ursprünglichen Volumens eisgekühlter Lösung 1 resuspendiert. Die Zellen wurden bei 4.000 rpm (2.559 g) und 4 °C abzen-

trifugiert und vorsichtig in 5% des ursprünglichen Volumens eisgekühlter Lösung 2 resuspendiert. Aliquots von 50 μL wurden in vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.17.2 Ligation mittels TA-Cloning

Die Ligation von frisch isolierten DNA-Fragmenten (s. 2.16) in den pCR2.1-Vektor erfolgte mittels TA Cloning Kit (Invitrogen, Handbuch Version V, 7. April 2004, 25-0024).

Ligationsansatz

DNA-Fragment (s. 2.16)	6 μL
10x Ligationspuffer	1 μL
pCR2.1-Vektor	2 μL
T4 DNA Ligase (4 Weiss Units)	1 μL

Die Ligation erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Ansätze wurden anschließend für die Transformation (s. 2.17.3) verwendet bzw. bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.17.3 Transformation in *E. coli* TOP10

50 μL der chemisch kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 2 μL eines Ligationsansatzes vermischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad für 1 min bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Zu den Zellen wurden 150 μL LB-Medium (s. 2.3.1) gegeben und für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 225 rpm inkubiert. 170 μL dieses Transformationsansatzes wurden auf LB_{amp}-Platten (s. 2.3.5) ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

2.17.4 Blau/Weiß-Screening

Zur Identifizierung positiver Transformanten wurde das Blau/Weiß-Screening eingesetzt. Dazu wurden LB_{amp}-Platten auf Raumtemperatur mit 40 μL X- β -Gal-

Lösung (40 mg mL⁻¹ in DMF) versetzt, die transformierten Zellen (s. 2.17.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positive Transformanten blieben weiß, weil das LacZ'-Gen im pCR2.1-Vektor durch ein Insert in der „multiple cloning site“ unterbrochen war und somit keine β -Galaktosidase-Aktivität zeigten. Transformanten mit pCR2.1-Vektor ohne Insert waren dagegen aufgrund der Expression des LacZ'-Gens blau gefärbt.

2.17.5 Plasmidisolierung

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Übernachtskulturen (s. 2.3.8) erfolgte mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) und nach Herstellerprotokoll (QIAprep Miniprep Handbuch 12/2006). Für die Elution der Plasmid-DNA wurden 60 μ L Reinstwasser verwendet.

2.17.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von jeweils 15 μ L der isolierten Plasmid-DNA (s. 2.17.5) wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt und erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Chromas Lite 2.01, mit dessen Hilfe die Vektorsequenzen aus den Sequenzen entfernt wurden. Mit den so bereinigten Sequenzen wurde anschließend eine Datenbankrecherche beim European Bioinformatics Institute (EBI-EMBL) mittels BLAST- und FASTA-Algorithmus durchgeführt.

2.18 Heterologe Expression

Für die heterologe Expression wurden synthetische Gene verwendet, die an die Codon Usage des Expressionsorganismus angepasst waren und die für die Klonierung notwendigen Schnittstellen besaßen (Geneart, Regensburg). Die Endo- β -Glucanase wurde mittels pMAL Protein Fusion and Purification System nach Herstellerangaben in *E. coli* K12 TB1 exprimiert (New England BioLabs, Frankfurt a. M., Handbuch Version 5.3, 11/07). Die Klonierung der Oxygenase in

die Expressionsvektoren pFPMT bzw. pFPMT6His und pFPMT-MF bzw. pFPMT-MF6His sowie das Produktscreening von *Hansenula polymorpha*- und *Arxula adenivorans*-Transformanten wurde von Artes Biotechnology (Langenfeld) durchgeführt.

2.18.1 Restriktionsverdau

Das synthetische Gen der Endo- β -Glucanase ($0,1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) und die Vektoren pMAL-c4X und pMAL-p4X ($200 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) wurden jeweils mit zwei Restriktionsenzymen verdaut (Fermentas).

Verdauansatz

Vektor bzw. Insert	5 μL
HindIII ($10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$)	2 μL
XbaI ($10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$)	1 μL
10x Tangopuffer	2 μL
Reinstwasser	ad 20 μL

Der Verdau erfolgte für 14 h bei 37 °C und die Restriktionsenzyme wurden anschließend bei 80 °C innerhalb von 20 min inaktiviert. Die gewünschten Fragmente wurden nach Trennung auf einem 1,2%igem Agarosegel isoliert (s. 2.16) und ligiert (s. 2.18.2).

2.18.2 Ligation von Expressionsvektoren

Das Insert wurde in beide Expressionsvektoren ligiert.

Ligationsansatz

Vektor (s. 2.18.1)	4 μL
Insert (s. 2.18.1)	5 μL
T4 DNA Ligase (4 Weiss Units)	1 μL
10x Ligationspuffer	2 μL
Reinstwasser	ad 20 μL

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einem Wasserbad. Die Ansätze wurden anschließend für die Transformation (s. 2.17.3) verwendet bzw. bei -20 °C gelagert.

2.18.3 Transformation in *E. coli* K12 TB1

50 µL der chemisch kompetenten *E. coli* K12 TB1-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 5 µL eines Ligationsansatzes vermischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Wasserbad für 2 min bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gestellt. Zu den Zellen wurden 100 µL LB-Medium (s. 2.3.1) gegeben und für 1 h bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB_{amp}-Platten (s. 2.3.5) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.18.4 Kolonie-PCR

Die Überprüfung der Transformanten auf Anwesenheit des klonierten Inserts erfolgte mittels Kolonie-PCR. Abweichend von 2.15.2 wurde ein M13-Primer mit einem genspezifischen Primer kombiniert, alles weitere erfolgte analog 2.15.2.

2.19 Western Blot

2.19.1 Antikörper

Antikörper gegen das Maltosebindeprotein stammten aus dem pMAL Protein Fusion and Purification System, das für die heterologe Expression der Endo-β-Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* verwendet wurde. Für die Produktion polyklonaler Antikörper gegen die Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde die Aminosäuresequenz QDAQYYPDDASVAGD als Antigen determinante ausgewählt. Die Synthese des Peptids und die Produktion der Antikörper in Kaninchen wurden von der Firma Biogenes (Berlin) durchgeführt. Ein nach Herstellerangaben durchgeführter ELISA-Test ergab einen IgG-Titer von 1:20.000.

2.19.2 Western Blot

Nach erfolgter SDS-PAGE (s. 2.11.1) wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel mittels Tank-Elektroblotter auf eine PVDF-Membran geblottet. Folgende Lösungen wurden dafür verwendet.

10x Wet Blot Laufpuffer

Glycin	144,13 g
Tris	30,29 g
VE-Wasser	ad 1 L

1x Wet Blot Laufpuffer

10x Wet Blot Laufpuffer	100 mL
MeOH	50 mL
VE-Wasser	ad 1 L

10x TBS-Puffer

Tris-HCl	78,80 g
Natriumchlorid	87,66 g
Reinstwasser	ad 1 L

Einstellen auf pH 7,5 mit 1 M NaOH

1x TBST-Puffer

10x TBS-Puffer	100 mL
Tween 20	1 mL
Milchpulver	50 g
Reinstwasser	ad 1 L

Für den Western Blot wurden PVDF-Membran und Blottingpapier (Whatman, Dassel) auf SDS-Gelgröße zugeschnitten. Die Membran wurde ca. 5 min mit MeOH aktiviert und anschließend mit dem Blottingpapier in dem Wet Blot Laufpuffer (1x) äquilibriert. Der Blot erfolgte für eine Stunde bei einer Spannung von 100 V. Anschließend wurde die Membran über Nacht in TBST-Puffer mit 5%

Milchpulver bei 4 °C inkubiert. Der Enzym-spezifische Antikörper wurde 1:20.000 (Anti-Maltosebindeprotein) bzw. 1:10.000 (Anti-Oxygenase) mit TBST-Puffer und 5% Milchpulver verdünnt und für zwei Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für jeweils 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem zweiten, mit einer Peroxidase gekoppelten Antikörper 1:15.000 in TBST-Puffer verdünnt für eine Stunde unter Schütteln (Goat anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugat, Calbiochem). Nach weiterem dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für jeweils 10 min wurde anschließend 2 min mit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (je 1 mL Luminol und Peroxidaselösung, Millipore, Schwalbach) inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mittels Film (Kodak BioMax XAR, Kodak, Stuttgart) und einer Entwicklermaschine (Canon, Krefeld) innerhalb von 30 min.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion von Cinerean

Im Screening nach Endo- β -Glucanasen diente Cinerean als Kohlenstoffquelle und als Induktor. Da es nicht in hinreichenden Mengen kommerziell verfügbar war, wurde es mit Submerskulturen von *Botrytis cinerea* selbst produziert (s. 2.2.15). Von den beiden getesteten Stämmen 877 und 5145 (DSMZ) erwies sich nur der Stamm 5145 als geeigneter Produzent von Cinerean. Die Kultivierung nach Pielken *et al.* (1990) lieferte nach Ethanolfällung eine Ausbeute von ca. 700 mg L⁻¹ Cinerean. Maximale Konzentrationen wurden dabei am 5. Kulturtag erzielt (Abb. 3.1).

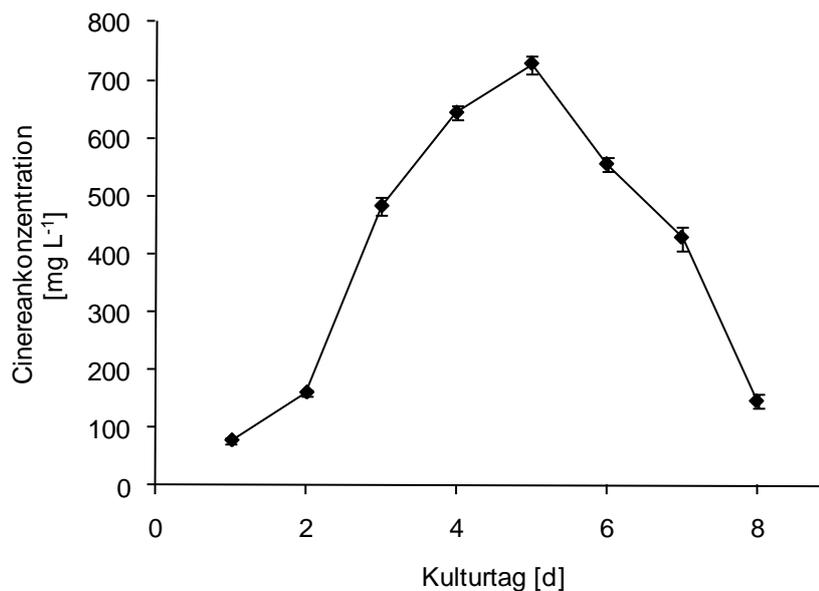


Abb. 3.1: Cinereanbildung in Submerskulturen von *Botrytis cinerea* 5145

Botrytis cinerea 877 bildete unter denselben Bedingungen lediglich 0,8 mg L⁻¹ Cinerean.

Da die Cinereanbildung mit dem Glucoseabbau korreliert (Pielken *et al.* 1990), wurde zur Bestimmung des Erntezeitpunkts ein halbquantitativer Glucosetest

mittels Teststreifen durchgeführt. Bei der maximalen Cinereankonzentration wurde ein Restglucosegehalt von $1,0 \text{ g L}^{-1}$ angezeigt.

3.2 Screening von Basidiomyceten auf β -Glucanaseaktivität

3.2.1 Plattenscreening auf β -Glucanaseaktivität

Ein erstes Plattenscreening von 15 Basidiomyceten wurde von Frau Dr. Diana Linke (Institut für Lebensmittelchemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover) mit dem 1,3-1,6- β -D-Glucan Schizophyllan aus dem Basidiomyceten *Schizophyllum commune* als Kohlenstoffquelle durchgeführt (Tab. 3.1). Das Myzelwachstum wurde im Vergleich zu Referenzplatten ohne Zugabe einer Kohlenstoffquelle beobachtet.

Tab. 3.1: Plattenscreening auf β -1,3-glucanabbauende Basidiomyceten mit Schizophyllan als Kohlenstoffquelle (- kein Wachstum, + Wachstum, ++ starkes Wachstum)

Basidiomyceten-Stamm	Wachstum
<i>Agrocybe aegerita</i> 4021	++
<i>Clitocybe illudens</i> 3398	+
<i>Collybia fusipes</i> 414.79	-
<i>Lentinula edodes</i> A 20-5	-
<i>Lepista nuda</i> 300.58	-
<i>Marasmius scorodonius</i> 137.83	+
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> L 13-2	++
<i>Pleurotus eryngii</i> 366.47	+
<i>Pleurotus floridanus</i> Nr. 17	++
<i>Pleurotus sapidus</i> 8266	++
<i>Polyporus</i> sp. I	+
<i>Sparassis crispa</i> 408.71	-
<i>Trametes</i> sp. 480.63	+
<i>Trametes versicolor</i> E39	-
<i>Wolfiporia cocos</i> 279.55	-

Ebenfalls im Vergleich zu Referenzplatten wurden weitere 14 Basidiomyceten mit Cinerean als Kohlenstoffquelle auf β -Glucanabbau untersucht (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Plattenscreening auf β -glucanabbauende Basidiomyceten mit Cinerean als Kohlenstoffquelle (- kein Wachstum, + Wachstum, ++ starkes Wachstum)

Basidiomyceten-Stamm	Wachstum
<i>Armillaria mellea</i> 100.12	+
<i>Hericiium erinaceus</i> 260.74	+
<i>Lentinula edodes</i>	+
<i>Lentinula edodes</i> 225.51	+
<i>Marasmius alliaceus</i> 413	+
<i>Marasmius scorodonius</i> 166.44	+
<i>Marasmius scorodonius</i> 850.87	++
<i>Meripilus giganteus</i> 561.86	-
<i>Pholiota squarrosa</i> 5127	++
<i>Pleurotus euosmus</i> 5331	-
<i>Pleurotus lampas</i> 323.49	-
<i>Pleurotus ostreatus</i> 1020	++
<i>Pleurotus sajor-caju</i> 5339	-
<i>Polyporus umbellatus</i> 483.72	+

Für das Screening wurden nichttoxische Basidiomyceten eingesetzt. Bis auf *Wolfiporia cocos* handelte es sich um Weißfäulepilze. *Wolfiporia cocos* ist ein Braunfäulepilz.

3.2.2 Screening in Submerskultur auf Endo- β -Glucanaseaktivität

Alle 19 Basidiomyceten, die im Plattenscreening Wachstum zeigten (+ und ++) und somit potentielle β -Glucanaseaktivität besitzen, wurden submers kultiviert. Die Vorkulturen (s. 2.2.11) wurden mit Myzelstücken von den entsprechenden Stammhaltungsplatten (s. 2.2.9) inokuliert. Für die Hauptkulturen wurde Minimalmedium mit Cinerean als Kohlenstoffquelle und Induktor verwendet (s. 2.2.13). Die Probenahme erfolgte ab dem vierten Kulturtag jeden zweiten

Tag bis zum Kulturtag 12. Der Kulturüberstand wurde bei 37 °C mit 0,1 M Natriumacetat-Puffer pH 5,0 und dem unlöslichen Substrat Laminarin azur inkubiert. Laminarin ist ein β -1,3-1,6-D-Glucan aus der Braunalge *Laminaria digitata*, das hier kovalent mit dem blauen Farbstoff Remazol Brillantblau R verknüpft ist. Endo- β -Glucanaseaktivität führt zu löslichen, blau gefärbten Abbauprodukten, die photometrisch analysiert wurden (s. 2.8.1). Die höchsten Endo- β -Glucanaseaktivitäten wiesen *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp., *Pleurotus sapidus* und *Polyporus* sp. auf. Bei *Armillaria mellea*, *Hericiium erinaceus*, *Lentinula edodes* und *Marasmius scorodoni* 166.44 war keine Aktivität nachweisbar. Die übrigen Basidiomyceten zeigten sehr geringere Enzymaktivitäten (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Maximale Endo- β -Glucanaseaktivitäten von Basidiomyceten im Submerskulturscreening

Basidiomyceten-Stamm	max. Endo- β - Glucanaseaktivität [U mL ⁻¹]	Kulturtag
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> L 13-2	78,5	12
<i>Trametes</i> sp. 480.63	76,7	10
<i>Pleurotus sapidus</i> 8266	62,8	12
<i>Polyporus</i> sp. I	52,8	10
<i>Pleurotus floridanus</i> Nr. 17	31,6	12
<i>Agrocybe aegerita</i> 4021	13,5	6
<i>Marasmius scorodonius</i> 850.87	9,5	12
<i>Polyporus umbellatus</i> 483.72	8,5	12
<i>Marasmius alliaceus</i> 413	5,3	12
<i>Pleurotus eryngii</i> 366.47	4,8	10
<i>Lentinula edodes</i> 225.51	4,5	10
<i>Pleurotus ostreatus</i> 1020	4,5	12
<i>Clitocybe illudens</i> 3398	3,8	4
<i>Marasmius scorodonius</i> 137.83	2,8	10
<i>Pholiota squarrosa</i> 5127	1,7	10
<i>Armillaria mellea</i> 100.12	nicht nachweisbar	-
<i>Hericiium erinaceus</i> 260.74	nicht nachweisbar	-
<i>Lentinula edodes</i>	nicht nachweisbar	-
<i>Marasmius scorodonius</i> 166.44	nicht nachweisbar	-

Maximale Endo- β -Glucanaseaktivitäten wurden überwiegend an den Kulturtagen 10 und 12 nachgewiesen.

3.3 Charakterisierung der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*

3.3.1 Endo- β -Glucanaseaktivität von *Phanerochaete chrysosporium*

Der Basidiomycet *Phanerochaete chrysosporium* wies die höchste Endo- β -Glucanaseaktivität auf und wurde über einen größeren Zeitraum von 26 Tagen submers kultiviert, um die Enzymaktivitäten während des Kulturverlaufs genauer zu beobachten (Abb. 3.2).

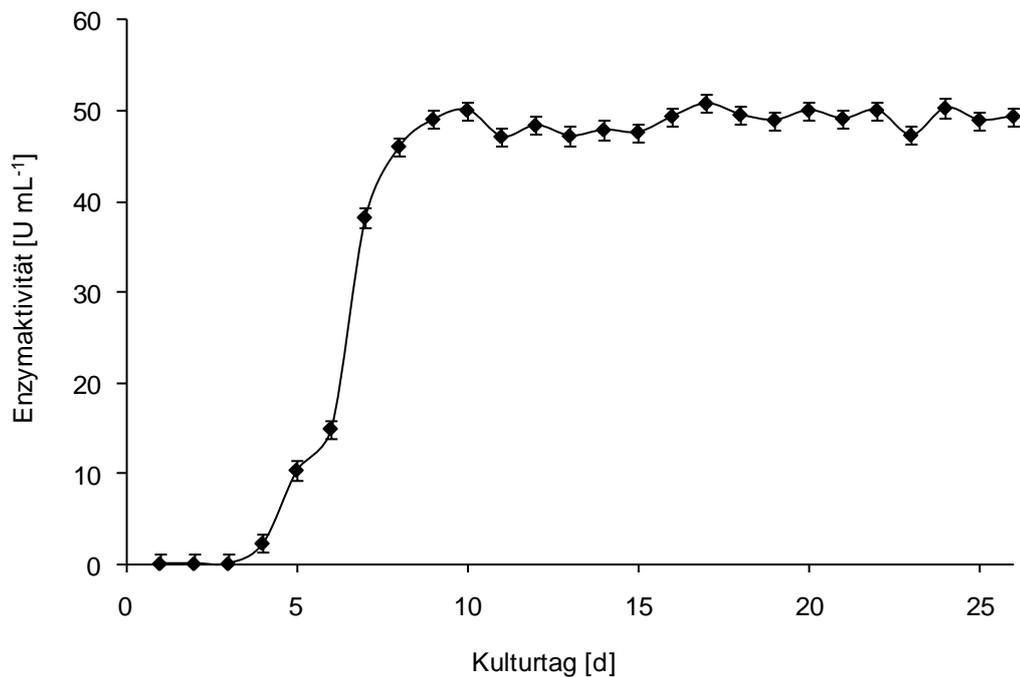


Abb. 3.2: Von *Phanerochaete chrysosporium* während der Kultivierung sekretierte Endo- β -Glucanaseaktivität

Die Enzymaktivität stieg ab dem 4. Kulturtag bis zu einem Maximum an Kulturtag 10 und schwankte im weiteren Kulturverlauf um den maximalen Wert. Im Vergleich zum Screening war die maximale Enzymaktivität um ca. 36% niedriger (s. 3.2.2).

3.3.2 Gesamtglucanaseaktivität von *Phanerochaete chrysosporium*

Zur Messung der Gesamtglucanaseaktivität wurde aufgrund der besseren Löslichkeit im Vergleich zum Cinerean das kommerziell erhältliche β -1,3-1,6-D-Glucan Laminarin als Substrat eingesetzt. Die enzymhaltige Probelösung wurde bei 60 °C mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 (49 mM Citronensäure, 102 mM Dinatriumhydrogenphosphat) und einer wässrigen Laminarinlösung inkubiert. Die gebildeten reduzierenden Zucker wurden im Anschluss mittels Nelson-Somogyi-Test photometrisch quantifiziert (s. 2.8.3). Der Verlauf der Gesamtglucanaseaktivität während der Kultivierung (Abb. 3.3) ähnelte dem der Endo- β -Glucanaseaktivität (Abb. 3.2).

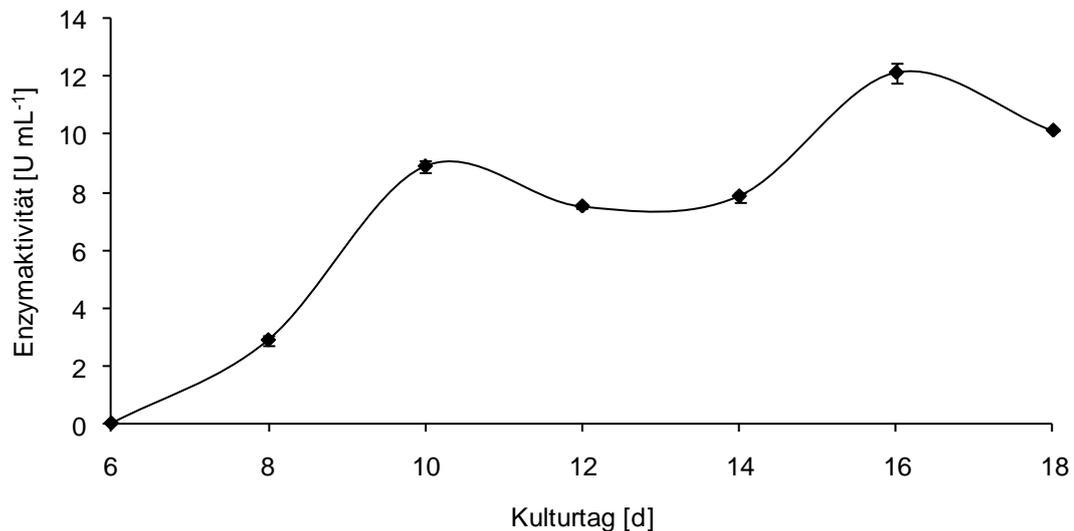


Abb. 3.3: Gesamtglucanaseaktivität von *Phanerochaete chrysosporium* während der Kultivierung

Die Gesamtglucanaseaktivität stieg bis zum 10. Kulturtag zu einem ersten Maximum an. Die höchste Gesamtglucanaseaktivität wurde am 16. Kulturtag beobachtet.

Das Ergebnis des Screenings in Submerskultur (s. 3.2.2) wurde mit der Gesamtglucanaseaktivität der 4 Basidiomyceten mit der höchsten Endo- β -Glucanaseaktivität im Kultivierungsverlauf bestätigt (Abb. 3.4).

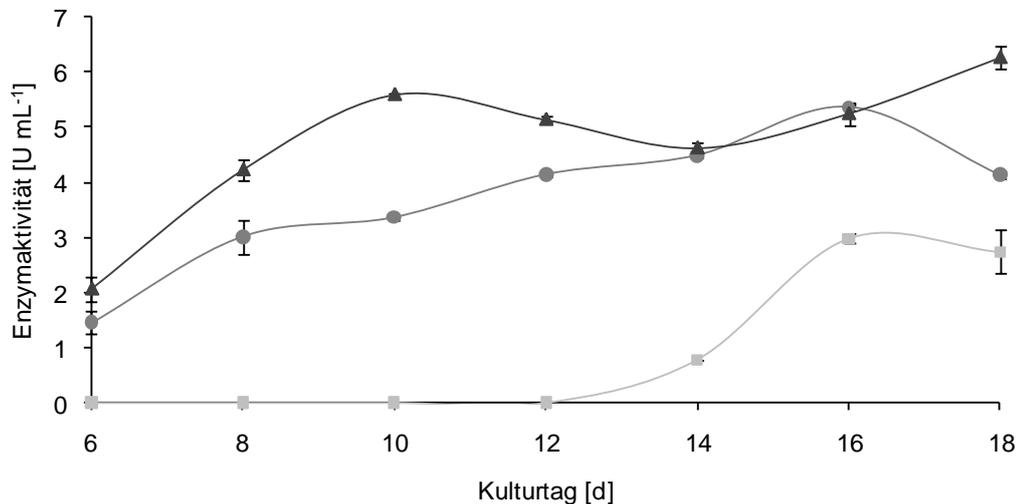


Abb. 3.4: Gesamtglucanaseaktivität während der Kultivierung
(\blacktriangle *Pleurotus sapidus*; \bullet *Trametes sp.*; \blacksquare *Polyporus sp.*)

Die höchste Gesamtglucanaseaktivität wurde bei *Phanerochaete chrysosporium* nachgewiesen (vgl. Abb. 3.3).

Bei *Pleurotus sapidus* zeigte die Gesamtglucanaseaktivität am 10. Kulturtag ein erstes Maximum. Im weiteren Kultivierungsverlauf stieg die Aktivität bis zum 18. Kulturtag an.

Die Gesamtglucanaseaktivität von *Trametes sp.* und *Polyporus sp.* stieg kontinuierlich bis zum 16. Kulturtag an, bei *Polyporus sp.* jedoch erst nach dem 12. Kulturtag.

3.3.3 pH-Optimum der von *Phanerochaete chrysosporium* sekretierten Endo- β -Glucanase

Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte mit Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium*, der mit Citrat-Phosphat-Puffer und wässriger Laminarinlösung versetzt 45 min bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert wurde (s. 2.8.3.1). Der pH-Wert der Pufferlösungen variierte zwischen pH 3,0 und pH 6,0. Die Enzymaktivität war bei pH 5,0 maximal, so dass alle weiteren Messungen bei diesem pH-Wert durchgeführt wurden (Abb. 3.5).

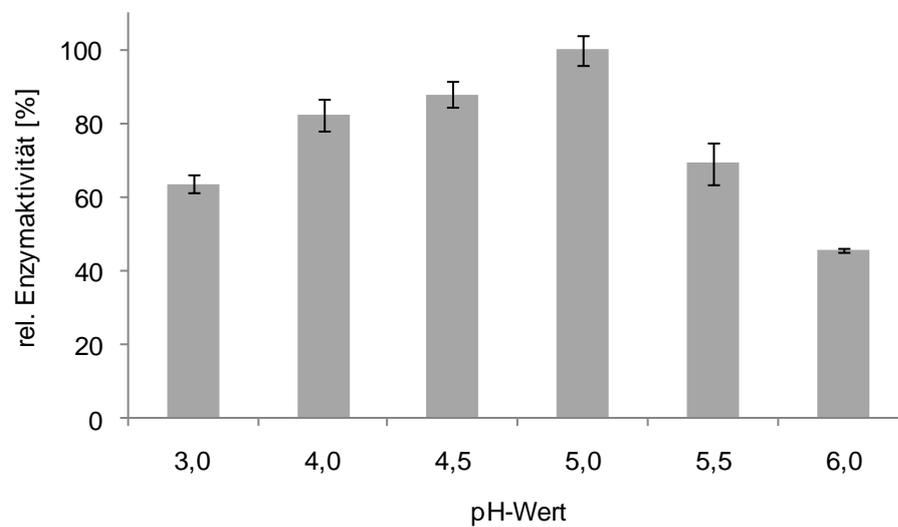


Abb. 3.5: Relative Enzymaktivität der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* in Abhängigkeit vom pH-Wert

3.3.4 Temperatur-Optimum der von *Phanerochaete chrysosporium* sekretierten Endo- β -Glucanase

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde Kulturüberstand mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 (49 mM Citronensäure, 102 mM Dinatriumhydrogenphosphat) und wässriger Laminarinlösung 15 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert (s. 2.8.3.2).

Die höchste Enzymaktivität wurde zwischen 63 °C und 68 °C beobachtet (Abb. 3.6). Alle weiteren Aktivitätsbestimmungen erfolgten bei 60 °C.

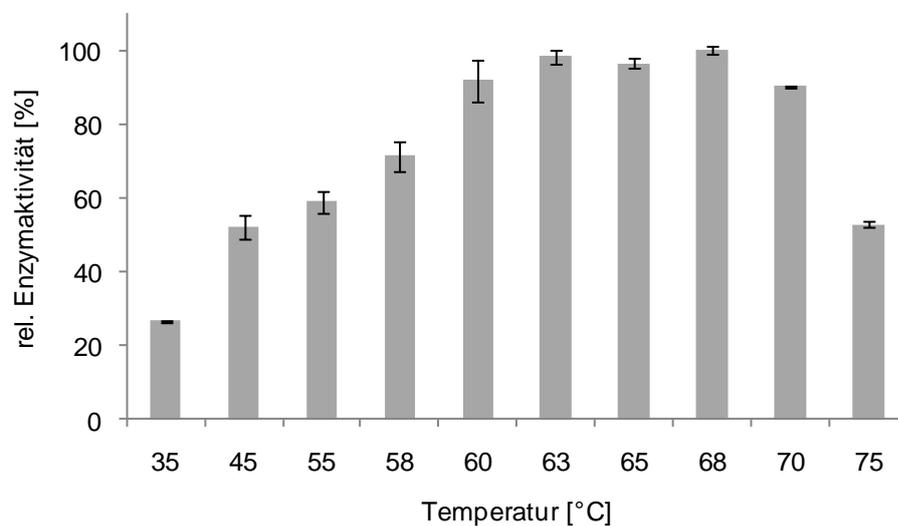


Abb. 3.6: Relative Enzymaktivität der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* in Abhängigkeit von der Temperatur

3.3.5 Bestimmung des isoelektrischen Punktes

Der konzentrierte Kulturüberstand (s. 2.9) wurde einer isoelektrischen Fokussierung unterworfen (s. 2.11.3). Ein Teil des Gels wurde mit Coomassie gefärbt (s. 2.11.4), wodurch 6 Banden mit isoelektrischen Punkten zwischen 2,5 und 6,7 sichtbar wurden (Abb. 3.7).

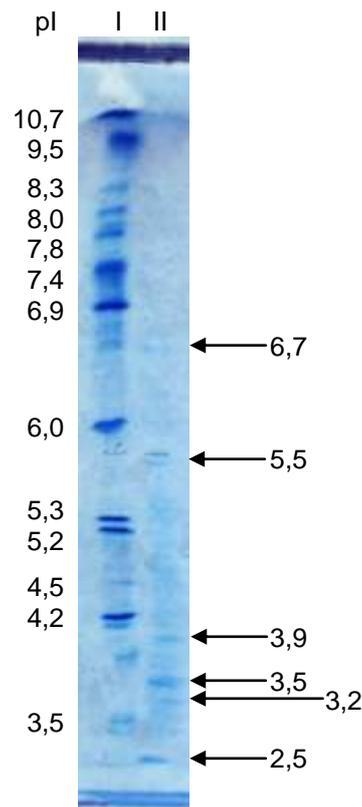


Abb. 3.7: Isoelektrische Fokussierung des konzentrierten Kulturüberstands
(I: Referenzproteine, 5 μ L; II: konzentrierter Kulturüberstand, 10 μ L)

Im ungefärbten Teil des Gels wurden entsprechend zu den gefärbten Banden Bereiche ausgeschnitten und auf Gesamtglucanaseaktivität getestet (s. 2.11.6, nicht gezeigt). Als Blindwert diente ein Gelbereich, der keine Banden aufwies. Bei dem Bereich mit einem isoelektrischen Punkt von 6,7 war die Aktivitätsfärbung am deutlichsten. Der Gelbereich mit einem isoelektrischen Punkt von 5,5 zeigte im Vergleich dazu eine schwächere Färbung. Bei den übrigen Banden war keine Aktivitätsfärbung zu beobachten.

3.3.6 Spaltmuster Endo-/Exo- β -Glucanasen

Das Spaltmuster von Endo- und Exo- β -Glucanasen wurde durch unterschiedlich lange Inkubationen der jeweiligen Enzympräparate mit einer wässrigen Laminarinlösung und anschließender Größenausschlusschromatographie analysiert. Die Inkubation wurde bei 40 °C mit Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 (4,9 mM Citronensäure, 10,2 mM Dinatriumhydrogenphosphat) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Lichtstredetektor. Anhand dieser Spaltmuster wurde die Spezifität der Glucanaseaktivität aus *Phanerochaete chrysosporium* eingestuft.

Cinerean eignete sich für diese Versuchsreihe nicht als Substrat, weil es nach Ausfällung (s. 2.2.15) nur begrenzt löslich war. Der Kulturüberstand von *Botrytis cinerea* enthielt zu wenig Cinerean (Abb. 3.8). Eine Konzentrierung mittels Zentrifugationseinheiten war aufgrund des Glucangehalts nicht möglich.

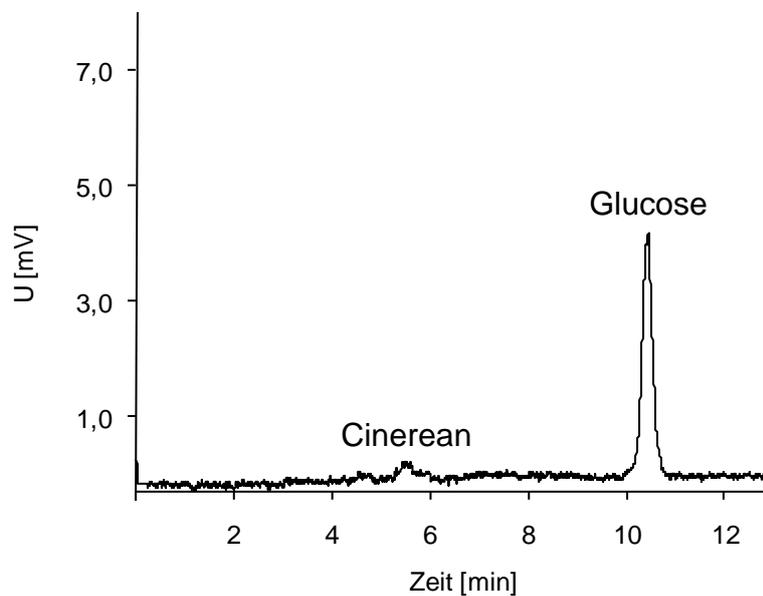


Abb. 3.8: SEC-ELSD-Chromatogramm des Kulturüberstands von *Botrytis cinerea*

Bei den verwendeten Enzympräparaten handelte es sich jeweils um Rohenzym (Abb. 3.9).

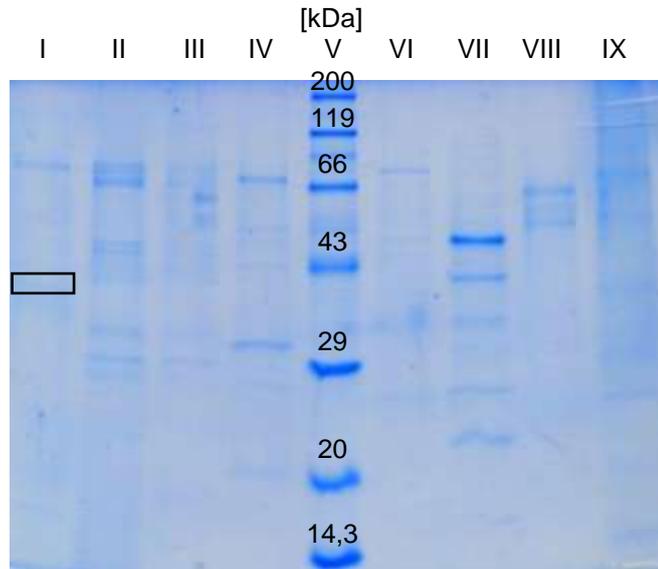


Abb. 3.9: Elektrophoretische Analyse der für den Laminarinabbau verwendeten Enzympräparate; SDS-PAGE, 12%ig

(I: konz. Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium*, 10 μ L, die Endo- β -Glucanase dieser Arbeit ist markiert; II: Glucanex aus *Trichoderma harzianum*, 10 μ L; III: Exoglucanase aus *Trichoderma harzianum* mit Pektinase aus *Aspergillus niger*, 10 μ L; IV: Exoglucanase aus *Trichoderma longibrachiatum*, 10 μ L; V: Referenzproteine, 5 μ L; VI: Exoglucanase aus *Penicillium funiculosum* (Emersfermentation), 10 μ L; VII: Exoglucanase aus *Penicillium funiculosum* (Submersfermentation), 10 μ L; VIII: Endoglucanase (TU Braunschweig), 10 μ L; IX: Endoglucanase aus *Helix pomatia*, 10 μ L)

Für die Inkubationsansätze wurde eine Gesamtglucanaseaktivität (s. 2.8.3) von $0,5 \text{ U Ansatz}^{-1}$ gewählt. Für die Blindwerte wurden hitzeinaktivierte Probelösungen zu jeder Inkubationszeit eingesetzt. Das Chromatogramm des Blindwerts entsprach bei allen Versuchen dem „0 min-Chromatogramm“. Alle Inkubationen wurden zweifach durchgeführt. Aufgrund der guten Reproduzierbarkeit des Assays und der besseren Übersichtlichkeit ist im Folgenden jeweils nur ein Chromatogramm pro Inkubationszeit dargestellt.

Charakteristisch für die Chromatogramme sind die Peaks für das jeweilige Enzymprotein, das Substrat Laminarin und die Abbauprodukte Laminaritriose und Glucose (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Charakteristische Peaks der Größenausschluss-Chromatogramme

Substanz	Molekulargewicht [Da]	Retentionszeit [min]
Enzym	nicht bestimmt	6,3-7,3
Laminarin	4.502	8,7
vermutl. Laminaritriose	514	9,9
Glucose	180	10,4

Das Molekulargewicht von Laminarin und dem Abbauprodukt, bei dem es sich dem Molekulargewicht nach um Laminaritriose handelt, wurde nach Kalibrierung der Größenausschlusssäule (s. 2.8.4.1) mit Dextran-Standards bestimmt (Abb. 3.10).

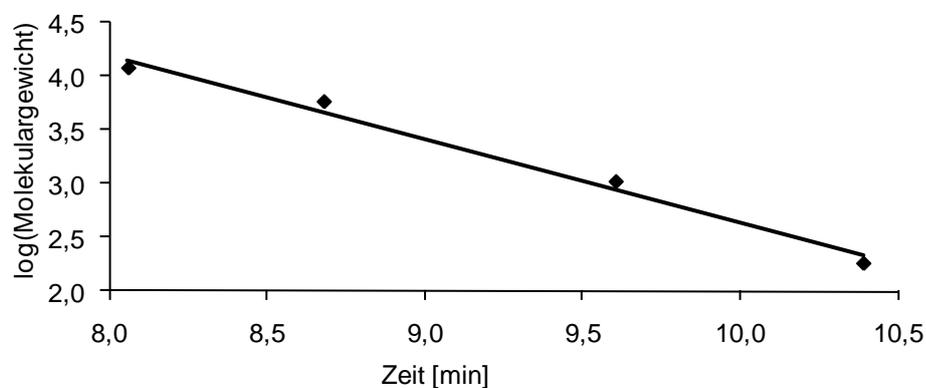


Abb. 3.10: Kalibriergerade Größenausschlusssäule PL aquagel-OH 20
($y = -0,7854x + 10,487$; $R^2 = 0,9871$)

3.3.6.1 Exoglucanasepräparat aus *Penicillium funiculosum* (Emersfermentation)

Der Abbau des Laminarins durch das Exoglucanasepräparat aus *Penicillium funiculosum* führte neben Laminaridextrinen mit niedrigem Molekulargewicht überwiegend zum Abbauprodukt Glucose.

Nach 180 min war Laminarin vollständig abgebaut (Abb. 3.11).

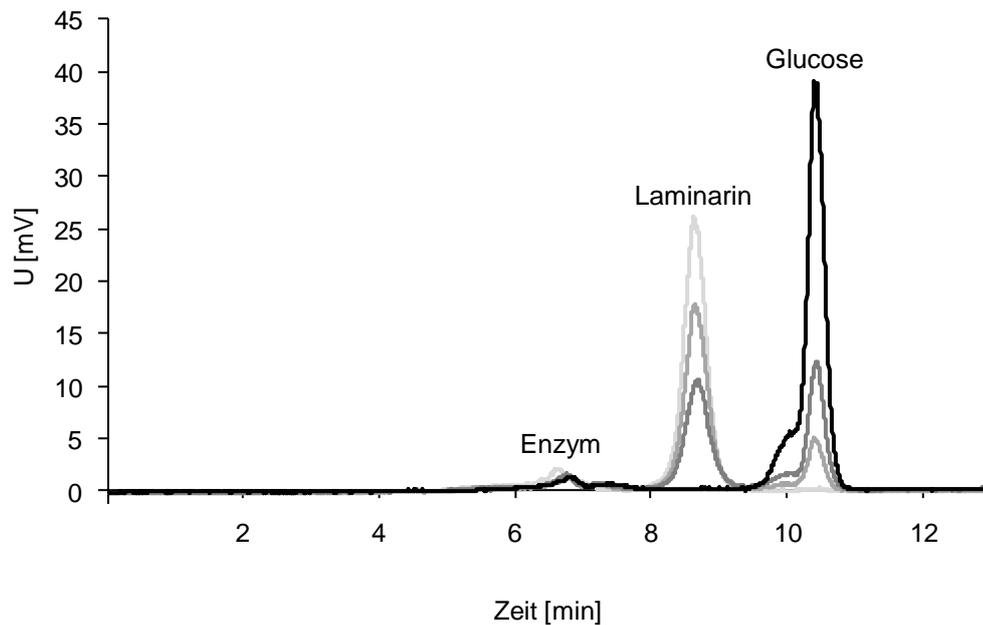


Abb. 3.11: SEC-ELSD-Chromatogramme des Abbaus von Laminarin durch das Exoglucanasepräparat aus *Penicillium funiculosum* (Emersfermentation) nach verschiedenen Inkubationszeiten (— 0 min; — 30 min; — 60 min; — 180 min)

3.3.6.2 Exoglucanasepräparat aus *Penicillium funiculosum* (Submersfermentation)

Das Exoglucanasepräparat aus der Submersfermentation von *Penicillium funiculosum* hydrolysierte Laminarin zu Glucose und einem geringem Anteil an Laminaridextrinen mit niedrigem Molekulargewicht.

Nach 180 min war Laminarin nicht vollständig abgebaut (Abb. 3.12).

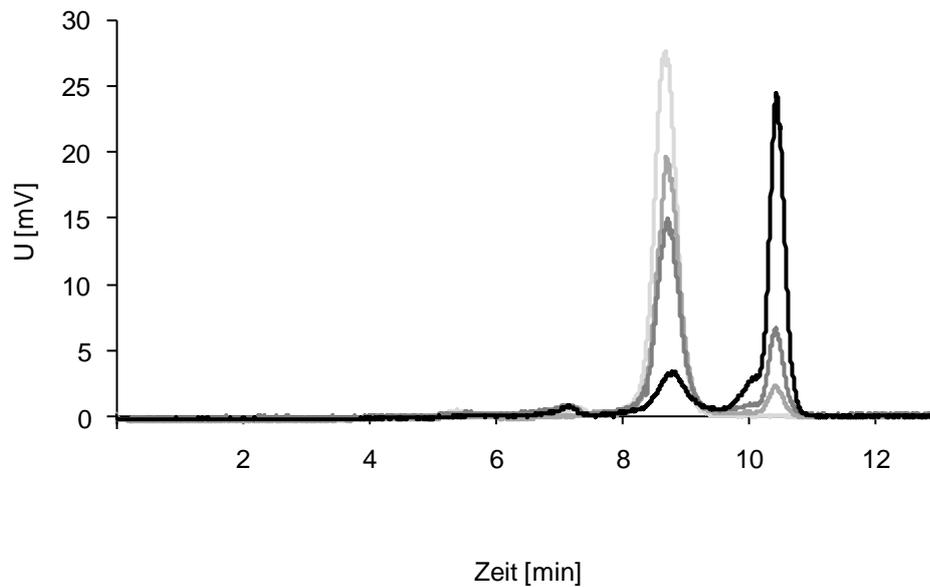


Abb. 3.12: SEC-ELSD-Chromatogramme des Abbaus von Laminarin durch das Exoglucanasepräparat aus *Penicillium funiculosum* (Submersfermentation) nach verschiedenen Inkubationszeiten

(— 0 min; — 30 min; — 60 min; — 180 min)

3.3.6.3 Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma longibrachiatum*

Durch das Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma longibrachiatum* wurde Laminarin innerhalb von 60 min zu Laminaridextrinen unterschiedlicher Größe abgebaut.

Der Abbau der Laminaridextrine erfolgte in den darauffolgenden 2 Stunden nahezu vollständig zu Glucose (Abb. 3.13).

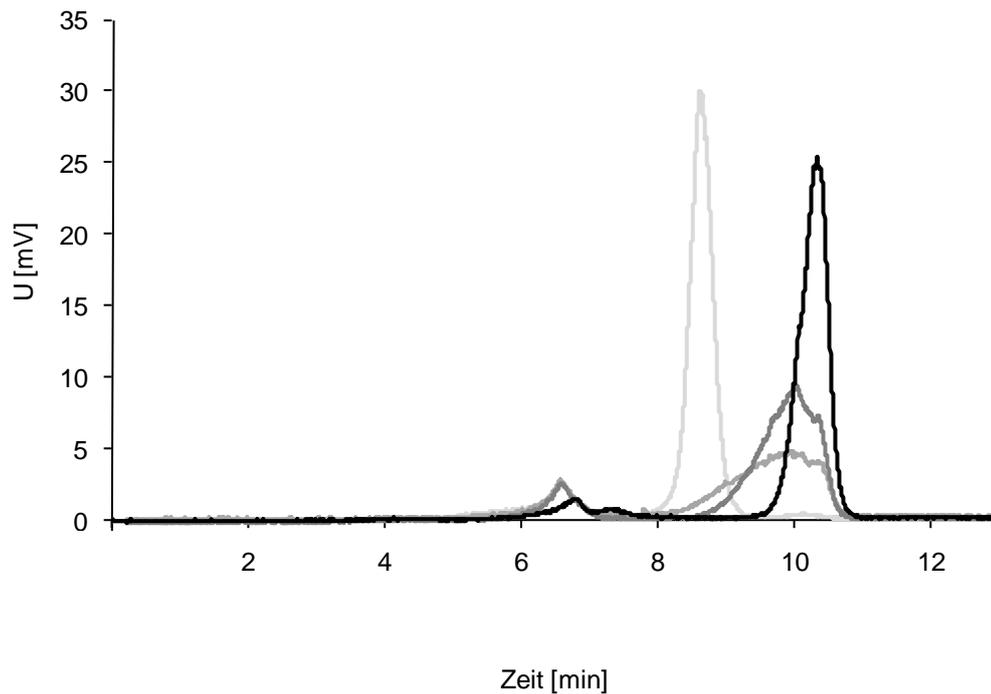


Abb. 3.13: SEC-ELSD-Chromatogramme des Abbaus von Laminarin durch das Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma longibrachiatum* nach verschiedenen

Inkubationszeiten

(— 0 min; — 30 min; — 60 min; — 180 min)

3.3.6.4 Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma harzianum* mit Pektinase aus *Aspergillus niger*

Laminarin wurde durch das Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma harzianum* mit einer Pektinase aus *Aspergillus niger* innerhalb von 60 min zu verschiedenen Laminaridextrinen und Glucose hydrolysiert.

Nach 180 min wurde vorwiegend Glucose detektiert (Abb. 3.14).

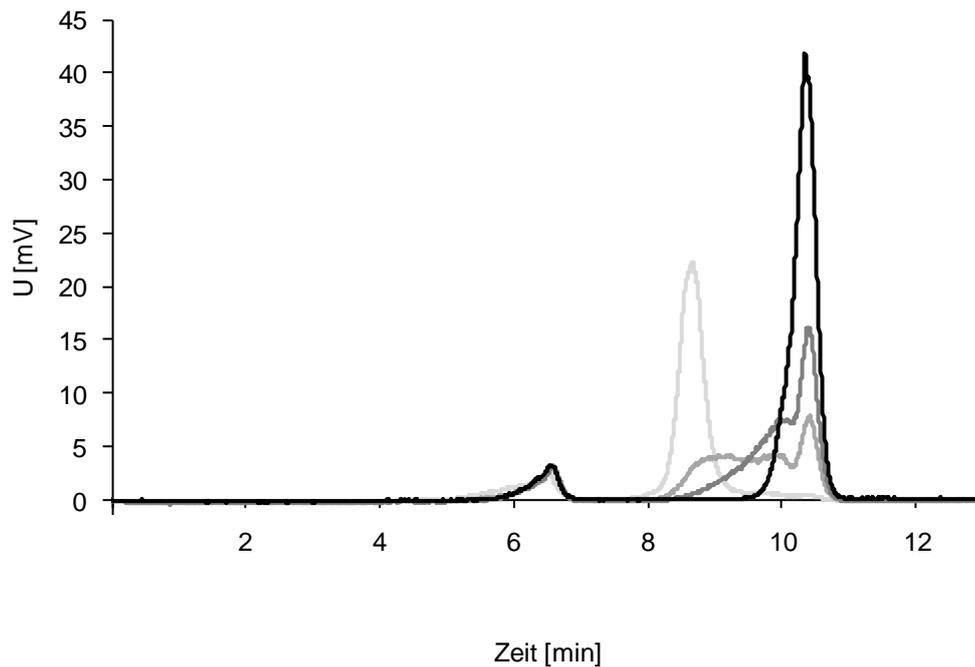


Abb. 3.14: SEC-ELSD-Chromatogramme des Abbaus von Laminarin durch das Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma harzianum* mit einer Pektinase aus *Aspergillus niger* nach verschiedenen Inkubationszeiten
(— 0 min; — 30 min; — 60 min; — 180 min)

3.3.6.5 Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma harzianum* (Glucanex)

Das Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma harzianum* (Glucanex) hydrolysierte Laminarin zu verschiedenen Laminaridextrinen und Glucose.

Nach 60 min war das Laminarin noch nicht vollständig abgebaut; nach 180 min wurde überwiegend Glucose nachgewiesen (Abb. 3.15).

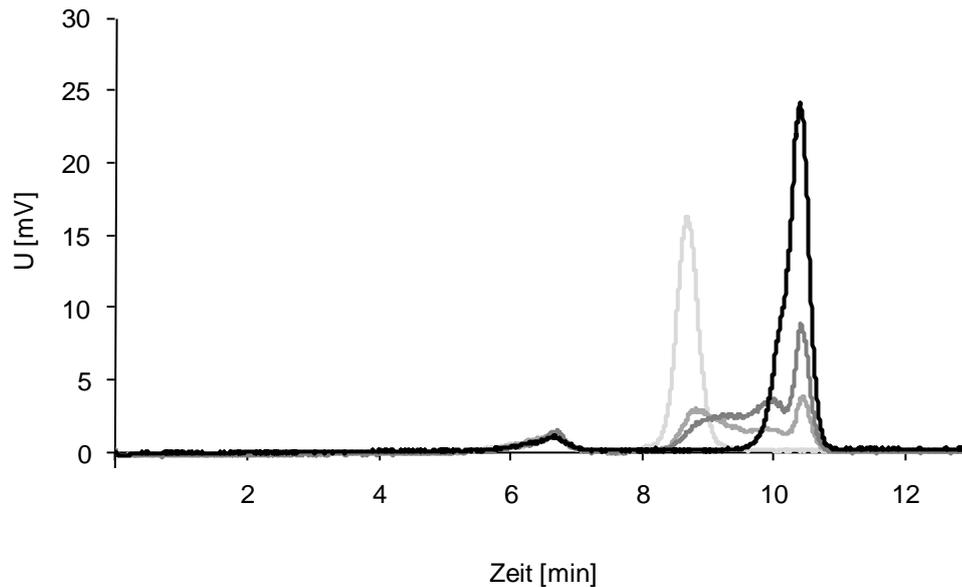


Abb. 3.15: SEC-ELSD-Chromatogramme des Abbaus von Laminarin durch das Exoglucanasepräparat aus *Trichoderma harzianum* (Glucanex) nach verschiedenen Inkubationszeiten (— 0 min; — 30 min; — 60 min; — 180 min)

3.3.6.6 Endoglucanasepräparat (TU Braunschweig)

Der Laminarinabbau durch das Endoglucanasepräparat der TU Braunschweig war nach 60 min in geringem Maß erfolgt.

Nach 180 min lagen ausschließlich verschiedene Laminaridextrine und Glucose vor (Abb. 3.16).

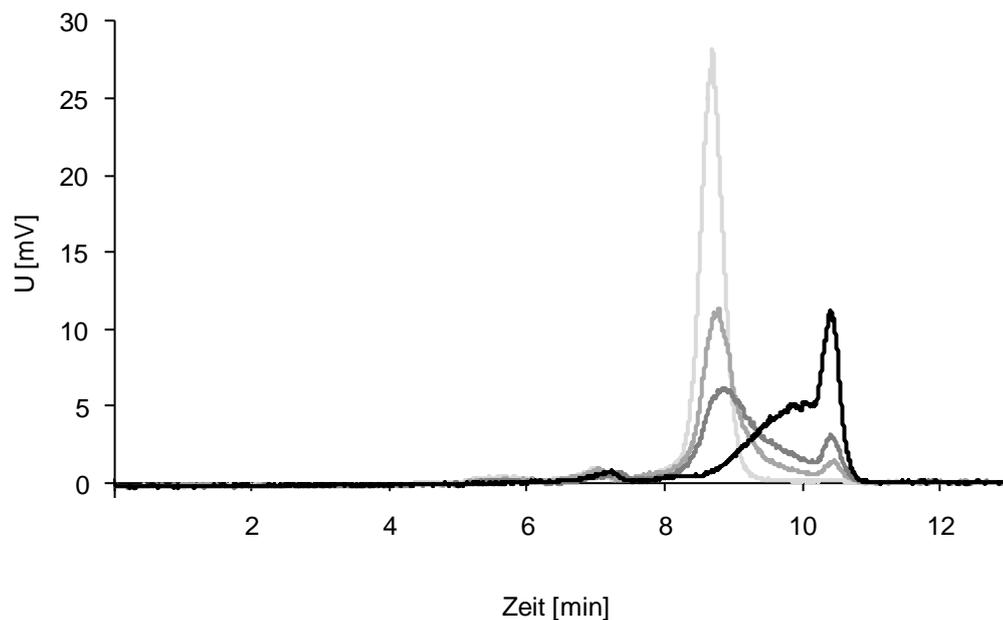


Abb. 3.16: SEC-ELSD-Chromatogramme des Abbaus von Laminarin durch das Endoglucanasepräparat (TU Braunschweig) nach verschiedenen Inkubationszeiten (— 0 min; — 30 min; — 60 min; — 180 min)

3.3.6.7 Endoglucanasepräparat aus *Helix pomatia*

Durch das Endoglucanasepräparat aus der Weinbergschnecke *Helix pomatia* wurde Laminarin innerhalb von 60 min vollständig zu verschiedenen Laminaridextrinen und Glucose abgebaut. Die Laminaridextrine wurden bevorzugt zu einem anhand der Kalibriergerade (s. 3.3.6) ermittelten Molekulargewicht von 514 Da hydrolysiert (Retentionszeit 9,9 min) und könnten einer Laminaritriose (Molekulargewicht 504 Da) entsprechen.

Nach 180 min wurde überwiegend Glucose nachgewiesen (Abb. 3.17).

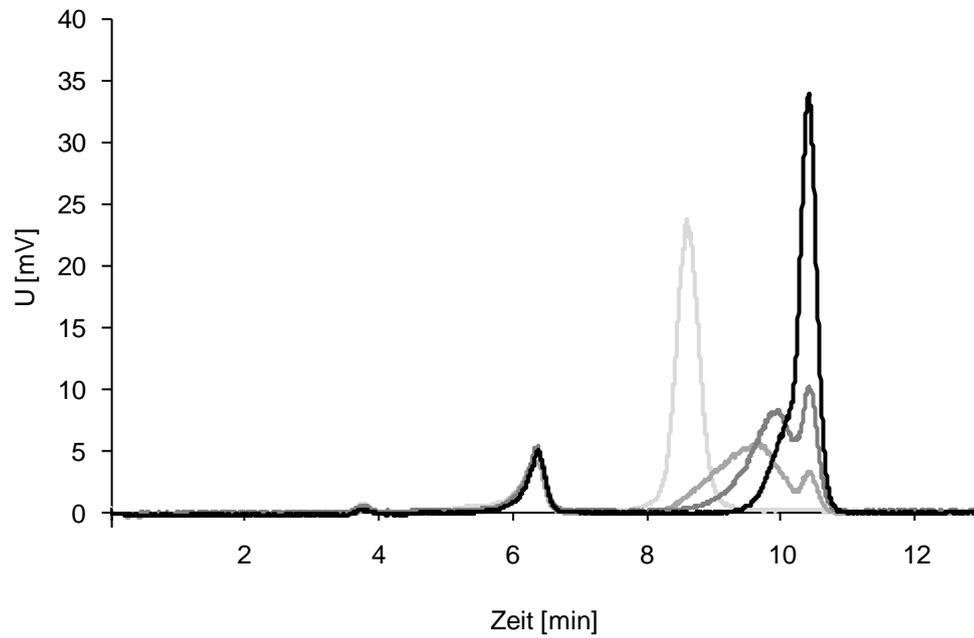


Abb. 3.17: SEC-ELSD-Chromatogramme des Abbaus von Laminarin durch das Endoglucanasepräparat aus *Helix pomatia* nach verschiedenen Inkubationszeiten (— 0 min; — 30 min; — 60 min; — 180 min)

3.3.6.8 Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium*

Laminarin wurde durch den Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium* innerhalb von 60 min in geringem Maß zu verschiedenen Laminaridextrinen und Glucose hydrolysiert.

Nach 180 min war Laminarin überwiegend zu dem Laminaridextrin mit einem Molekulargewicht von 514 Da und Glucose abgebaut worden (Abb. 3.18).

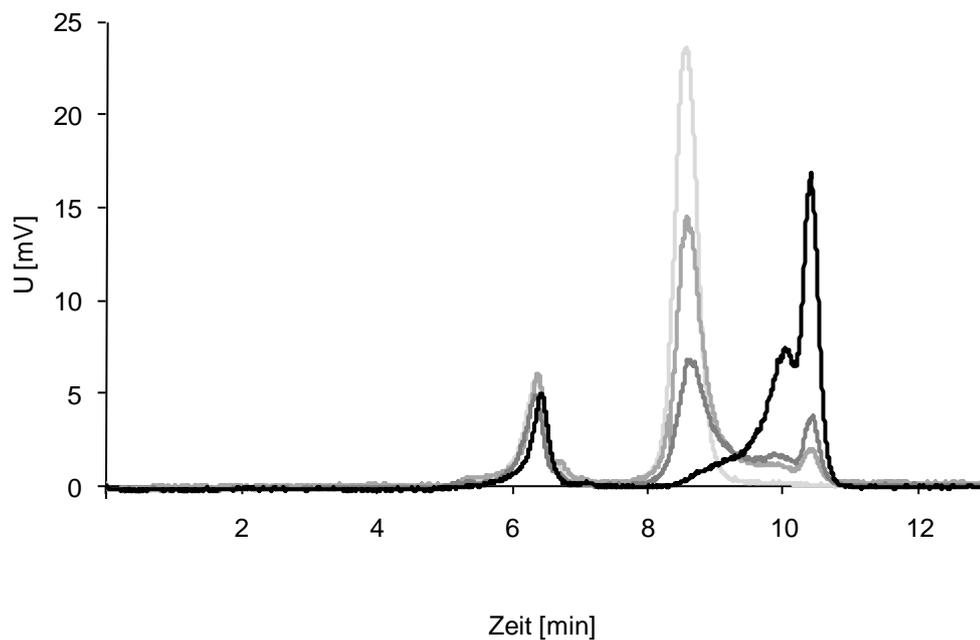


Abb. 3.18: SEC-ELSD-Chromatogramme des Abbaus von Laminarin durch den Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium* nach verschiedenen Inkubationszeiten (— 0 min; — 30 min; — 60 min; — 180 min)

3.4 Proteinbiochemische Charakterisierung der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*

3.4.1 Reinigung mittels Gelfiltrationschromatographie (GFC)

Für die Reinigung des Zielenzym wurde der Kulturüberstand zunächst mittels Ultrafiltration (s. 2.9) um den Faktor 48 konzentriert. Der Aktivitätsverlust betrug knapp 70% (Tab. 3.5). Im Filtrat sowie im Rekombinat von Filtrat und Retentat wurde keine Aktivität nachgewiesen.

Tab. 3.5: Bilanzierung der Konzentrierung mittels Ultrafiltration

Probe	Protein [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Gesamt- protein [μg]	Aktivität [U mL^{-1}]	Gesamt- aktivität [U]	Spez. Aktivität [U μg^{-1}]	Ausbeute [%]
Kultur- überstand	4,5	391,5	6,3	541,5	1,4	100,0
Konz. Kultur- überstand	38,9	69,9	92,2	166,0	2,4	30,6

Der konzentrierte Kulturüberstand wurde mit Hilfe einer Superdex 200-Säule chromatographisch getrennt. Gesamtglucanaseaktivität befand sich ausschließlich in einer Fraktion (Abb. 3.19).

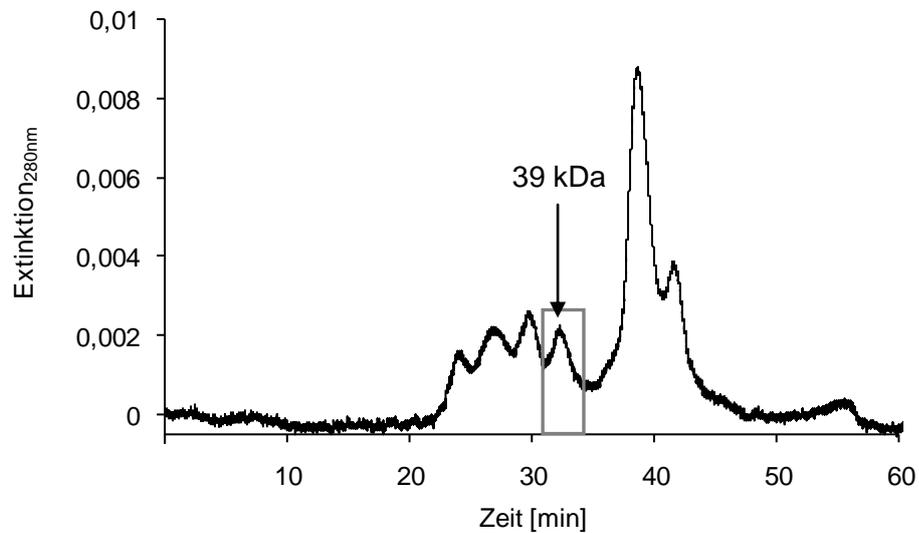


Abb. 3.19: FPLC-Chromatogramm der Reinigung der Endo- β -Glucanase mittels Superdex 200-Säule; Laufpuffer: Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 (49 mM Citronensäure, 102 mM Dinatriumhydrogenphosphat); Flussrate: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; Probenvolumen: $100 \text{ }\mu\text{L}$; Fraktionsgröße: 2 mL ; (— aktive Fraktion)

Nach Kalibrierung der Gelfiltrationssäule (s. 2.10) und Mittelung der Retentionszeiten des Peakmaximums von 4 verschiedenen GFC-Läufen wurde für die aktive Fraktion ein Molekulargewicht von 39 kDa bestimmt (Abb. 3.20).

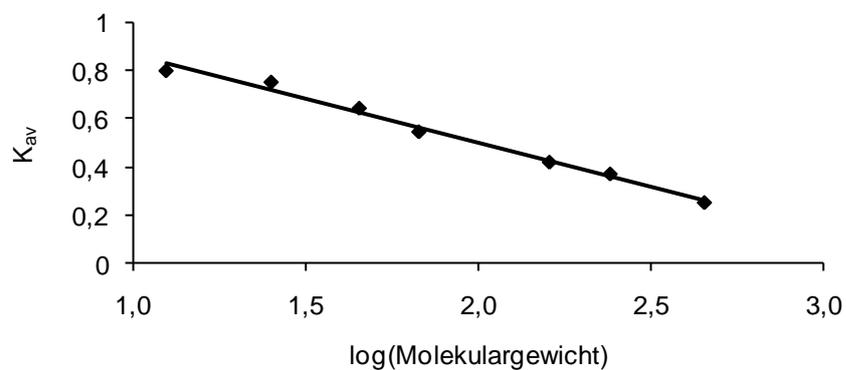


Abb. 3.20: Kalibriergerade Gelfiltrationssäule Superdex 200
($y = -0,3651x + 1,2284$; $R^2 = 0,9885$)

Die Reinigung der Endo- β -Glucanase wurde sowohl durch eine SDS-PAGE (s. 2.11.1) als auch durch eine halbnative SDS-PAGE (s. 2.11.2) veranschaulicht (Abb. 3.21). Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Gel mit Silber gefärbt (s. 2.11.5). Das halbnative SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese geteilt. Eine Gelhälfte wurde mit Coomassie gefärbt (s. 2.11.4). Um für die Coomassiefärbung eine ausreichend hohe Proteinkonzentration zu erhalten, wurde die aktive Fraktion von 4 GFC-Läufen kombiniert und um den Faktor 9 konzentriert.

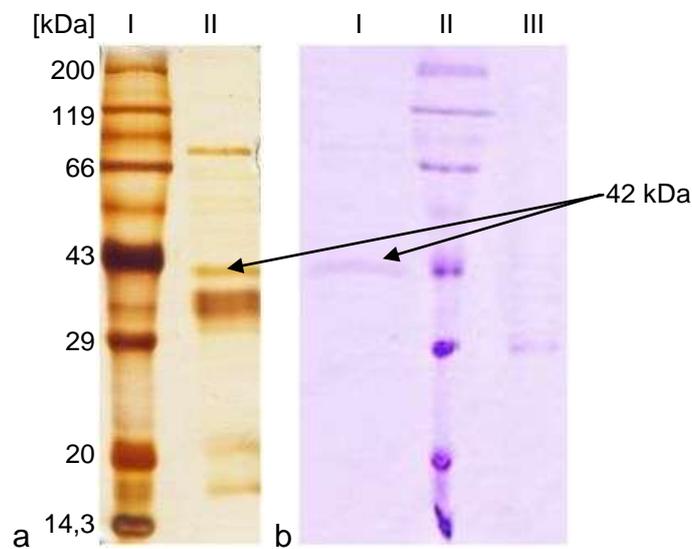


Abb. 3.21: Elektrophoretische Analyse der Reinigung der Endo- β -Glucanase;
a: Silberfärbung, SDS-PAGE, 12%ig (I: Referenzproteine, 5 μ L; II: denaturierter konz. Kulturüberstand, 30 μ L);
b: Coomassiefärbung, halbnative SDS-PAGE, 12%ig (I: denaturierte konz. GFC-Fractionen, 30 μ L; II: Referenzproteine, 5 μ L; III: native konz. GFC-Fractionen, 30 μ L)

Von der anderen Gelhälfte wurden auf der Höhe der denaturierten und nativen coomassiegefärbten Banden zwei Banden ausgeschnitten und einer Aktivitätsfärbung unterworfen (s. 2.11.6). Die native Probe zeigte gegenüber der denaturierten Probe Aktivität. Das Molekulargewicht der gereinigten Endo- β -Glucanase wurde auf 42 kDa berechnet (s. 2.11.1). Bei einer Anreicherung von 5,2 und einer Ausbeute von 4,4% betrug der Anteil des gereinigten Proteins am Gesamtprotein des Kulturüberstandes 0,8%. Die Wiederfindung der auf die Säule gegebenen Aktivität betrug 4,0% (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Bilanzierung der Reinigung der Endo- β -Glucanase

Probe	Protein		Aktivität		Ausbeute	spez. Aktivität	Anreicherung
	[$\mu\text{g mL}^{-1}$]	[μg]	[U mL^{-1}]	[U]	[%]	[$\text{U } \mu\text{g}^{-1}$]	
Kultur-überstand	4,5	391,5	6,3	541,5	100,0	1,4	1,0
Konz. Kultur-überstand	38,9	69,9	92,2	166,0	30,6	2,4	1,7
GFC	0,5	3,3	3,7	23,9	4,4	7,2	5,2

3.4.2 Sequenzierung und Homologievergleich

Die denaturierte und die native Bande des coomassiegefärbten halbnativen SDS-Polyacrylamidgels (Abb. 3.21 b) wurden ausgeschnitten. Die *de novo* Sequenzierung erfolgte nach tryptischem Verdau der Banden und anschließender Analyse mittels ESI-MS/MS (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Peptidsequenzen durch *de novo* Sequenzierung; **fett** = sichere Identifizierung; L = L oder I

Denaturierte Probe	Native Probe
1. NAYW DL LQR	4. SYGPAL NALGGWYAMER
2. VNYV NQATAVAK	
3. GEDTT VLSPSGGPR	

Die Sequenzierung ergab, dass es sich vermutlich um ein Glykoprotein des "high mannose type" mit der Glykanstruktur Mannose₆-N-Acetylglucosamin₂ handelt. Mit den erhaltenen Peptidsequenzen wurden Homologievergleiche durch Datenbankrecherche (NCBI-BLAST, Altschul *et al.* 1997) durchgeführt. Die Peptidsequenzen 1 und 3 wiesen keinerlei Homologie auf. Für die Peptidsequenzen 2 und 4 wurde eine Homologie von jeweils 83% zu einer Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* (Zugriffsnummer AB092837) gefunden. Innerhalb der Aminosäuresequenz dieses Enzyms wurde die mutmaßliche Lage der Peptidsequenzen 2 und 4 bestimmt (Abb. 3.22). Die

erwartete Fragmentgröße zwischen den Peptidsequenzen 2 und 4 betrug 161 Aminosäuren.

```

AB092837      MRFAALASLVAAALIPSSYAATYHLEDNHWVGS AFLSTFTHEAIADPTHGRVNYVDQATAL 60
Peptid 2      -----VNYV NQATAV 10
                                     ****:****:

AB092837      AKNLTYASGDTLLIRADHTTTLSPSGPGRNSVRIRSIKTYTTHVAVFDVRHMPQCGTWP 120
Peptid 2      AK-----
                                     **

AB092837      AAWETDEGDWPNNGEVDIIIEGVNDQSPNAMTLHTGANCAMPASRTMTGHATNNNC DVNTD 180
Peptid 2      -----

AB092837      GNTGCGVQAPTANSYGPSFNANGGGWYAMERTNSFIKVWFFPRNAGNVPNDIASGPATIN 240
Peptid 4      -----SYG PALNALGGGWYAMER-----
                                     ****:.* *****

AB092837      TDNWGTPTAFFPNTNCDIGSHFDANNIIINLTF CGDWAGQASIFNGAGCPGSCVDYVNNN 300
Peptid 4      -----

AB092837      PSAFANAYWDIASVRVYQ 318
Peptid 4      -----

```

Abb. 3.22: Vergleich der Aminosäuresequenz einer Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* (Zugriffsnummer AB092837) mit den Peptidsequenzen 2 und 4 der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*

3.5 Molekularbiologische Identifizierung von Basidiomyceten

Der Stamm L 13-2 der FSU Jena wurde zu Beginn dieser Doktorarbeit in der institutseigenen Stammsammlung als *Lentinellus cochleatus* geführt. Zur molekularbiologischen Identifizierung dieses Basidiomyceten wurde nach White *et al.* (1990) aus genomischer DNA (s. 2.14) mit den Primern ITS5 und ITS4 (Tab. 3.8) ein 606 bp großes Fragment amplifiziert, das für die 5,8S ribosomale Untereinheit inklusive der flankierenden ITS-Bereiche ITS1 und ITS2 (Internal Transcribed Spacer Region) codiert (Abb. 3.23).

Tab. 3.8: ITS-Primer zur Amplifizierung der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit ITS-Bereich

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
1473	ITS4	5'>TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC<3'	58 °C
1474	ITS5	5'>GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG<3'	58 °C

```

TTTCTGTAGGTGCACGTGGGGAAGTATCATTAGAGAGTAACTGCACAGGTTGTAGGTGCCCT
CTGGGGGCATGCGCACGCGTGTCTCATCCTCTTTTCCACCTGTGCGCACTTGTTGTAGGTGG
GTAGAAGAGAGAGCATTCCCTGATGCTTGCTTGGAAGCCTTCCCTATGTTTTACTACAAACGCT
TCAGTTTAAGAATGTCTACCTGCGTATAACGCATCTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTC
TTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCCTGGTATTCGGGGAGCATGCCTGT
TTGAGTGTCATGGTATCCTCAACCTTCATAACTTTTTGTTATCGAAGGCTTGGACTTGGAGG
TTGTGCTGGCTTCTAGTCGAGTCGGCTCCTCTTAAATGTATTAGCGTGAGTGTAACGGATCG
CTTCGGTGTGATAATTATCTGCGCCGTGGTCGTGAAGTAACATAAGCTTGCCTTCTAACCG
TCCTTCAGTTGGACAATTTACTTTGACATCTGACCTCAAATCAGGTAG

```

Abb. 3.23: DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich aus dem Basidiomyceten L 13-2 (FSU Jena)

Ein Datenbankvergleich (EMBL-EBI, WU-BLAST2, Altschul *et al.* 1997) ergab eine Homologie von 99% zu 5 verschiedenen *Phanerochaete chrysosporium*-Stämmen (Tab. 3.9). Eine Homologie zu *Lentinellus cochleatus* war in dem Datenbankvergleich nicht vorhanden.

Tab. 3.9: Auswahl von Homologien der DNA-Sequenz der 5,8S Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich zu verschiedenen Stämmen von *Phanerochaete chrysosporium*

Zugriffsnummer	Organismus	Homologie	E-Wert
AF475146	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> KCTC 6293	99 %	7,4 ⁻⁹⁶
AF475147	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> KCTC 6728	99%	7,4 ⁻⁹⁶
EU543990	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> PV1	99%	8,2 ⁻⁹⁶
FJ594060	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> FCL 208	99%	2,1 ⁻⁹⁵
AY854086	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> AFTOL-ID 776	99%	1,0 ⁻⁹²

Analog zu Singh und Chen (2008) wurde der Stamm L 13-2 mit der Software MEGA (Tamura *et al.* 2007) nach der Neighbor-Joining-Methode phylogenetisch eingeordnet (Abb. 3.24). Als Outgroup fungierte der Basidiomycet *Bjerkandera fumosa*.

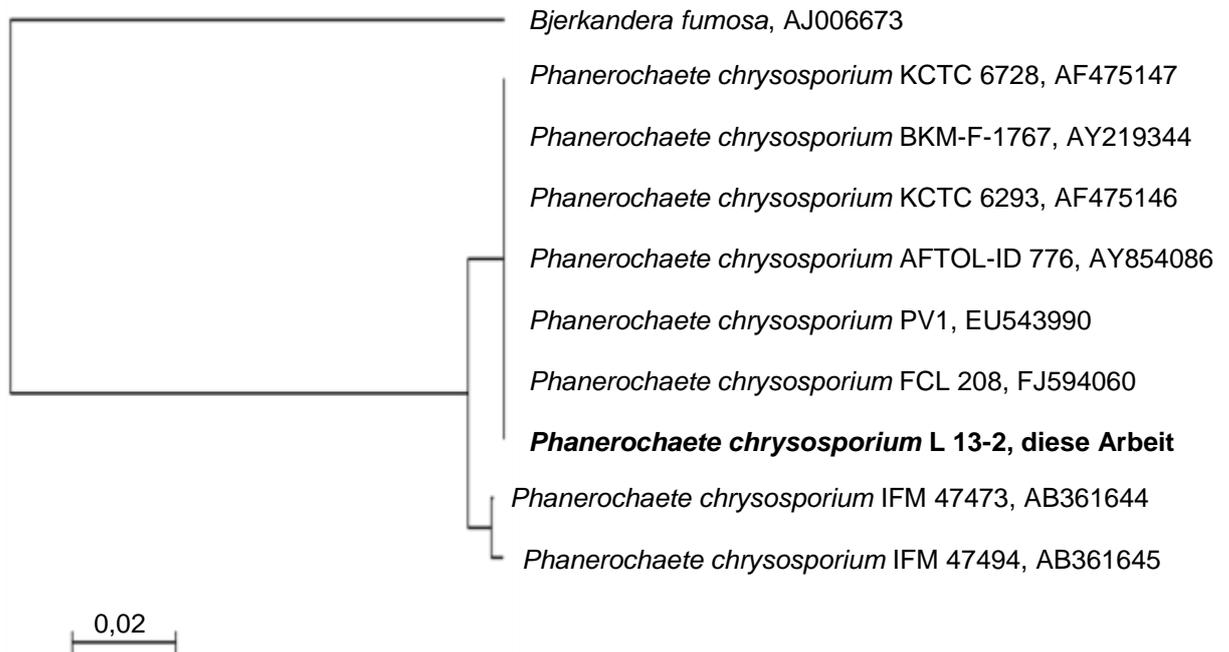


Abb. 3.24: Phylogramm der DNA-Sequenz der 5,8S ribosomalen Untereinheit mit flankierendem ITS-Bereich verschiedener *Phanerochaete chrysosporium*-Stämme (Outgroup entsprechende Sequenz von *Bjerkandera fumosa*)

Die Identität des Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* 8266 wurde in vorangegangenen Arbeiten über die Amplifizierung und Sequenzierung der V6-Domäne mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigt (Bouws 2007).

3.6 Molekularbiologische Charakterisierung der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*

3.6.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Der Basidiomycet *Phanerochaete chrysosporium* wurde für die Induktion von Glucanasen in einem Minimalmedium submers kultiviert (s. 2.2.6). Am Tag der höchsten Glucanaseaktivität wurde Gesamt-RNA aus dem Myzel isoliert (s. 2.13.1). Die Integrität der isolierten RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 2.13.2) überprüft (Abb. 3.25). Das Bandenmuster war charakteristisch für die 28S rRNA und 18S rRNA.

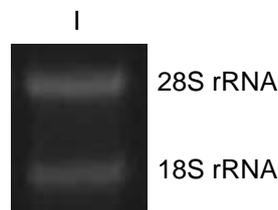


Abb. 3.25: Agarosegel (1%ig) der Gesamt-RNA
(I: Gesamt-RNA aus *Phanerochaete chrysosporium*, 9 μ L)

Ausgehend von der Gesamt-RNA wurde der Erststrang synthetisiert (s. 2.13.3). Dieser diente in einer LD-PCR (s. 2.13.4) als Template und wurde zur cDNA amplifiziert (Abb. 3.26). Der Größenbereich der cDNA lag zwischen 300 bp und 3.000 bp.

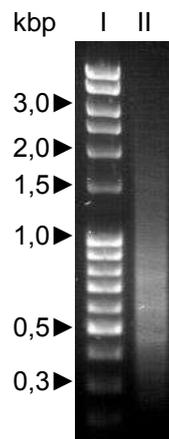


Abb. 3.26: cDNA aus *Phanerochaete chrysosporium*; 1,2%iges Agarosegel
(I: DNA-Leiter, 5 μ L; II: cDNA aus *Phanerochaete chrysosporium*, 9 μ L)

3.6.2 Ableitung der Primer

Für die Amplifizierung eines cDNA-Fragments der Endo- β -Glucanase wurden ausgehend von den Peptidsequenzen 2 und 4 sowie ihrer mutmaßlichen Lage (Abb. 3.22) mit Hilfe der Software PCR Primer Design und Oligo Property Scan des Primerherstellers (Eurofins MWG Operon) degenerierte Primer abgeleitet (Tab. 3.10). In den PCR-Reaktionen wurden die gegenläufigen Vor- und Rückwärtsprimer „for“ bzw. „rev“ so kombiniert, dass die Schmelztemperaturen nicht mehr als 2 °C voneinander abwichen. Die erwartete Produktgröße betrug bei allen Reaktionen ca. 483 bp, was 161 Aminosäuren entspricht.

Tab. 3.10: Degenerierte Primer zur Amplifizierung eines cDNA-Fragments der Endo- β -Glucanase

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
0495	EG1 for 58	5'>GT(ATCG) AAC TAC GT(ATCG) AAC CAA GC<3'	58 °C
0496	EG2 for 58	5'>GT(ATCG) AAC TAT GT(ATCG) AAC CAA GC<3'	56 °C
0497	EG3 for 58	5'>GT(ATCG) AAC TAC GT(ATCG) AAC CAG GC<3'	60 °C
0498	EG4 for 58	5'>GT(ATCG) AAT TAC GT(ATCG) AAT CAG GC<3'	56 °C
0499	EG5 for 58	5'>GT(ATCG) AAC TAT GT(ATCG) AAC CAG GC<3'	58 °C
0500	EG6 rev 58	5'>TTC CAT (ATCG)GC GTA CCA (ATCG)CC<3'	56 °C
0501	EG7 rev 58	5'>CTC CAT (ATCG)GC GTA CCA (ATCG)CC<3'	58 °C
0502	EG8 rev 58	5'>CTC CAT (ATCG)GC ATA CCA (ATCG)CC<3'	56 °C

3.6.3 Isolierung eines cDNA-Fragments der Endo- β -Glucanase

In den PCR-Reaktionen lieferten ausschließlich die Primerkombinationen 0495/0500 und 0498/0500 (Tab. 3.10) ein Fragment mit 480 bp. Die Hybridisierungstemperatur betrug 52 °C, die Elongationszeit 50 s. Das PCR-Produkt wurde in den pCR2.1-Vektor ligiert (s. 2.17.2) und in *E. coli* TOP10 zwischenkloniert (s. 2.17.3). Die Plasmidisolierung (s. 2.17.5) erfolgte aus einem sowohl beim Blau/Weiß-Screening (s. 2.17.4) als auch bei der Kolonie-PCR (s. 2.15.2) positivem Klon. Nach Sequenzierung (s. 2.17.6) wies das mit der Primerkombination 0495/0500 amplifizierte Fragment keine Homologie zu bekannten Proteinen auf. Die cDNA-Sequenz des Fragments der Primerkombination 0498/0500

(Abb. 3.27 a) zeigte eine Homologie von 74% (EMBL-EBI, WU-BLAST2) zu der in Kapitel 3.4.2 erwähnten Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* (Zugriffsnummer AB092837). Die übersetzte Aminosäuresequenz enthielt die Peptide 2, 3 und 4 aus der *de novo* Sequenzierung der Endo- β -Glucanase (Abb. 3.27 b).

a)

```
GTTAATTACGTGAATCAGGCCACTGCCGTCGCTAAAAACCTTACATTTCGCATCGGGCAAC
ACTCTGATCTTGAGGGCCGATGACACCACTGTTCTCAGCCCCAGTGGTCCAGGCCGCAAC
AGTGTCCGGATCCGTAGCGTCAAGGCTTACACCACACACGTTGCCATCATTGACGTCCGC
CACATGCCCCAGGGCTGCGGGACATGGCCCCGATTCTGGGAGACTGACGGCAGTAACTGG
CCAAACGGCGGCGAGGTGCGACATCATTGAGGGTGTAAACGACCAGTCTCCGAACGCGATG
ACGCTACACACGGGAGCAAACCTGCAACATGTCCGCCAGCCGCGCGGAGACCGGCACGCCA
ACTGGCCTGAACTGCGACGTGAACACCGACGGCAACACCGGATGTGGGGTGCAGGCCCCC
ACCGCGAACAGTTATGGCCCCGCGCTGAATGCCATCGGCGGTGGATGGTACGCTATGGAA
480 bp
```

b)

```
VNYVNQATAVAKNLT FASGNTLILRADD TTVLSPSGPGRNSV RIRSVKAYTTHVAIIDVR
HMPQGCCTWPAFWETDGSNWPNGGEVDIIEGVNDQSPNAMTLHTGANCNMSASRAETGTP
TGLNCDVNTDGNTGCGVQAPTAN SYGPALNAIGGGWYAME 160 aa
```

Abb. 3.27: cDNA-Fragment der Endo- β -Glucanase

a) cDNA-Sequenz; b) übersetzte Aminosäuresequenz (**fett**: sichere Identifizierung der Peptidsequenz; unterstrichen: unsichere Identifizierung der Peptidsequenz; L = L oder I)

3.6.4 Isolierung der cDNA der Endo- β -Glucanase

Eine Datenbankrecherche (Joint Genome Institute JGI, <http://genome.jgi-psf.org/>, *Phanerochaete chrysosporium* v2.0, BestModels v2.1, BLASTP) mit der Aminosäuresequenz (Abb. 3.27 b) ergab eine Homologie von 98% zu einem Protein, das bisher mit der ID 123909 als Lipocalin-ähnlich annotiert war. Ausgehend von der DNA-Sequenz des Gens dieses Proteins wurden spezifische Primer abgeleitet, die für die Amplifizierung der cDNA der Endo- β -Glucanase verwendet wurden (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Spezifische Primer zur Amplifizierung der cDNA der Endo- β -Glucanase

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
1671	EGPCH3 for 66	5'>ATG CGC CCG ACA TTG ACT AGC<3'	66 °C
2228	EGPCH rev 66	5'>GAT CAC TCG TAT ACG CGT ACA G<3'	66 °C

Die cDNA der Endo- β -Glucanase wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 61 °C und einer Elongationszeit von 70 s amplifiziert und anschließend in *E. coli* transformiert. Die cDNA-Sequenz umfasst 948 bp und wurde unter der Zugriffsnummer FN421479 bei EBI-EMBL veröffentlicht. Das übersetzte Protein besteht aus 315 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 34 kDa. Alle 4 massenspektrometrisch ermittelten Peptidsequenzen (Tab. 3.7) sind in der Aminosäuresequenz enthalten. Das für die Glykosidhydrolasefamilie 16a charakteristische katalytische Motiv EXDXXE wurde identifiziert (Strohmeier *et al.* 2004). Mit Hilfe der Programme NetNGly 1.0 (Gupta *et al.* 2004) und NetOGly 3.1 (Julenius *et al.* 2005) wurde die Aminosäuresequenz auf das Vorhandensein von Glykosidierungsstellen untersucht. Die Endo- β -Glucanase besitzt zwei potentielle N-Glykosidierungsstellen und keine potentielle O-Glykosidierungsstelle (Abb. 3.28).

1 MRPTLTSFVALAYCLSGALAGSYTLIDNYVGSTFLSAFVHEAIADPTHG
 1 accataatggcggttctggcggatacagatggtatctgtgaggagcacg
 tgcctcgttctcagtcgctcggacttaaatagccttccttaactcaccag
 gcgagtcctccgcctactgcccctttttcctcccaacacgccccttcc

50 **RVNYVNQATAVAKNLT**FASGNTLILRADD**TTVLSP**SGPGRNSVRIRSVK
 148 agatgacgaggggaacatgtgaacataggggaagcacagcgcaagcacaga
 gtaataaccctcaatctccgactttgcaaccttgcgggcggagtggtgta
 gtttccgctcctactacagcctgcggtccttcccttaccctcgccccg

99 AYTHVAIIDVRHMPQGCWTWPAFWETDGSNWPNGG**EVDIIE**GVNDQSP
 295 gtaacggaaggccaccgtgatcggtgaggaatcagggggaaggagctc
 caccatcttatgatcagggcgctgacaggagcaggatattagtaaacc
 tccactcctccccgtgccgagcacggtcctcgaccgcctgttccgtg

148 NAMTLHTGANCNMPASRAETGTPGLNCDVNTDGNTGCGVQAPTAN**SYG**
 442 agaaccaggataacgacgagacagcatggaaggaagtggcgcagaatg
 actctacgcagatccggcacgcccgtagatacagacgggtaccccagag
 cgggacgaaccgcgcccgatcgctcgccccccatgggcccacctc

197 **PALNAIGGGWYAMER**TNNFIKVVFFPRNGNTPSDLKNGASSINTDNWGT
 589 cgcagaggggttgagcaataagtttccagaactgcaaggaaaaagatga
 cctactggggactagcaattatgttccgagaccataagcgggtacaaggc
 cggtcctcgtcggccccccacgcccgcggcccgtacccccctgca

246 PTAFFPNTNCDIGSHFDQNNII**INLT**FCGDWAGAVYGNISGCPSTCVDYV
 736 cagttcaaatgagtcctgcaaaaaatattggtgggggtgatgtcaatgggtg
 cccttcacagatgcataaaatcttctggagcgctagacggcgcgtaat
 ccgccgcttctaaccacccccgccttggcacttccgctcctcccc

295 NNNPSAFKNA**YWDIA**AVRVYE*
 883 aaacagtaagttgagggcgtgt
 aaacgctaacagatcctgtaag
 ccctcgcgctcgccttacacga

Abb. 3.28: Protein- und cDNA-Sequenz der Endo- β -Glucanase (Zugriffsnummer FN421479) (**blau**: potentielle N-Glykosidierungsstellen; **rot**: katalytisches Motiv EXDXXE der Glykosidhydrolasefamilie 16a (Strohmeier *et al.* 2004); **fett**: sichere Identifizierung der Peptidsequenz; unterstrichen: unsichere Identifizierung der Peptidsequenz, L = L oder I)

Die Nukleotidsequenz wies zu der Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* (Zugriffsnummer AB092837) mit 74% die höchste Homologie auf (Aminosäuresequenz 78% Homologie). Ein Vergleich zwischen der Nukleotidsequenz mit der ID 123909 aus der Genomdatenbank von *Phanerochaete chrysosporium* (JGI) und der Nukleotidsequenz der Endo- β -Glucanase ergab eine Homologie von 98% (ClustalW2, Larkin *et al.* 2007). Die Nukleotidsequenz der Endo- β -Glucanase ist um 6 Nukleotide kleiner (Abb. 3.29).

ID123909 Glucanase	ATGCGCCCGACATTGACTAGCTTCGTTGCCCTCGCGTACTGCCTCTCTGGAGCCCTTGCG 60 ATGCGCCCGACATTGACTAGCTTCGTTGCCCTCGCGTACTGCCTCTCTGGAGCCCTTGCG 60 *****
ID123909 Glucanase	GGCAGCTACACTCTTATTGATAATTATGTGCGCTCTACCTTCCTCTCAGCATTCGTACAT 120 GGCAGCTACACTCTTATTGATAATTATGTGCGCTCTACCTTCCTCTCAGCATTCGTACAC 120 *****
ID123909 Glucanase	GAGGCCATCGCCGACCCTACTCACGGCAGGGTTAATTATGTCAACCAAGCCACTGCCGTC 180 GAGGCCATCGCCGACCCTACTCACGGCAGGGTTAATTATGTCAACCAAGCCACTGCCGTC 180 *****
ID123909 Glucanase	GCTAAAAACCTTACATTCGCATCGGGCAACACTCTGATCTTGAGGGCCGATGACACCACT 240 GCTAAAAACCTTACATTCGCATCGGGCAACACTCTGATCTTGAGGGCCGATGACACCACT 240 *****
ID123909 Glucanase	GTTTCAGCCCCAGTGGTCCAGGCCGCAACAGTGTCCGGATCCGTAGCGTCAAGGCTTAC 300 GTTTCAGCCCCAGTGGTCCAGGCCGCAACAGTGTCCGGATCCGCAGCGTCAAGGCTTAC 300 *****
ID123909 Glucanase	ACCACACACGTTGCCATCATTGACGTCCGCCACATGCCTCAGGGCTGCGGGACATGGCCC 360 ACCACACACGTTGCCATCATTGACGTCCGCCACATGCCTCAGGGCTGCGGGACATGGCCC 360 *****
ID123909 Glucanase	GCATTCTGGGAGACTGACGGCAGTAAC TGCCAAACGGCGGCGAGGTCGACATCGTAAGG 420 GCATTCTGGGAGACTGACGGCAGTAAC TGCCAAACGGCGGCGAGGTCGACATC----- 414 *****
ID123909 Glucanase	ATTGAGGGTGTAAACGACAGTCTCCGAACGCGATGACGCTACACACGGGAGCAAAC TGC 480 ATTGAGGGTGTAAACGACAGTCTCCGAACGCGATGACGCTACACACGGGAGCAAAC TGC 474 *****
ID123909 Glucanase	AACATGCCCGCCAGCCGCGGGAGACCGGAACGCCAACTGGCTGAACTGCGACGTGAAC 540 AACATGCCCGCCAGCCGCGGGAGACCGGAACGCCAACTGGCTGAACTGCGACGTGAAC 534 *****
ID123909 Glucanase	ACCGACGGCAACACCGGATGTGGGGTGCAGGCCCCACCGGAACAGCTATGGCCCCGCG 600 ACCGACGGCAACACCGGATGTGGGGTGCAGGCCCCACCGGAACAGCTATGGCCCCGCG 594 *****
ID123909 Glucanase	TTGAATGCCATCGGCGGTGGCTGGTATGCCATGGAGCGCACGAACAAC TCCATCAAAGTC 660 CTGAATGCCATCGGCGGTGGCTGGTATGCCATGGAGCGCACGAACAAC TCCATCAAAGTC 654 *****
ID123909 Glucanase	TGGTTCTTCCCGCGCAACGGGAACACGCCGTCCGACCTCAAGAATGGTGCAAGCAGCATC 720 TGGTTCTTCCCGCGCAACGGGAACACGCCGTCCGACCTCAAGAATGGTGCAAGCAGCATC 714 *****
ID123909 Glucanase	AACACCGACAATTGGGGCACACCACCGGTTCTTCCCGAACCAATTGTGACATTGGA 780 AACACCGACAATTGGGGCACACCACCGGTTCTTCCCGAACCAATTGTGACATTGGA 774 *****
ID123909 Glucanase	TCACACTTCGACCAAAACAATATCATCATCAACTTGACCTTCTGCGGTGATTGGGCGGGC 840 TCACACTTCGACCAAAACAATATCATCATCAACTTGACCTTCTGCGGTGATTGGGCGGGC 834 *****
ID123909 Glucanase	GCAGTCTATGGTAACTCCGGGTGCCCTAGCACCTGTGTGCGACTACGTCAACAACAACCT 900 GCAGTCTATGGTAACTCCGGGTGCCCTAGCACCTGTGTGCGACTACGTCAACAACAACCT 894 *****
ID123909 Glucanase	AGCGCGTTCAAGAACGCTTACTGGGACATCGCTGCTGTACGCGTATACGAGTGA 954 AGCGCGTTCAAGAACGCTTACTGGGACATCGCTGCTGTACGCGTATACGAGTGA 948 *****

Abb. 3.29: Vergleich von Nukleotidsequenzen

(Nukleotidsequenz von ID123909 aus der Genomdatenbank von *Phanerochaete chrysosporium* (JGI) mit der Nukleotidsequenz der Endo- β -Glucanase)

3.6.5 Berechnung eines Strukturmodells

Ein Vergleich zwischen den Aminosäuresequenzen der Endo- β -Glucanase und der Röntgenkristallstruktur einer Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* (PDB-ID 2CL2) ergab eine Homologie von 81% (Abb. 3.31).

```

FN421479      MRPTLTSFVALAYCLSGALAGSYTLIDNYVGSTFLSAFVHEAIADPTHGRVNYVNQATAV 60
2CL2          -----ATYHLEDNHWVGS AFLSTFTHEAIADPTHGRVNYVDQATAL 40
              .:* * **:***:***:*.*****:****:

FN421479      AKNLTFASGNTLILRADDTVLSPSGPGRNSVRIRSVKAYTTHVAIIDVRHMPQGCGTWP 120
2CL2          AKNLTYASGDTLILRADHTTTLSPSGPGRNSVRIRSIKTYTTHVAVFDVRHMPQGCGTWP 100
              *****:***:*****.*.*****:*.*****:*****:*****

FN421479      AFWETDGSNWPNGEVDIIEGVNDQSPNAMLHTGANCNMPASRAETGTPTGLNCDVNTD 180
2CL2          AAWETDEGDWPNGEVDIIEGVNDQSPNAMLHTGANCAMPASRTMTGHATNNNCDVNTD 160
              * **** .:*****:***** *****: ** .* *****

FN421479      GNTGCGVQAPTANSYGPALNAIGGGWYAMERTNNFIKWFFPRN-GNTPSDLKNGASSIN 239
2CL2          GNTGCGVQAPTANSYGPSFNANGGGWYAMERTNSFIKWFFPRNAGNVPNDIASGPATIN 220
              *****:*. *****.***** **.*.:*.:**

FN421479      TDNWGTPTAFFPNTNCDIGSHFDQNNIIINLTFCGDWAG--AVYGNSGCPSTCVDYVNNN 297
2CL2          TDNWGTPTAFFPNTNCDIGSHFDANNIIINLTFCGDWAGQASIFNGAGCPGSCVDYVNNN 280
              ***** ***** :::.:**.:*****

FN421479      PSAFKNAYWDIAAVRVYE 315
2CL2          PSAFANAYWDIASVRVYQ 298
              **** *****:****:

```

Abb. 3.30: Vergleich von Aminosäuresequenzen der Endo- β -Glucanase (Zugriffsnummer FN421479) und der Röntgenkristallstruktur einer Endo-1,3(4)- β -Glucanase (PDB-ID 2CL2) aus *Phanerochaete chrysosporium* mit identifizierten Funktionen (Vasur *et al.* 2009)

(**blau**: potentielle N-Glykosidierungsstellen; **grün**: hydrophobe Aminosäuren mit Einfluss auf die Substratbindung; **rot**: katalytisch aktive Aminosäuren; **violett**: bewegliche Schleife)

Basierend auf diesem Sequenzvergleich wurde mit SWISS-MODEL (Arnold *et al.* 2006) ein Strukturmodell für die Endo- β -Glucanase berechnet (Abb. 3.31).

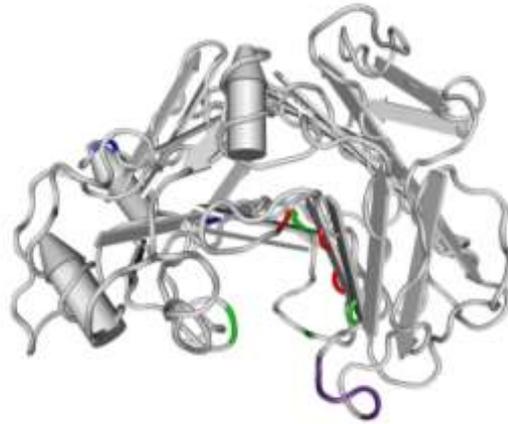


Abb. 3.31: Berechnetes Strukturmodell der Endo- β -Glucanase

(blau: potentielle N-Glykosidierungsstellen Asn₆₃, Asn₂₆₉;

grün: hydrophobe Aminosäuren mit potentiell Einfluss auf die Substratbindung

Trp₁₂₃, Trp₁₃₀, His₁₅₂, Trp₂₇₆;

rot: potentiell katalytisch aktive Aminosäuren Glu₁₃₅, Asp₁₃₇, Glu₁₄₀,

violett: potentiell bewegliche Schleife Thr₁₇₉, Asp₁₈₀, Gly₁₈₁, Asn₁₈₂)

Das berechnete Strukturmodell setzt sich aus 3 α -Helices und 21 antiparallelen β -Faltblattstrukturen zusammen. Während sich die α -Helices an einer äußeren Seite des Modells befinden, sind die β -Faltblattstrukturen maßgeblich an der Bildung eines konkaven β -Sandwiches beteiligt, der für die Bindung und Umsetzung des Substrats verantwortlich ist. Die 3 potentiell katalytisch aktiven Aminosäuren Glu₁₃₅, Asp₁₃₇ und Glu₁₄₀ sind an einem β -Faltblatt orientiert, das sich nahezu in der Mitte der durch den β -Sandwich gebildeten Tasche befindet. Während die potentielle N-Glykosidierungsstelle Asn₆₃ an exponierter Stelle lokalisiert ist, liegt Asn₂₆₉ in der Nähe des katalytisch aktiven Zentrums. Die Aminosäuren Trp₁₂₃, Trp₁₃₀, His₁₅₂, Trp₂₇₆ mit potentiell Einfluss auf die Substratbindung sind wie die potentiell bewegliche Schleife mit den Aminosäuren Thr₁₇₉, Asp₁₈₀, Gly₁₈₁, Asn₁₈₂ ebenfalls an der aktiven Tasche des Enzyms orientiert (Vasur *et al.* 2006).

3.6.6 Phylogenetische Einordnung

Ausgehend von Vertretern aus der Glykosidhydrolasefamilie 16 mit den Enzymklassen EC 3.2.1.39 (Endo-1,3- β -Glucanasen) und EC 3.2.1.6 (Endo-1,3(4)- β -Glucanasen) wurde die Aminosäuresequenz der Endo- β -Glucanase mit Hilfe der Software MEGA nach der Neighbor-Joining-Methode phylogenetisch eingeordnet (Abb. 3.32). Als Outgroup diente eine Endo-1,3- β -Glucanase aus dem Ascomyceten *Aspergillus fumigatus* der Glykosidhydrolasefamilie 81.

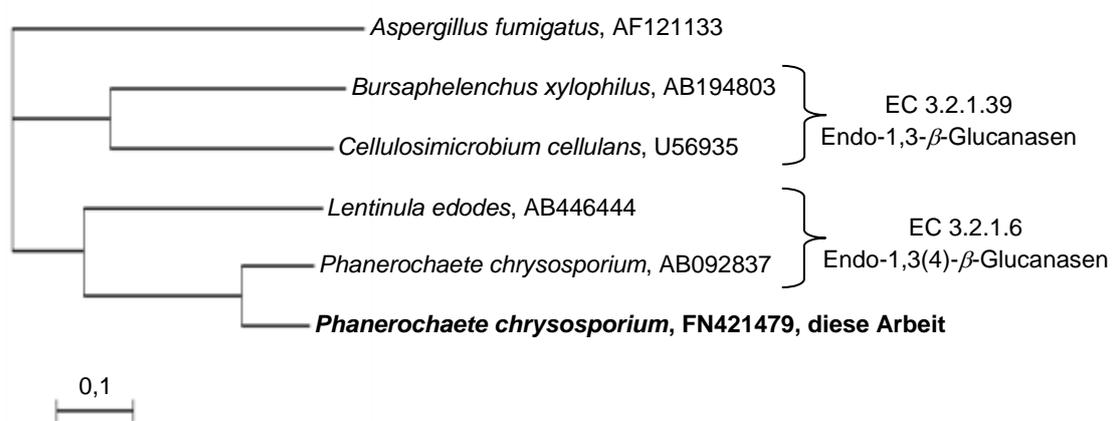


Abb. 3.32: Phylogramm von Vertretern verschiedener Enzymklassen innerhalb der Glykosidhydrolasefamilie 16 (Outgroup Endo-1,3- β -Glucanase aus *Aspergillus fumigatus*, Glykosidhydrolasefamilie 81)

3.7 Heterologe Expression der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*

3.7.1 Klonierung in *E. coli*

Die heterologe Expression der Endo- β -Glucanase erfolgte in *E. coli* mit Hilfe des pMAL Proteinfusions- und Reinigungssystems. Um eine erfolgreiche Expression zu gewährleisten, wurde die cDNA-Sequenz der Endo- β -Glucanase an die Codon Usage von *E. coli* angepasst. Für die Klonierung in die Expressionsvektoren wurden die Restriktionsschnittstellen XbaI an das 5'-Ende bzw. HindIII an das 3'-Ende angefügt (Geneart). Die Expressionsvektoren pMAL-p4X (periplas-

matische Expression) und pMAL-c4X (cytoplasmatische Expression) wurden ebenso wie das synthetische Gen in Form eines Plasmids mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (Abb. 3.33).

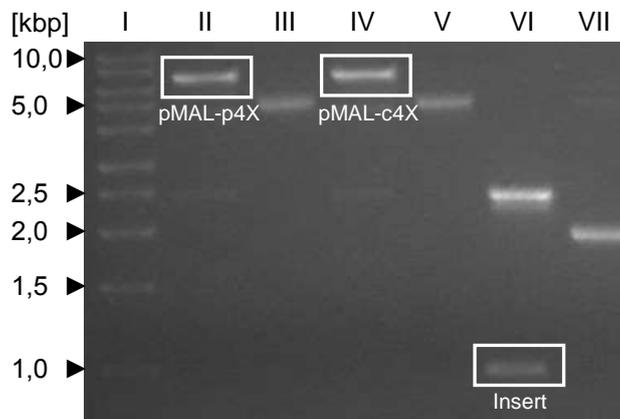


Abb. 3.33: Auftrennung der Klonierungselemente; 1,2 %iges Agarosegel (I: DNA-Leiter, 5 μ L; II: Restriktionsverdau von Vektor pMAL-p4X, 25 μ L; III: Vektor pMAL-p4X, 5 μ L; IV: Restriktionsverdau von Vektor pMAL-c4X, 25 μ L; V: Vektor pMAL-c4X, 5 μ L; VI: Restriktionsverdau synthetisches Gen der Endo- β -Glucanase, 25 μ L; VII: synthetisches Gen, 5 μ L; markierte Banden wurden isoliert)

Die Klonierungselemente wurden aus dem Agarosegel eluiert. Die linearisierten Vektoren wurden mit dem Insert, der synthetischen cDNA für die Endo- β -Glucanase, ligiert. Nach Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* K12 TB1 und Selektion über ampicillinhaltige Agarplatten wurde mittels Kolonie-PCR mit vektor- und genspezifischen Primern (Tab. 3.12) die erfolgreiche Insertion des Gens für die Endo- β -Glucanase überprüft.

Tab. 3.12: Vektor- und genspezifische Primer für die Überprüfung der Klonierung

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
8755	M13 for lang 66	5'>AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG<3'	66 °C
5170	EGhetEx for 66	5'>ATG CGT CCG ACC CTG ACC AG<3'	66 °C

Von 4 Klonierungen mit dem Vektor pMAL-c4X für die cytoplasmatische Expression waren 3 erfolgreich. Der Vektor pMAL-c4X-1 enthielt kein Insert. Mit dem Vektor pMAL-p4X für die periplasmatische Expression wurde für alle 5 Klonierungen die Insertion des Gens mit einer Größe von 1,0 kbp nachgewiesen (Abb. 3.34).

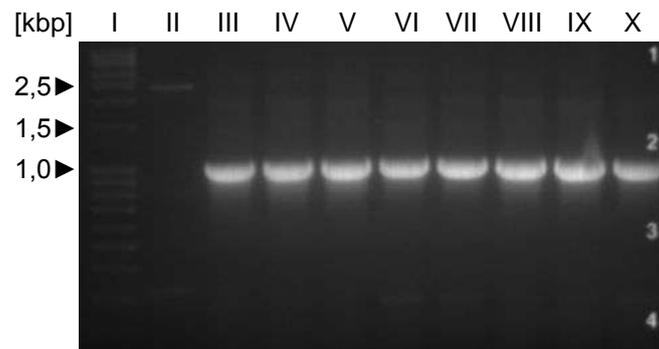


Abb. 3.34: Analyse der Kolonie-PCR mit vektor- und genspezifischen Primern;
 1,6%iges Agarosegel (I: DNA-Leiter, 5 μ L; II: Klon pMAL-c4X-1, 20 μ L;
 III: Klon pMAL-c4X-2, 20 μ L; IV: Klon pMAL-c4X-3, 20 μ L; V: Klon pMAL-c4X-4, 20 μ L;
 VI: Klon pMAL-p4X-1, 20 μ L; VII: Klon pMAL-p4X-2, 20 μ L; VIII: Klon pMAL-p4X-3, 20 μ L;
 IX: Klon pMAL-p4X-4, 20 μ L; X: Klon pMAL-p4X-5, 20 μ L)

3.7.2 Heterologe Expression in *E. coli*

Für die Expressionsversuche wurden die Klone pMAL-c4X-2 und pMAL-p4X-1 verwendet. Der entsprechende Vektor ohne Insert wurde als Negativkontrolle in den Expressionsstamm transformiert. Die Vorkulturen wurden in LB_{amp}-Medium (s. 2.3.4) durchgeführt. Das Expressionsmedium_{amp} (s. 2.3.6) für die Hauptkulturen enthielt 0,2% Glucose, um das Maltose System von *E. coli* zu reprimieren. Andernfalls würde unter anderem eine Amylase exprimiert werden, die zu Problemen bei der Reinigung des Fusionsproteins mit der Amylosesäule führen kann. Diese Amylase hydrolysiert vermutlich das Fusionsprotein von der Säule bzw. setzt Maltose aus dem Säulenmaterial frei, was in der Elution des Fusionsproteins resultiert (Handbuch pMAL Proteinfusions- und Reinigungssystem). Die Hauptkulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,5 kultiviert. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,3 mM IPTG über Nacht bei 15 °C (2.3.10). Die Expression in Cyto- und Periplasma wurde durch SDS-PAGE und

Western Blot (s. 2.19) nachgewiesen (Abb. 3.35, Abb. 3.36). Das Molekulargewicht des Fusionsproteins beträgt 76 kDa und setzt sich aus 42 kDa für das Maltosebindeprotein und 34 kDa für die Endo- β -Glucanase zusammen. Bei beiden Expressionsvarianten wurde das Fusionsprotein in so geringer Konzentration exprimiert, dass es ausschließlich im Western Blot visualisiert wurde. Im Western Blot der Kultur von pMAL-c4X-2 war ein Abbau des Fusionsproteins zum Maltosebindeprotein erkennbar (Abb. 3.35). Die Bande bei 51 kDa ist eine Fusion aus dem Maltosebindeprotein und dem α -Fragment der β -Galaktosidase. Sie entsteht bei der Expression des cytoplasmatischen Vektors pMAL-c4X, wenn dieser kein Insert enthält (Handbuch pMAL Proteinfusions- und Reinigungssystem).

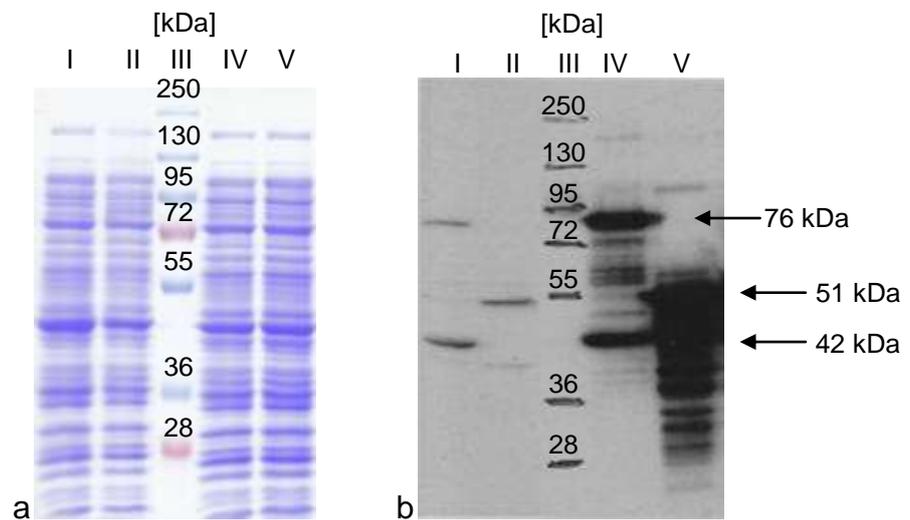


Abb. 3.35: Analyse der cytoplasmatischen Expression der Endo- β -Glucanase in *E. coli* K12 TB1 mittels Elektrophorese und Western Blot

a: Coomassiefärbung, SDS-PAGE, 12%ig; b: Western Blot;

(I: pMAL-c4X-2 nicht induziert, 20 μ L; II: Negativkontrolle pMAL-c4X nicht induziert, 20 μ L;

III: Referenzproteine, 5 μ L; IV: pMAL-c4X-2 induziert, 20 μ L; V: Negativkontrolle pMAL-c4X induziert, 20 μ L);

76 kDa: exprimiertes Fusionsprotein (MBP 42 kDa + Endo- β -Glucanase 34 kDa);

51 kDa: Fusion aus MBP und α -Fragment der β -Galaktosidase; 42 kDa: MBP

Nach der Kultivierung von pMAL-p4X-1 erfolgte zur Isolierung der periplasmatischen Fraktion ein osmotischer Aufschluss (s. 2.3.11). Die Analyse mittels Western Blot zeigt, dass das exprimierte Fusionsprotein überwiegend

im Cytoplasma verblieben und nicht in das Periplasma gelangt war. Im Gesamtzellextrakt war der Abbau des Fusionsproteins zum Maltosebindeprotein zu beobachten (Abb. 3.36). Eine Variation der IPTG-Konzentration (15 μ M, 50 μ M, 100 μ M) führte zu keiner höheren Expression in das Periplasma.

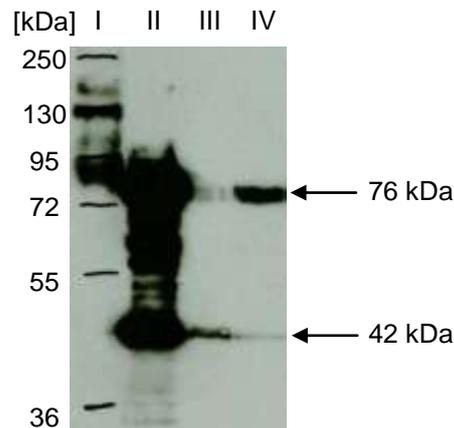


Abb. 3.36: Analyse der periplasmatischen Expression der Endo- β -Glucanase in *E. coli* K12 TB1 mittels Western Blot;

(I: Referenzproteine, 5 μ L; II: pMAL-p4X-1 Gesamtzellextrakt, 20 μ L; III: pMAL-p4X-1 periplasmatische Fraktion, 20 μ L; IV: pMAL-p4X-1 cytoplasmatische Fraktion, 20 μ L);

76 kDa: exprimiertes Fusionsprotein (MBP 42 kDa + Endo- β -Glucanase 34 kDa);

42 kDa: MBP

3.7.3 Nachweis von Glucanaseaktivität

Die exprimierenden Klone pMAL-c4X-2 und pMAL-p4X-1 wurden submers kultiviert (s. 2.3.10). Die Kultur von pMAL-c4X-2 wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zur Isolierung der periplasmatischen Fraktion der Kultur von pMAL-p4X-1 wurde ein osmotischer Aufschluss durchgeführt (s. 2.3.11). Die Zelllysate wurden bei verschiedenen Temperaturen, pH-Werten und Inkubationszeiten auf Glucanaseaktivität untersucht (s. 2.8.3.3). Nachdem keine Glucanaseaktivität festgestellt wurde, erfolgte die Reinigung der periplasmatischen Fraktion von pMAL-p4X-1 mittels Amylosesäule. Nach Abspaltung des Maltosebindeproteins durch die Peptidase Faktor Xa (5%ig bezogen auf Proteingehalt nach Bradford (s. 2.6) und Abtrennung der Peptidase über eine Benzamidinsäule wurde wiederum unter Variation der pH-Werte, Inkubationstemperaturen und -zeiten auf

Glucanaseaktivität getestet (Abb. 3.37). Eine Glucanaseaktivität wurde nicht detektiert.

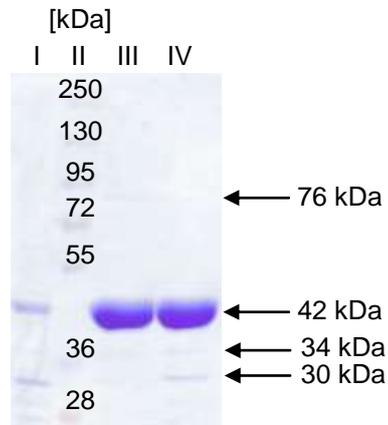


Abb. 3.37: Elektrophoretische Analyse der Reinigung und Spaltung des Fusionsproteins aus pMAL-p4X-1; SDS-PAGE, 10%ig, Coomassiefärbung

(I: periplasmatische Fraktion, 30 μ L; II: Referenzproteine, 5 μ L; III: konz. Eluat der Amylosebindesäule, 30 μ L; IV: nach Abspaltung des Maltosebindeproteins, 30 μ L);
 76 kDa: Fusionsprotein (MBP 42 kDa + Endo- β -Glucanase 34 kDa); 42 kDa: MBP;
 34 kDa: Endo- β -Glucanase; 30 kDa: Faktor Xa

Die Reinigung des Zelllysats von pMAL-c4X-2 mit Hilfe der Amylosesäule war nicht möglich, weil das Maltosebindeprotein trotz Umpufferung auf den Säulenpuffer nicht an die Säule gebunden wurde. Die Peptidase Faktor Xa wurde ohne vorherige Reinigung zu dem Zelllysat gegeben. Anschließend erfolgte die Überprüfung von Glucanaseaktivität, die negativ ausfiel.

3.8 Molekulare Charakterisierung einer Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

3.8.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die Produktausbeute bei der Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton durch Myzel von *Pleurotus sapidus* ist am höchsten, wenn die Ernte des Myzels aus einer Submerskultur am 4. Kulturtag erfolgte (Fraatz 2007). Die Gesamt-RNA wurde aus dem Myzel des 4. Kulturtags isoliert (s. 2.13.1) und mittels Agarose- und Kapillargelelektrophorese (s. 2.13.2) analysiert (Abb. 3.38).

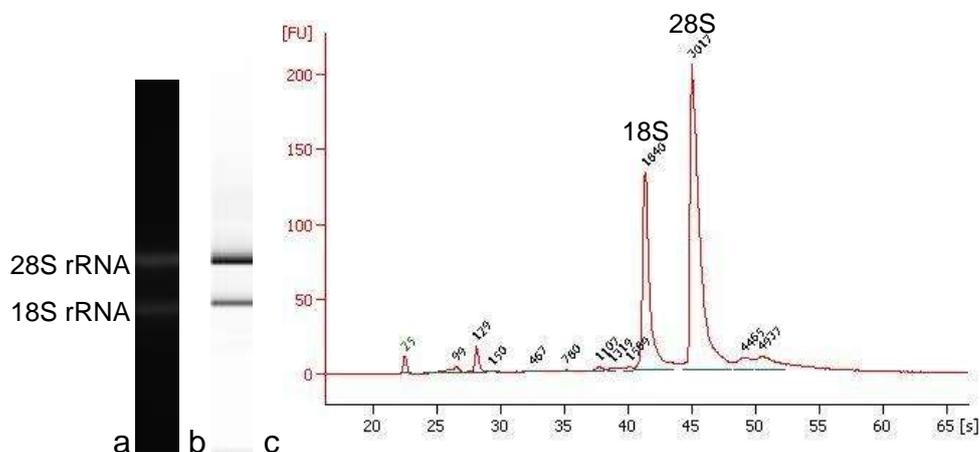


Abb. 3.38: Gesamt-RNA aus *Pleurotus sapidus*

(a: 1%iges Agarosegel, 9 μL ; b: virtuelles Agarosegel der Kapillargelelektrophorese;
c: Elektropherogramm der Kapillargelelektrophorese, 656 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$,
FU: Fluoreszenzeinheiten)

Sowohl das Agarosegel als auch die kapillargelelektrophoretische Analyse zeigen ausgeprägte Banden der 18S und 28S rRNA. Leichte Degradierung sind mit der Kapillargelelektrophorese und einer RNA Integrity Number (RIN) von 6,7 festzustellen, wobei der Wert 10 eine intakte RNA repräsentiert und der Wert 1 für eine vollständig degradierte RNA steht. Die Gesamt-RNA diente der Synthese des Erststrangs (s. 2.13.3), der anschließend in einer LD-PCR (s. 2.13.4) zur cDNA amplifiziert wurde (Abb. 3.39). Der Größenbereich der cDNA lag zwischen 150 und 2.000 bp.

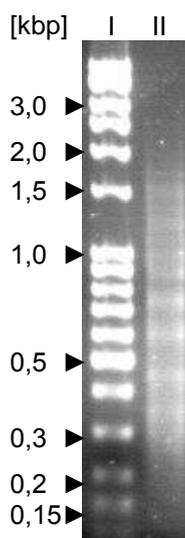


Abb. 3.39: cDNA aus *Pleurotus sapidus*; 1,2%iges Agarosegel
(I: DNA-Leiter, 5 μ L; II: cDNA aus *Pleurotus sapidus*, 9 μ L)

3.8.2 Ableitung der Primer

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Oxygenase gereinigt und einer SDS-PAGE unterworfen. Die vermutlich für die Transformationsaktivität verantwortlichen Banden mit Molekulargewichten von 66 kDa, 63 kDa und 60 kDa wurden ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Anschließend erfolgte eine *de novo* Sequenzierung mittels ESI-MS/MS (Fraatz 2007).

Tab. 3.13: Peptidsequenzen durch *de novo* Sequenzierung; **fett** = sichere Identifizierung; L = L oder I (Fraatz 2007)

66 kDa	63 kDa	60 kDa
1. LTQWNQER	8. LLEDLLELGQGFENSR	14. SVDQANDEGPWR
2. GFPVDQLNSPK	9. MQEPDEELYNSSDDGGR	15. YLGVSGSVSASYATEK
3. TNPDPVVVAAGTR	10. GFPLDQLDDDQFHNYAYAK	16. ANSYFEADASSVLR
4. DLNDMWTTLGAK	11. ...PEVLVPL...	
5. SESLPQTFTLAGGAK	12. ...LVNYDPAHLAK	
6. YTESDLMAALPLNAK	13. ...VPLAGFSTML...	
7. TNPLDLSVNQANDWPWR		

Nach Datenbankrecherche (WU-BLAST2) wurde für die Peptidsequenzen 2 und 6 eine Homologie von 63% bzw. 61% zu einer mutmaßlichen Lipxygenase aus

dem Ascomyceten *Aspergillus fumigatus* (Zugriffsnummer AAHF01000015) gefunden. Zur Abschätzung der Fragmentgröße zwischen den Peptidsequenzen 2 und 6 wurde ihre vermutliche Position innerhalb der Aminosäuresequenz der Lipoxygenase bestimmt (Abb. 3.40). Die erwartete Fragmentgröße betrug 144 Aminosäuren.

```

AAHF01000015   GFAFIRHAYENFDFKGRYVPTDLRQRGFPPEELDSPKFHNYAYARCINSMWHKIRSYVQD  540
Peptid 2       -----GFPVDQLNSPK----- 11
                *** :*:***

AAHF01000015   MLALAYPGTDADHKVRNDQCIQAWSDEMRSSDGARLPSFPTISTFEELVDCVTMCIHIAS  600
Peptid 2       -----

AAHF01000015   PQHTAVNYLQNYYSFVFNKPPCLYTEPPTSLQSLGYTEKELVEALPMNHPREWLLASH  660
Peptid 6       -----YTESDLMAALPLN----- 13
                ***.:*: ***:*

AAHF01000015   IPYLLSFKPGNKESLIVYAASKFRVYHNKPTKDAQIAAATGKFNTALAESQEEFKRYGQ  720
Peptid 6       -----

AAHF01000015   ATDDWETVEYEVLSPEWNAVSILI  744
Peptid 6       -----

```

Abb. 3.40: Vergleich der Aminosäuresequenz einer mutmaßlichen Lipoxygenase aus *Aspergillus fumigatus* (Zugriffsnummer AAHF01000015) mit den Peptidsequenzen 2 und 6 der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Unter der Berücksichtigung der Codon Usage von *Pleurotus sapidus* (kazusa.or.jp/codon) wurden basierend auf den Peptidsequenzen 2 und 6 degenerierte Primer abgeleitet (Tab. 3.14). Die Schmelztemperaturen der Vor- und Rückwärtsprimer unterschieden sich in den PCR-Reaktionen um nicht mehr als 2 °C. Bei allen Reaktionen betrug die erwartete Produktgröße ca. 432 bp, was 144 Aminosäuren entspricht.

Tab. 3.14: Degenerierte Primer zur Amplifizierung eines cDNA-Fragments der Oxygenase

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
0633	lox9 for 58	5'>GG(CT) TTC CCC GTC GAC CAA<3'	59 °C
0634	lox10 for 58	5'>GG(CT) TTC CCC GTC GAC CAG<3'	61 °C
0637	lox11 for 58	5'>AC(ACT) T(ACT)A TGG CTG CT(ACT) T(ATCG)C C<3'	58 °C
0638	lox12 for 58	5'>GAC (ACT)T(ACT) ATG GCC GCC (ACT)T<3'	55 °C
0639	lox13 for 58	5'>C(ACT)T (ACT)AT GGC TGC C(ACT)T (ATCG)CC<3'	58 °C
0640	lox14 for 58	5'>C(ACT)T (ACT)AT GGC CGC T(ACT)T (ATCG)CC<3'	58 °C
0635	lox9 rev 58	5'>TTG GTC GAC GGG GAA (AG)CC<3'	59 °C
0636	lox10 rev 58	5'>CTG GTC GAC GGG GAA (AG)CC<3'	61 °C
0641	lox11 rev 58	5'>G(ATCG)A (AGT)AG CAG CCA T(AGT)A (AGT)GT C<3'	58 °C
0642	lox12 rev 58	5'>A(AGT)G GCG GCC AT(ATG) A(ATG)G TC<3'	55 °C
0643	lox13 rev 58	5'>(ATCG)A(ATG) GGC AGC CAT (ATG)A(ATG) GTC<3'	56 °C
0644	lox14 rev 58	5'>(ATCG)A(ATG) AGC GGC CAT (ATG)A(ATG) GTC<3'	56 °C

3.8.3 Isolierung eines cDNA-Fragments der Oxygenase

In einer PCR-Reaktion mit der Primerkombination 0633/0641 (Tab. 3.14) wurde ein Fragment mit 424 bp amplifiziert. Die Hybridisierungstemperatur betrug 53 °C, die Elongationszeit 50 s. Das PCR-Produkt wurde isoliert, in den pCR2.1-Vektor zwischenklontiert und sequenziert. Die cDNA-Sequenz zeigte Homologien zu einem Fragment einer Lipxygenase aus dem Ascomyceten *Aspergillus ochraceus* von 59% (Zugangsnummer DQ087531) sowie zu einer mutmaßlichen Lipxygenase aus dem Ascomyceten *Gibberella moniliformis* von 57% (Zugangsnummer AY699875). In der übersetzten Aminosäuresequenz wurde die Peptidsequenz 2 vollständig und die Peptidsequenz 6 zum Teil wiedergefunden (Abb. 3.41 b).

a)
 GGTTCCTCCCGTTCGACCAACTCAACTCGCCGAAATTCACAACTACGCCTATGCCAGGGAT
 ATCAACGATATGTGGACAACCTTGAAGAAGTTTGTATCGTCCGTTCTGCAGGATGCCCAA
 TATTACCCGGATGATGCCTCGGTAGCTGGAGATACGCAAATTCAGGCCTGGTGTGATGAG
 ATGCGGTTCGGGGATGGGTGCCGGGATGACAACTTCCCAGAGTCGATCACAACAGTGGAC
 GATCTGGTCAACATGGTCACAATGTGCATCCACATCGCTGCGCCTCAGCACACCCGCCGTC
 AACTACCTTTCAGCAATACTATCAGACCTTCGTCTCCAACAAGCCATCAGCATTATTCTCG
 CCACTCCCACCTCGATTGCTCAACTTCAGAAATACACCGAAAGCGACATAATGGCTGCT
 ATAC 424 bp

b)
GFPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQAWCDE
 MRSGMGAGMTNFPESITTVDDLVMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQTFVSNKPSALFS
 PLPTSIAQLQ**KYTESD**IMAAI 141 aa

Abb. 3.41: cDNA-Fragment der Oxygenase

a) cDNA-Sequenz; b) übersetzte Aminosäuresequenz (**fett**: sichere Identifizierung der Peptidsequenz; L = L oder I)

3.8.4 Primer Walking

Vom cDNA-Fragment der Oxygenase wurden spezifische Primer abgeleitet, die in PCR-Reaktionen mit den Primern der Adapterregionen der cDNA (SMART II A und CDS II A) kombiniert wurden (Tab. 3.15). Die spezifischen Primer wurden so gewählt, dass das cDNA-Fragment der Oxygenase überlappend amplifiziert wird.

Tab. 3.15: Primer zur Ermittlung der Gesamtsequenz der Oxygenase

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
7718	Lox for Fr1 58	5'>AGC CAT CAG CAT TAT TCT CG<3'	58 °C
5234	Lox rev Fr1 58	5'>AGG CCT GAA TTT GCG TAT CT<3'	58 °C
2472	SMART for 58 2	5'>TAT CAA CGC AGA GTA CGC G<3'	58 °C
2473	CDS rev 58	5'>GCA GTG GTA TCA ACG CAG A<3'	58 °C

Sowohl das 5'-Ende (Primerkombination 2472/5234) als auch das 3'-Ende (Primerkombination 7718/2473) der Oxygenase wurden mit einer Hybridisierungstemperatur von 53 °C und einer Elongationszeit von 90 s amplifiziert und anschließend in *E. coli* kloniert. Anhand der sich überlappenden Sequenzen wurde

die Gesamtsequenz der cDNA ermittelt. Sie wurde unter der Zugriffsnummer FM200795 bei EBI-EMBL veröffentlicht und ist 1.191 bp lang. In die Aminosäuresequenz übersetzt besteht das Protein aus 396 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 44 kDa (Abb. 3.42). Von den tryptischen Peptiden (Tab. 3.13) sind die Peptidsequenzen 2, 4, 6, 7 und 11 vollständig sowie 10 und 13 zum Teil in der Aminosäuresequenz enthalten. Die Peptidsequenz 14 wurde in ähnlicher Form der Peptidsequenz 7 wiedergefunden (vgl. Peptidsequenz 7: ...SVNQANDWPWR mit Peptidsequenz 14: SVDQANDEGPWR). Die Oxygenase besitzt je eine potentielle N- bzw. O-Glykosidierungsstelle (NetNGly 1.0, NetOGly 3.1). Die höchsten Homologien auf Basis der Aminosäuresequenz wurden zu dem Fragment einer Lipoxygenase aus *Aspergillus ochraceus* (50%) sowie zu einer mutmaßlichen Lipoxygenase aus *Aspergillus fumigatus* (49%) bzw. aus *Gibberella moniliformis* (44%) gefunden (WU-BLAST2).

```

1 MRYGCAAVLFYLTAMGKHLPLAIIIPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDIS
1 actgtggggtttcagagaccctgaacgtagaaggtgaataacaactgat
  tgaggcctcttatcctgatactcttcaaaggtccctcttaagcactatc
  ggctggtaacctaagaggctgccccccaccgctgcccccatctaacac

50 VNQANDWPWRYAKTCVLSSDWALHEMI IHLNNTHLVEEAVIVAAQRKLS
148 gacgagtctctgaatgcttgtgcccgaaccaaaccgggggagggccact
  taacaagcggacacggtccagctaatttataaacattaactttccagatc
  gtgtccgagcccgcaccttgtgcccggccttcccttgaaaccggagcagc

295 PSHIVFRLLLEPHWVVTLSLNALARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRE
295 ctgagtcctgctggattcagcgcagcacggagcaggtagccatctacg
  ccatttgttacagttctctactcggtttcatttctcgtgccattattga
  taccgctgaatgtcagcctatgcctccaccttatccttttccaccca

148 SFTNFDWKSLYVPADESRGFPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKK
442 ttaatgtaactgcggtgctcgtcggccatcatcatgtgagaagataataa
  ctcatagagtatccatacgggtctaataaccataaacacgataatgcctaa
  acccccggccccagcggattccccaccggacccccctcgtcctggacggg

197 FVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQAWCEMRSGMGAGMTNFPESITTV
589 tgttgccggcttcgggtggggacacgcttgactgagggaaatcgtaaag
  ttccttaacaaacaacctcgacatacggaatgctgctcactcctcct
  tagctggtcatcgttcgatatgatgcgttgggggctcggaccaggcaag

246 DDLVNMVTCIHIAAPQHTAVNYLQYYQTFVSNKPSALFSPLPTSIAQ
736 ggcgaagaatacaggcccaggatcccttcatgtaactggttcccatagc
  aattattctgtatcccaaccttaataaaaacttcaacccttccctca
  ctgcccagcccctgtgccccctgactgccccgaaaacgacgcggtta

295 LQKYTESDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQVQEDENIVTYAANAS
883 ccatagagcaggcccagaccttcagcacttctacgcgggaagatggagt
  taaacagattcctctacagagtttcatcattctataaaaattcaccacc
  tgaccaccgatctctcacggacgagcgtgtcgacaacatcgcttttaa

344 TDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLVNSAQLDDQNTPYDVLAPEQLAN
1030 agagcaagaggactgggtaacgggttgaagctggcaactggcgcgccga
  caaacttcgcgatccataatccttttagcataaaaaccaattccaatca
  ttatcccgcttggatctggactgatggtctgattgccactcgacgacat

393 AIVI*
1177 gagat
      ctttg
      gtata

```

Abb. 3.42: Protein- und cDNA-Sequenz der Oxygenase (Zugriffsnummer FM200795)
(blau: potentielle N-Glykosidierungsstelle; **grün:** potentielle O-Glykosidierungsstelle;
fett: sichere Identifizierung der Peptidsequenz; unterstrichen: unsichere Identifizierung
 der Peptidsequenz, L = L oder I)

Am 5'-Bereich befand sich neben der Adaptersequenz der cDNA ein nicht-kodierender Bereich mit einer Länge von insgesamt 60 Nukleotiden (Abb. 3.43 a). Der nicht-kodierende Bereich am 3'-Ende setzte sich aus 80 Nukleotiden und dem Poly-A-Schwanz zusammen (Abb. 3.43 b).

a)

TATCAACGCAGAGTACGCGCGAAACCTGATGAGGAGCTGTTTAACTCAGACGGTGCC 60 bp

b)

GCGCATTTCATCACCGTATCCTGTACTATCTATGTATTTTCATGCACATATCTGAATAAAGCTTAAATTT
GGTTATACAAAT-PolyA 80 bp

Abb. 3.43: a) 5'-nicht-kodierender Bereich der cDNA der Oxygenase (unterstrichen: Adaptersequenz SMART II A); b) 3'-nicht-kodierender Bereich der cDNA der Oxygenase

3.8.5 Isolierung der cDNA der Oxygenase

Für die Amplifizierung der Gesamtsequenz der Oxygenase wurden ausgehend von der zusammengesetzten cDNA-Sequenz (Abb. 3.42) Primer abgeleitet (Tab. 3.16). Bei der Auswahl der Primer wurde darauf geachtet, dass das amplifizierte Produkt sowohl das Start- als auch das Stopcodon der Oxygenase enthielt.

Tab. 3.16: Primer zur Amplifizierung der Gesamtsequenz der Oxygenase

Nummer	Name	Sequenz	Schmelztemperatur
3879	Lox for ges 58	5'>CTG ATG AGG AGC TGT TTA ACG<3'	62 °C
3880	Lox rev ges 58	5'>CAG GAT ACG GTG ATG AAT GC<3'	60 °C

Die Gesamtsequenz der Oxygenase wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 56 °C und einer Elongationszeit von 90 s amplifiziert und in *E. coli* transformiert. Die übersetzte Aminosäuresequenz der klonierten Gesamtsequenz unterschied sich in einer Aminosäure von der zusammengesetzten cDNA-Sequenz der Oxygenase (Ser₂₇₈ → Pro) (Abb. 3.44).

```

komb. Seq.      MRYGCAAVALFYLTAMGKHLPLAIIPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNQANDWPWRY 60
klon. Seq.      MRYGCAAVALFYLTAMGKHLPLAIIPDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNQANDWPWRY 60
*****

komb. Seq.      AKTCVLSSDWALHEMIIHLNNTHLVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVVTLSLNL 120
klon. Seq.      AKTCVLSSDWALHEMIIHLNNTHLVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVVTLSLNL 120
*****

komb. Seq.      ARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESEFTNFDWKSLYVPADLESRGFPVDQLNSPKFHN 180
klon. Seq.      ARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESEFTNFDWKSLYVPADLESRGFPVDQLNSPKFHN 180
*****

komb. Seq.      YAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQAWCEMRSMGAGMTNFPE 240
klon. Seq.      YAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDTQIQAWCEMRSMGAGMTNFPE 240
*****

komb. Seq.      SITTVDDLVMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQTFVSNKPSALFSPLPTSIAQLQKYTE 300
klon. Seq.      SITTVDDLVMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQTFVPNKPSALFSPLPTSIAQLQKYTE 300
*****

komb. Seq.      SDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQVQEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAAD 360
klon. Seq.      SDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQVQEDENIVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAAD 360
*****

komb. Seq.      LKKLAAVFLVNSAQLDDQNTPYDVLAPEQLANAIVI 396
klon. Seq.      LKKLAAVFLVNSAQLDDQNTPYDVLAPEQLANAIVI 396
*****

```

Abb. 3.44: Vergleich der aus 2 Fragmenten zusammengesetzten cDNA-Sequenz (komb. Seq.) mit der klonierten Gesamtsequenz der cDNA der Oxygenase (klon. Seq.); **fett**: Aminosäureunterschied

3.8.6 Berechnung eines Strukturmodells

Die Aminosäuresequenzen der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* und der Röntgenkristallstruktur der Lipxygenase-1 aus der Sojabohne (*Glycine max*, PDB-ID 1YGE) wurden miteinander verglichen und ergaben eine Homologie von 20% (Abb. 3.45).

FM200795 1YGE	----- MFSAGHKIKGTVVLMFKNELEVNPDGSAVDNLFNLAFLGRSVSLQLISATKADAHGKGVGK 60
FM200795 1YGE	----- DTFLEGINTSLPTLGAGESAFNIHFWDGSMGIPGAFYIKNYMQVEFFLKSLEAISNQ 120
FM200795 1YGE	----- GTIRFVCNSWVYNTKLYKSVRIFFANHTYVPSETPAPLVSYREEELKSLRNGTGERKEY 180
FM200795 1YGE	----- DRIYDYDVYNDLGNPDKSEKLARVPLGGSSTFFYPRRGRTRGRGPTVTDPNTEKQGEVFYV 240
FM200795 1YGE	----- PRDENLGHLLKSKDALEIGTKLSQIVQPAFESAFDLKSTPIEFHSFQDVHDLYEGGIKLP 300
FM200795 1YGE	----- RDVISTIIPLPVIKELYRTDQGHILKFPQPHVVQVQSASAWMTDEEFAREMIAGVNPCVIR 360
FM200795 1YGE	-----MRYG--- 4 GLEEFPPKSNLDPAIYGDQSSKLTADSLDLGTYMDEALGSRRLFMLDYHDI FMPYVRQI 420 * *
FM200795 1YGE	-----CAAVLFYLTAMGKHLPLAII PDYKGSMAASVTIFNKRTNPLDISVNQANDW 56 NQLNSAKTYATRITLFLREDGTLKPVAIELSPLHSAGDLSAAVSQVVLPAKEGVEST--- 477 * : : : : * * . * : * : * * . * . : . : . * . * : . :
FM200795 1YGE	PWRYAKTCVLSDDWALHEMIIHLNNTHLVVEEAVIVAAQRKLSPSHIVFRLLLEPHWVVTLS 116 IWLAKAYVIVNDSCYHQLMSHWLNTHAAMEPFVIATHRHLSVLHPHYKLLTPHYRNNMN 537 * ** : * : . * . * : : * * * . * . : : * : * : * * * * * : : * * * : . :
FM200795 1YGE	LNALARSVLI-PEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESFTNFDWKSPLYVPADLESRGFPVDQLNS 175 INALARQSLINANGI IETTFLPKYSVEMSSAVYKNWVFTDQALPADLIKRGVAIKDPST 597 : * * * * . * * . : * : : : : : : : : : : : : * * : * * * * . * * : : : :
FM200795 1YGE	PK-----FHNAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASVAGDQIQAWCDEMRS 230 PHGVRLLIEDYPYAADGLEIWAAIKTWVQYVFP--LYYARDDVKNDSLEQHWKAEVEK 655 * : : : * . * * * * : : * : * : * : * . : : * * . * . * : : * * * * . *
FM200795 1YGE	MGAGMTN--FPESITTVDDLVMVTMCIHIAAPQHTAVNYLQYYQTFVSNKPSALFSPL 288 GHGDLKDKPWWPKLQTLLEDLVEVCLIIWIASALHAAVNFGQYPYGLIMNRPTASRRL 715 : : : : : : : * : * * : : * * * : * * * : * * : * : * : * * *
FM200795 1YGE	P-TSIAQLQKYTESDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQVQEDENIVTYAANASTDKD 347 PEKGTPEYEEMINNHEKAYLRITTSKLPTLISLSVIEILSTHASDEVYLGQRDNPHWTS 775 * . . : : : : . * * : : * : : : : * * : * . * . *
FM200795 1YGE	PIIASAGRQLAADLKKLAAVFLVN-----SAQLDDQNTPYDVLAP-----EQLAN 392 SKALQAFQKFGNKLKEIEEKLVRNNDPSLQGNRLGFPVQLPYTLTLYPSSEEGTLFRGIPN 835 . * : : . * * : : : . . : * . : * * : * * . : : *
FM200795 1YGE	AIV I 396 SIS I 839 : * *

Abb. 3.45: Vergleich von Aminosäuresequenzen der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (Zugriffsnummer FM200795) und der Röntgenkristallstruktur der Lipxygenase-1 aus *Glycine max* (PDB-ID 1YGE) mit potentiellen und identifizierten Funktionen (Minor *et al.* 1996)

(rot: potentielle Eisenbindung; blau: potentielle N-Glykosidierungsstelle;
grün: potentielle O-Glykosidierungsstelle; violett: Antigen determinante)

Das Strukturmodell der Oxygenase wurde mit SWISS-MODEL (Arnold *et al.* 2006) anhand dieses Sequenzvergleichs berechnet (Abb. 3.46).

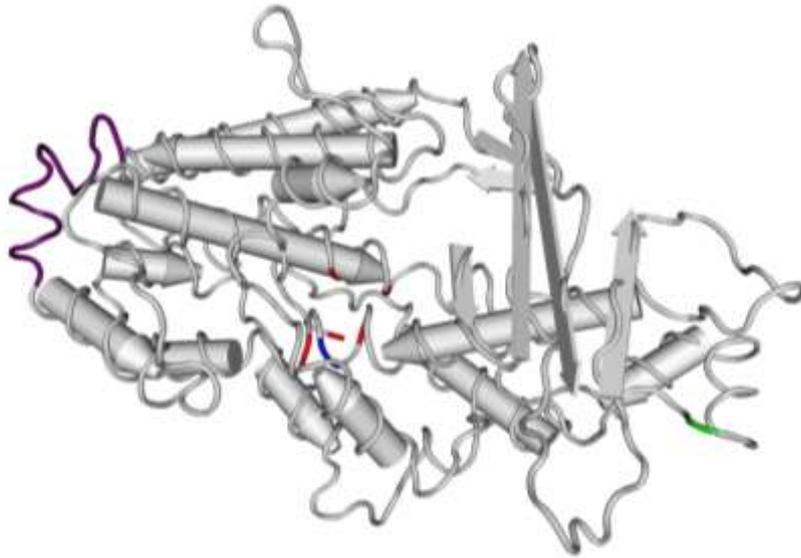


Abb. 3.46: Strukturmodell der Oxygenase

(rot: potentielle Eisenbindung His₇₈, His₈₃, His₂₆₃, Asn₂₆₇, Ile₃₉₆; blau: potentielle N-Glykosidierungsstelle Asn₈₀; grün: potentielle O-Glykosidierungsstelle Thr₂₉₀; lila: Antigen determinante)

Das Strukturmodell der Oxygenase verfügt über 2 Domänen. Die kleinere N-Domäne ist aus 2 antiparallelen β -Faltblattregionen aufgebaut. Die C-Domäne beinhaltet das katalytisch aktive Zentrum mit der Eisenbindungsregion und besteht aus 12 α -Helices. Anhand des Strukturmodells wurde die exponierte Aminosäuresequenz QDAQYYPDASVAGD als Antigen determinante für die Produktion polyklonaler Antikörper ausgewählt (s. 2.19.1).

3.8.7 Heterologe Expression in *Hansenula polymorpha*

Die Versuche zur heterologen Expression der Oxygenase (lox) wurde von der Firma Artes Biotechnology durchgeführt. Als Expressionsorganismus dienten die Hefen *Hansenula polymorpha* und *Arxula adenivorans*. Die cDNA-Sequenz der Oxygenase wurde an die Codon Usage der Hefen angepasst (Geneart). Für die intrazelluläre Expression wurden die Plasmide pFPMT-lox und

pFPMT-lox6His konstruiert. Die sekretorische Expression erfolgte mit den Plasmiden pFPMT-MFlox und pFPMT-MFlox6His. Die Hefe *Arxula adenivorans* wurde ausschließlich mit dem Konstrukt ohne Histidin-Tag (6His) transformiert. Das Screening auf positive Transformanten wurde mittels Dot Blot (native Proben, nicht gezeigt) bzw. Western Blot nach denaturierender SDS-PAGE unter Verwendung des Antiserums gegen die Oxygenase durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde resuspendiertes Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* eingesetzt. Für die Negativkontrolle wurde der entsprechende Vektor ohne Oxygenasegen in den Expressionsstamm transformiert.

In *Arxula adenivorans* wurde bei keinem der beiden Genkonstrukte ein oxygenase-spezifisches Produkt nachgewiesen. In *Hansenula polymorpha* wurden beide Konstrukte lox und MFlox exprimiert. Das Genkonstrukt lox führte zur Synthese eines löslichen Proteins von 45 kDa, das dem berechneten Molekulargewicht des transformierten Gens entspricht. Das Produkt von MFlox war 54 kDa groß und wurde nicht sekretiert, sondern verblieb zum größten Teil in unlöslicher Form innerhalb der Zelle. Das Lyophilisat von *Pleurotus sapidus* wies 2 Banden von 75 kDa und 50 kDa Größe auf, die mit dem oxygenase-spezifischen Antikörper reagierten (Abb. 3.47).

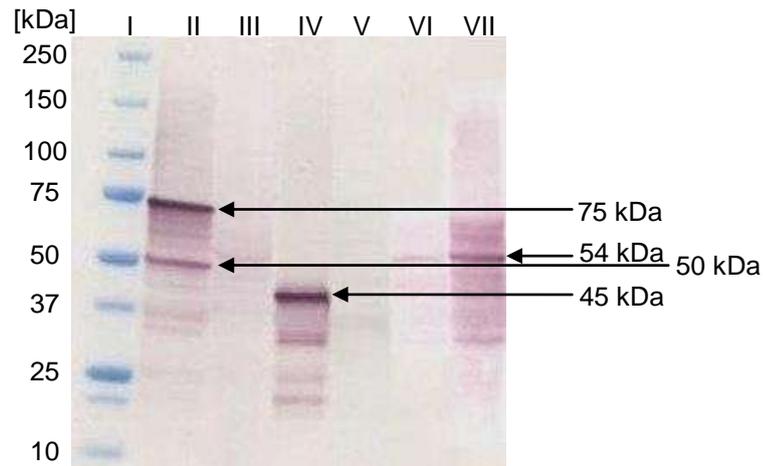


Abb. 3.47: Western Blot der sekretorischen und intrazellulären Expression der Oxygenase in *Hansenula polymorpha* (Artes Biotechnology);
 (I: Referenzproteine; II: Positivkontrolle; III: MFlox Kulturüberstand, 10x konz.; IV: lox, lösliche Fraktion des Zellextrakts; V: Negativkontrolle lox, lösliche Fraktion des Zellextrakts; VI: MFlox, lösliche Fraktion des Zellextrakts; VII: MFlox, unlösliche Fraktion des Zellextrakts)

Um den Abbau des C-Terminus durch den verwendeten Stamm von *Hansenula polymorpha* auszuschließen, wurde das Konstrukt pFPMT-lox6His exprimiert und mittels Western Blot untersucht. Der C-Terminus war intakt (Abb. 3.48).

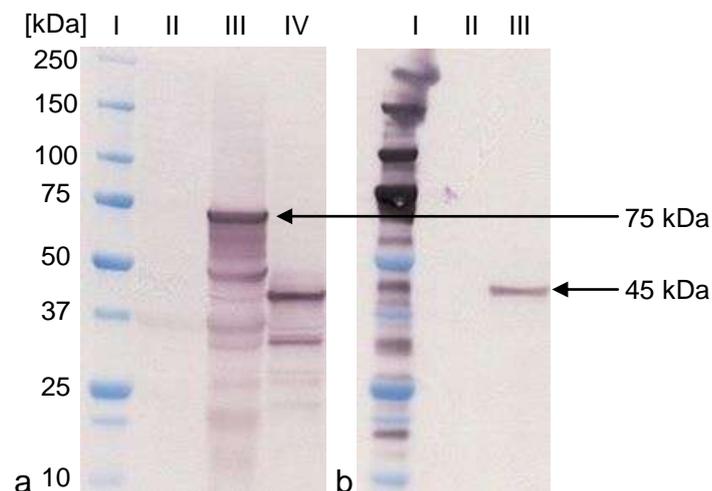


Abb. 3.48: Western Blot von lox6His in *Hansenula polymorpha* (Artes Biotechnology);
 (a: Antiserum gegen Oxygenase; I: Referenzproteine; II: Negativkontrolle; III: Positivkontrolle; IV: lox6His;
 b: Antiserum gegen His-Tag; I: Referenzproteine; II: Negativkontrolle; III: lox6His)

Eine Behandlung der nativen Oxygenase mit Endoglykosidase H führte zu keiner Veränderung des Molekulargewichts (Abb. 3.49).

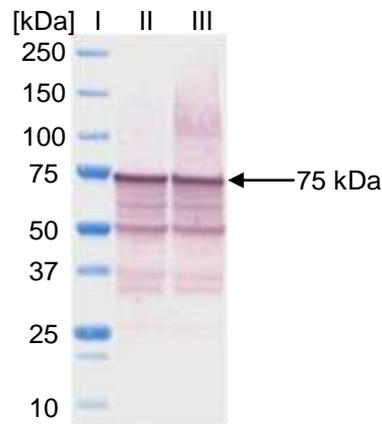


Abb. 3.49: Western Blot der nativen Oxygenase vor und nach der Behandlung mit Endoglykosidase H (Artes Biotechnology); (I: Referenzproteine; II: Oxygenase vor Behandlung; III: Oxygenase nach Behandlung)

3.8.8 Nachweis von Aktivität

Von 72 lox-Transformanten zeigten 40 eine deutliche Expression im Dot Blot und wurden sowohl auf die Transformationsaktivität von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton (s. 2.8.5) als auch auf Lipxygenaseaktivität (s. 2.8.6) getestet. Bei beiden Enzymassays wurde keine Aktivität nachgewiesen. Die Verwendung von lox6His-Transformanten führte ebenfalls zu keiner Aktivität.

4 Diskussion

4.1 Enzyme für die Weinbereitung

Der Einsatz von Enzymen für die Herstellung von Wein führt zu optimaler Qualität in kürzeren Produktionszeiten und ist weltweit Stand der Technik. In Europa ist ihre Verwendung durch die Durchführungsverordnung der EU-Kommission (EG) Nr. 606/2009 zur europäischen Marktorganisations-Verordnung für Wein (EG) Nr. 1493/1999 gesetzlich geregelt. Auf internationaler Ebene trägt die Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) zur Harmonisierung der bestehenden Praktiken und Normen bei. Derzeit sind in Europa mit Pektinase, Exo-1,3- β -Glucanase, Urease und Lysozym 4 Enzympräparate für die Weinbereitung zugelassen.

Der Traubenmost enthält neben den fruchteigenen Glykanen auch durch Mikroorganismen gebildete Glykane. Die Mikroorganismen siedeln sich während der Fruchtentwicklung auf den Trauben an. Als ein im Weinanbau gleichwohl gefürchteter wie erhsehnter Mikroorganismus gilt der Schimmelpilz *Botrytis cinerea*, der als Erreger der Graufäule bei Befall von unreifen Trauben den weiteren Reifungsprozess unterbindet. Die Folge können erhebliche Ernteverluste sein. Bei Befall im späten Reifestadium wird jedoch von Edelfäule gesprochen. Durch Perforation der Beerenhaut werden die traubeneigenen Zucker und charakteristischen Aromastoffe in der Traube konzentriert, was zu einer deutlichen Qualitätssteigerung des Weins führt. Darüber hinaus hat *Botrytis cinerea* die Eigenschaft, aus der Glucose der Traube das hochmolekulare β -1,3-1,6-D-Glucan Cinerean zu synthetisieren. Cinerean behindert im erheblichen Maß die während der Weinbereitung notwendigen Klär- und Filtrationsschritte. Die Verwendung des Enzympräparats Exo-1,3- β -Glucanase verbessert durch Hydrolyse des Cinereans die Klärung und erhöht die Filterleistung. Bedingt durch die Exoaktivität dieses Enzympräparats sind jedoch lange Standzeiten nötig. Inhalt dieser Arbeit war deshalb, im Rahmen eines Screenings von Basidiomyceten

eine Endo- β -Glucanase zu finden, die durch eine effizientere Endoaktivität zu einer Minimierung der Standzeit während der Cinereanhydrolyse führen soll.

4.2 Glykosidhydrolasen

4.2.1 Klassifizierung

Kohlenhydrate in Form von Mono-, Oligo- und Polysacchariden spielen in der Natur eine einzigartige Rolle. Insbesondere die Oligo- und Polysaccharide haben in den verschiedensten biologischen Prozessen eine große Bedeutung, die Strukturbildung, Metabolismus, Infektion und interzelluläre Erkennung betreffen (Kanemitsu und Kanie 1999). Die Vielfalt der Oligo- und Polysaccharide sowie der glykosidierten Moleküle wie Proteine, Lipide, Nukleinsäuren, Antibiotika spiegelt sich in der Anzahl der Glykosidhydrolasen wider (Cantarel *et al.* 2009). Die Klassifizierung dieser Enzyme erfolgt nach zwei verschiedenen Richtlinien. Die Empfehlung der International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) beruht auf einer Einteilung nach der Substratspezifität des Enzyms, die in EC-Nummern (Enzyme Commission) ausgedrückt wird. Eine Liste aller publizierten Enzyme nach EC-Nummern geordnet repräsentiert die regelmäßig aktualisierte Datenbank BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase, <http://www.brenda-enzymes.org>). O-Glykosidhydrolasen werden unter der EC-Nummer 3.2.1.x geführt, wobei x den Wert 1 bis 165 für die verschiedenen bisher bekannten Substratspezifitäten annimmt (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3aa.html>). Die Endoglucanasen, die für den Abbau des β -1,3-1,6-D-Glucans Cinerean in Betracht kommen, besitzen die EC-Nummern 3.2.1.6 (unspezifische Endo-1,3(4)- β -Glucanase) bzw. 3.2.1.39 (Endo-1,3- β -Glucanase).

Diese Methode der Klassifizierung wird jedoch jenen Enzymen nicht gerecht, die mehrere Substratspezifitäten aufweisen. Unspezifische Endo-1,3(4)- β -Glucanasen haben eine breite Substratspezifität, da sie das lineare β -1,3-D-Glucan

Curdlan, die verzweigten β -1,3-1,6-D-Glucane wie Laminarin und Cinerean ebenso wie das β -1,3-1,4-D-Glucan Lichenan hydrolysieren. Das β -1,4-D-Glucan Cellulose wird dagegen kaum abgebaut (Kawai *et al.* 2006b). Im Gegensatz dazu benötigen Endo-1,3- β -Glucanasen mindestens zwei aufeinanderfolgende 1,3-verknüpfte β -Glucosylreste, so dass keine oder nur minimale Aktivität gegenüber β -1,4-verknüpften Substraten vorhanden ist (Pesentseva *et al.* 2008). Zur Unterscheidung beider Enzymklassen sollte demzufolge eine Inkubation sowohl mit β -1,3- als auch mit β -1,3-1,4-D-Glucanen erfolgen. Liegt eine Aktivität bei beiden Substraten vor, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Endo-1,3(4)- β -Glucanase der Klasse 3.2.1.6. Endo-1,3- β -Glucanasen der Klasse 3.2.1.39 weisen dagegen im Vergleich zu β -1,3-D-Glucanen eine deutlich niedrigere Aktivität gegenüber β -1,3-1,4-D-Glucanen auf. Die Aktivität der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem β -1,3-1,6-D-Glucan Laminarin überprüft.

Eine alternative Methode zur Klassifizierung von Glykosidhydrolasen besteht basierend auf der Aminosäuresequenz der Enzyme in der Einordnung in Familien. Mit der immer größer werdenden Menge an verfügbaren Sequenzdaten und Röntgenkristallstrukturen führte Henrissat im Jahr 1991 diese Art der Klassifizierung von Glykosidhydrolasen und verwandten Enzymen ein (Henrissat 1991). Sie gibt die strukturellen Merkmale wider, die sowohl die Rahmenbedingungen für das Verstehen mechanistischer Vorgänge bilden, als auch die Aufklärung der evolutionären Beziehungen zwischen diesen Enzymen möglich macht. Auf dem Server für kohlenhydrataktive Enzyme (Carbohydrate-Active EnZYmes CAZY, <http://www.cazy.org/>) sind die bekannten Glykosidhydrolasen inklusive der Transglykosidasen zurzeit in 118 Familien gegliedert. 846 Sequenzen sind bislang keiner Familie zugeordnet. In der Datenbank CAZY machen die Glykosidhydrolasen neben Glykosidtransferasen, Polysaccharidlyasen, Kohlenhydratesterasen und Kohlenhydratbindemodulen (CBM) 47% aus und gehören dort zu den am besten biochemisch charakterisierten Enzymen (Cantarel *et al.* 2009). Da die Tertiärstruktur von Proteinen teilweise besser konserviert ist als ihre Aminosäuresequenz, wurden einige Glykosidhydrolasefamilien in 14 Clans

von GH-A bis GH-N eingruppiert. Ein Clan ist dabei eine Gruppe von Familien mit gemeinsamer Abstammung und wesentlicher Ähnlichkeit in der Tertiärstruktur samt konservierten katalytisch aktiven Aminosäuren und damit gleichem Reaktionsmechanismus (Henrissat und Bairoch 1996).

Unspezifische Endo-1,3(4)- β -Glucanasen mit der EC-Nummer 3.2.1.6 sind ausschließlich in der Familie 16 und dem Clan GH-B vorhanden. Charakteristisch für diesen Clan ist die Proteinfaltung in Form eines β -Jellyrolls (Abb. 4.1) und das Motiv der katalytisch aktiven Aminosäuren.

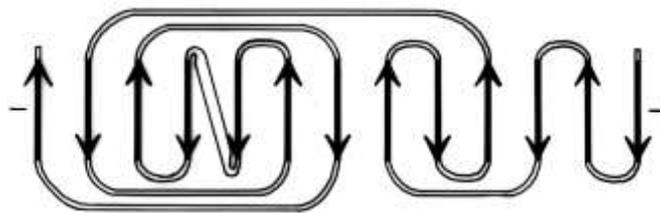


Abb. 4.1: Aufbau eines β -Jellyrolls am Beispiel von Concanavalin A (Richardson 1981)

Aufgrund von Unterschieden im katalytischen Motiv wird der Clan GH-B in 2 Untergruppen unterteilt. Das Motiv EXDXXE bildet zwischen den Aminosäuren Asparaginsäure (D) und der zweiten Glutaminsäure (E) einen β -Bulge, bei dem die erste Glutaminsäure mit der Asparaginsäure gemeinsam auf einem β -Faltblatt lokalisiert ist. Die zweite Glutaminsäure befindet sich nach dem β -Bulge auf einem weiteren β -Faltblatt (Abb. 3.31). Dagegen ist das Motiv EXDXE der zweiten Untergruppe um eine Aminosäure kürzer und bildet ein reguläres β -Faltblatt aus (Michel *et al.* 2001). Strohmeier *et al.* (2004) unterteilen die Glykosidhydrolasefamilie 16 ebenfalls basierend auf dem Unterschied im katalytischen Motiv in GH16a (4 Aminosäuren zwischen den beiden Glutaminsäuren) und GH16b (3 Aminosäuren zwischen den beiden Glutaminsäuren). Die von ihm im Jahr 2004 erstellte Datenbank GHDB (Glycoside Hydrolase Database, <http://www.ghdb.uni-stuttgart.de/>) ist seitdem nicht mehr aktualisiert worden, wird aber weiterhin zur Klassifizierung genutzt (Cao *et al.* 2010). Unspezifische Endo-1,3(4)- β -Glucanasen mit dem katalytischen Motiv EXDXXE gehören dem-

nach der Familie GH16a an. Bei den Datenbanken BRENDA und CAZY ist *Phanerochaete chrysosporium* als Quelle für diese Enzymklasse bzw. -familie aufgeführt.

Endo-1,3- β -Glucanasen mit der EC-Nummer 3.2.1.39 sind in den Glykosidhydrolasefamilien 16, 17 (Clan A, (β/α)₈-Barrel, katalytisches Motiv EXGXP), 55, 64 und 81 zu finden. Die Familien 55, 64 und 81 wurden bisher keinem Clan zugeordnet und trotz teilweise vorhandener Röntgenkristallstrukturen (Ishida *et al.* 2009) sind die katalytischen Motive nicht eindeutig. Sowohl bei BRENDA als auch bei CAZY ist keine Endo-1,3- β -Glucanase aus Pilzen bekannt. Beispielsweise wurden die bei BRENDA als Endo-1,3- β -Glucanasen aus *Trichoderma harzianum* aufgeführten Enzyme (Noronha und Ulhoa 2000, El-Katatny *et al.* 2001) hinsichtlich ihrer Substratspezifität nicht auf das β -1,3-1,4-D-Glucan Lichenan oder das β -1,4-D-Glucan Cellulose untersucht, so dass es sich bei diesen Enzymen auch um eine unspezifische Endo- β -1,3(4)-Glucanase handeln kann. Noronha und Ulhoa 2000 selbst bezeichneten das gereinigte Enzym als β -1,3-Glucanase und charakterisierten es hinsichtlich der Endo- oder Exoaktivität nicht näher. Ebenfalls bei BRENDA wurde eine Endo-1,3- β -Glucanase aus *Schizophyllum commune* erwähnt, die jedoch aufgrund ihrer Aktivität gegenüber Laminarin und Lichenan eher als Endo-1,3(4)- β -Glucanase bezeichnet werden sollte (Prokop *et al.* 1994). Bei CAZY werden unter der Glykosidhydrolasefamilie 16 und der Klasse 3.2.1.39 nach Genomsequenzierungen von *Aspergillus fumigatus* und *Yarrowia lipolytica* mutmaßliche Endo-1,3- β -Glucanasen aufgeführt (Weinstock und Bush 2009, Dujon *et al.* 2004). Bisher sind weder aus *Phanerochaete chrysosporium* noch aus Basidiomyceten im Allgemeinen Enzyme dieser Klasse bzw. Familie bekannt.

4.2.2 Unterscheidung Endo-/Exoaktivität

Für die Unterscheidung von Endo- und Exoaktivität einer Glykosidhydrolase stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (Tab. 4.1). Durch Variation der Eluenten und des Säulen- bzw. Dünnschichtmaterials bietet Methode 2) zahlrei-

che Möglichkeiten der Analyse, weshalb die angegebenen Referenzen nur ein Beispiel darstellen.

Tab. 4.1: Methoden zur Unterscheidung von Endo- und Exoaktivität einer Glykosidhydrolase

Methoden	Referenz
1) Hydrolyseprodukte von Laminarin: Verhältnis red. Zucker/Glucose	Dubourdieu <i>et al.</i> (1985)
2) Hydrolyseprodukte von Laminarin: HPLC-/HPAEC-/TLC-Analyse	Shu <i>et al.</i> (2006), McCarthy <i>et al.</i> (2003), Suzuki <i>et al.</i> (1987)
3) Substrate für Endoaktivität: Periodatoxidiertes Laminarin, Laminarin azur	Nelson <i>et al.</i> (1963), Philpott und Chapman (1977)
4) Substrate für Exoaktivität: 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid, D(-)-Salicin	Galán <i>et al.</i> (1999)
5) Inhibitor für Exo- β -Glucanasen: D-Gluconsäure-5-lacton	La Cruz <i>et al.</i> (1995)

Die Untersuchung der Hydrolyseprodukte von Laminarin nach erfolgter Enzyminkubation bestehen zum einen in der Ermittlung des Verhältnisses von reduzierenden Zuckern zu Glucose (Methode 1). Bei einer Exoglucanase, die vom nichtreduzierenden Ende des Glucans Glucose bzw. von verzweigten Glucanen auch Disaccharide abspaltet (Tsujiyama *et al.* 1981), entspricht das Verhältnis nahezu 1. Dagegen ist das Verhältnis bei einer Endoglucanase größer 1 und tendiert mit längerer Inkubationszeit zu 1 (Dubourdieu *et al.* 1985). Zum anderen werden die Hydrolyseprodukte chromatographisch analysiert, wobei anhand geeigneter Standards eine Bestimmung der gebildeten Hydrolyseprodukte über ihre Mengenverteilung hinaus erfolgen kann (Methode 2). In dieser Arbeit wurden die Methoden 2) und 3) verwendet. Für die HPLC wurde eine Größenausschluss säule gewählt (Methode 2) und als Substrat für die Endoaktivität diente Laminarin azur (Methode 3). Das β -1,3-1,6-D-Glucan Laminarin ist mit dem photometrisch erfassbaren Farbstoff Remazol Brillantblau R kovalent verknüpft, der zur Unlöslichkeit des Substrats führt. Enzymatische Endoaktivität führt durch Hydrolyse dieser Substrate zu einem gefärbten Überstand, der nach Abzentrifugieren

fugation der ungelösten Bestandteile photometrisch analysiert wird. Liegt eine enzymatische Exoaktivität vor, wird der Überstand mangels Substratabbau nicht gefärbt (Philpott und Chapman 1977). Bei periodatoxidiertem Laminarin sind die Glucoseeinheiten an den Enden der Haupt- und Seitenketten zum Dialdehyd geöffnet (Abb. 4.2), so dass Exo- β -Glucanasen im Gegensatz zu Endo- β -Glucanasen nicht mehr in der Lage sind, dieses Substrat zu hydrolysieren (Nelson *et al.* 1963).

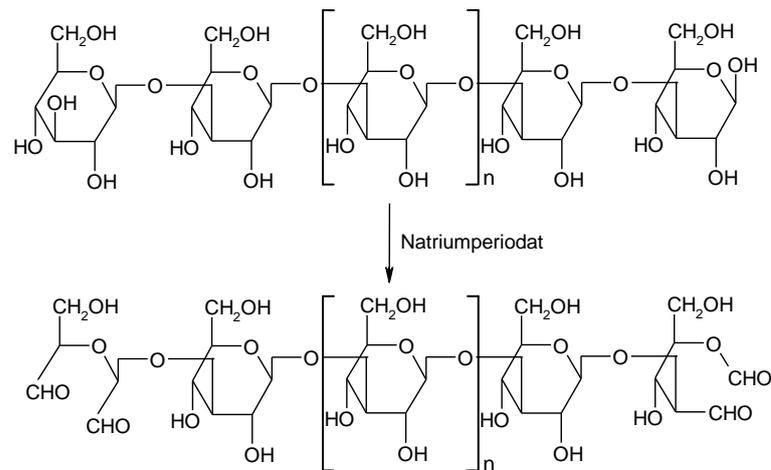


Abb. 4.2: Oxidation von β -1,3-D-Glucan mit Natriumperiodat; die 1,6-Verzweigungen von Laminarin sind zur besseren Übersichtlichkeit nicht gezeigt, sie reagieren wie das nichtreduzierende Ende dieser Abbildung; nach Nelson *et al.* (1963)

Die für Exo- β -Glucanasen spezifischen Substrate der Methode 4) setzen sich aus einer β -D-Glucopyranosideinheit und einem aromatischen Rest zusammen (Abb. 4.3).

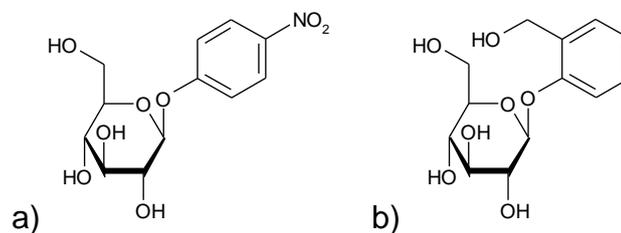


Abb. 4.3: Substrate zur Bestimmung von Exo- β -Glucanaseaktivität;
a) 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid; b) D(-)-Salicin

Im Fall von 4-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid führt die Hydrolyse zu einer Färbung des Reaktionsansatzes, die photometrisch verfolgt wird. Mit dem Substrat D(-)-Salicin werden die freigesetzten reduzierenden Zucker anschließend nach der Nelson-Somogyi-Methode umgesetzt und photometrisch analysiert (Galán *et al.* 1999).

Methode 5) beschreibt die Verwendung des D-Gluconsäure-5-lactons (Abb. 4.4) als Inhibitor für Exo- β -Glucanasen, um Rückschluss auf die Endo- oder Exoaktivität eines Enzyms zu ziehen (La Cruz *et al.* 1995). Von Chesters und Bull (1963b) wurde jedoch gezeigt, dass die Inhibierung von der Konzentration des Inhibitors und nicht vom Hydrolysetyp des Enzyms abhängt.

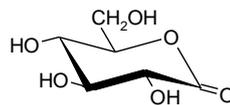


Abb. 4.4: D-Gluconsäure-5-lacton

4.3 Screening von Basidiomyceten auf Endo- β -Glucanaseaktivität

Im Reich der Pilze nimmt die Abteilung Basidiomyceten mit über 30.000 Arten einen bedeutenden Platz ein (Kirk *et al.* 2008). Vertreter dieser Abteilung sind als Pathogene von Pflanzen, Tieren und Menschen, als Mykorrhizen und als teilweise essbare Weiß- und Braunfäulepilze in den verschiedensten biologischen Nischen zu finden (Martinez *et al.* 2004). In Bezug auf ihr Arsenal an hydrolytischen Enzymen sind Weiß- und Braunfäulepilze besonders hervorzuheben und wurden infolgedessen in einem Screening auf Endo- β -Glucanaseaktivität untersucht. Weißfäulepilze sind in der Lage, mit Hilfe ihrer Enzymausstattung alle Bestandteile der Holzzellwand abzubauen, insbesondere jedoch das komplexe Polymer Lignin. Die Holzzellwand besteht vorwiegend aus Cellulose in einer Matrix von Hemicellulose und Lignin. Nach dem Abbau des bräunlichen Lignins sind bei dem verrotteten Holz die weißlichen Polysaccharide Cellu-

lose und Hemicellulose sichtbar, was zur Bezeichnung „Weißfäule“ führte (Blanchette 1991). Braunfäulepilze hydrolysieren überwiegend die Polysaccharide, greifen das Lignin hingegen in geringem Maß bis gar nicht an (Wilcox 1968). Neben Cellulose und Lignin sind in der Natur Glucane weit verbreitet. Glucane sind Polysaccharide bestehend aus mindestens 11 Glucose-Einheiten, die glykosidisch miteinander verknüpft sind und in Pflanzen, Algen, Bakterien, Pilzen und Hefen vorkommen. Die Zellwand von Hefen setzt sich aus β -1,3- und β -1,6-D-Glucanen zusammen (Klis 1994). Die Hyphen der meisten Pilze besitzen eine Hülle aus β -1,3-1,6-D-Glucan, die sowohl morphogenetische Veränderungen des Organismus als auch pathogene und symbiotische Beziehungen ermöglicht (Zeković *et al.* 2005). Die Fülle an Glucanasen zeigt sich in den veröffentlichten Genomsequenzen von zurzeit 10 Basidiomyceten, darunter die des Weißfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium* (Lavín *et al.* 2010). *Phanerochaete chrysosporium* ist in den Wäldern gemäßigter Klimazonen von Nordamerika, Europa und im Iran auf abgestorbenen Bäumen, heruntergefallenen Ästen und Sägespänen zu finden (Burdsall 1985). Das Genom des Stamms RP78 mit 30 Millionen Basenpaaren codiert schätzungsweise für mindestens 166 Glykosidhydrolasen. Über die für den Abbau von Cellulose und Hemicellulose notwendigen Enzyme hinaus werden zahlreiche weitere Enzyme für die Hydrolyse anderer Polysaccharide wie Stärke, Glykogen, Mutan (α -1,6-1,3-D-Glucan), Chitin und β -Glucane vermutet (Martinez *et al.* 2004).

Im Plattenscreening mit Cinerean als Kohlenstoffquelle zeigten mit 19 Basidiomyceten 2/3 der insgesamt 29 Basidiomyceten Wachstum und damit potentielle β -Glucanaseaktivität (s. 3.2.1). Diese 19 Basidiomyceten wurden in Submerskultur auf Endo- β -Glucanaseaktivität untersucht. Zur Bestimmung der Endo- β -Glucanaseaktivität wurde das Substrat Laminarin azur verwendet. Bei den 4 Basidiomyceten *Armillaria mellea*, *Hericium erinaceus*, *Lentinula edodes* und *Marasmius scorodonius* 166.44 war nach Wachstum auf den Screeningplatten in Submerskultur keine Endo- β -Glucanaseaktivität zu verzeichnen. Geringe Endo- β -Glucanaseaktivitäten wurden bei 11 Basidiomyceten gefunden. Hohe Endo- β -Glucanaseaktivitäten zeigten die 3 Basidiomyceten

Trametes sp., *Pleurotus sapidus* und *Polyporus* sp., die höchste Aktivität wies *Phanerochaete chrysosporium* auf (s. 3.2.2). Im Kulturverlauf von *Phanerochaete chrysosporium* trat am 10. Kulturtag maximale Endo- β -Glucanaseaktivität auf, die im weiteren Verlauf von 16 Tagen um diesen Wert schwankte (s. 3.3.1).

Die Bestimmung der Endo- β -Glucanaseaktivität mit Laminarin azur ist mit einer Inkubationsdauer von 40 Stunden sehr langwierig. Für die Charakterisierung und Reinigung der Endo- β -Glucanase wurde daher ein Aktivitätstest mit einer Inkubationszeit von 15 min ausgewählt. Nach Inkubation des Substrats Laminarin mit der enzymhaltigen Probelösung wurden die gebildeten reduzierenden Zucker mit einem Reagenz umgesetzt und photometrisch analysiert. Für die Umsetzung der reduzierenden Zucker sind in der Literatur hauptsächlich zwei verschiedene Verfahren beschrieben. In der Methode nach Miller (1959) reagieren die reduzierenden Zucker mit einer alkalischen 3,5-Dinitrosalicylsäurelösung (DNS-Assay). Ein alternatives Verfahren nach Nelson und Somogyi (Nelson 1944, Somogyi 1952) basiert auf der Reduktion einer alkalischen Kupfer(II)-Lösung zu Kupfer(I)-oxid, das in einem zweiten Reaktionsschritt Ammoniumarsenomolybdat zu Molybdänblau reduziert. Die Menge des reduzierten Kupfers ist dabei direkt proportional zu der Menge der reduzierenden Zucker. Im Gegensatz dazu verhält sich das Reagenz des DNS-Assays nicht stöchiometrisch zu den reduzierenden Zuckern, sondern ist abhängig vom Polymerisationsgrad des Substrats. Zudem ist der DNS-Assay störanfälliger gegenüber Substanzen aus dem Kulturmedium und weniger empfindlich als die Nelson-Somogyi-Methode (Breuil und Saddler 1985). Daher wurde in dieser Arbeit für die Bestimmung der Gesamtglucanaseaktivität die Nelson-Somogyi-Methode eingesetzt.

Die Glucanaseaktivität im Kulturverlauf von *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes* sp., *Pleurotus sapidus* und *Polyporus* sp. war ebenfalls bei *Phanerochaete chrysosporium* am höchsten und bestätigte somit das Ergebnis des Screenings in Submerskultur (s. 3.3.2).

Phanerochaete chrysosporium ist einer der am besten untersuchten Weißfäulepilze. In Bezug auf den Cellulose- und Ligninabbau wurden bereits mehrere Cellulasen (Henriksson *et al.* 1999, Uzcategui *et al.* 1991a), Cellobiohydrolasen (Uzcategui *et al.* 1991b), Endoxylanasen (Decelle *et al.* 2004), α -Galactosidasen (Hart *et al.* 2000), eine Xyloglucanase (Ishida *et al.* 2007), eine 1,3- β -Glucosidase (Kawai *et al.* 2006a) sowie eine Endo-1,3(4)- β -Glucanase (Kawai *et al.* 2006b) auf proteinbiochemischer und molekularbiologischer Ebene untersucht. Das β -1,3-1,6-D-Glucan Cinerean diente bislang nicht als Induktor von Enzymen. Die Genregulation von Glykosidhydrolasen hängt jedoch in großem Maße von den Kultivierungsbedingungen ab (Vanden Wymelenberg *et al.* 2009). Die mit Cinerean induzierte Glucanaseaktivität aus *Phanerochaete chrysosporium* wurde daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher charakterisiert.

4.4 *Phanerochaete chrysosporium* L13-2

Die ITS-Regionen (Internal Transcribed Spacer) von ribosomaler DNA sind hoch variable Sequenzen, die mittels PCR Analysen der Unterscheidung von Pilzarten dienen (Martin und Rygiewicz 2005). Zur Identifizierung und phylogenetischen Einordnung des Basidiomyceten L13-2 wurden die Primer ITS5 und ITS4 nach White *et al.* (1990) verwendet. Die 5,8S rDNA inklusive der flankierenden ITS-Regionen wurde amplifiziert und sequenziert (Abb. 4.5).

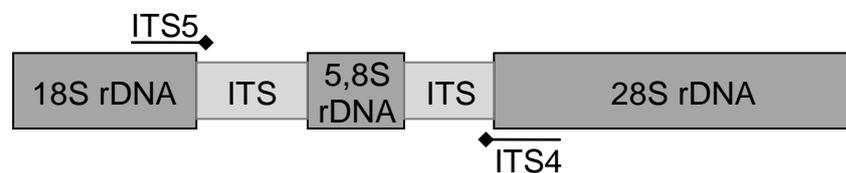


Abb. 4.5: Position des Vorwärtsprimers ITS5 und des Rückwärtsprimers ITS4 in der ribosomalen Kasette, bestehend aus der kleinen Untereinheit 18S rDNA, den ITS-Regionen, der 5,8S rDNA und der großen Untereinheit 28S rDNA; modifiziert nach White *et al.* (1990)

Die DNA-Sequenz der 5,8S rDNA mit den ITS-Regionen wies eine Homologie von 99% zu 5 Stämmen von *Phanerochaete chrysosporium* auf. Die Identität des Stammes L13-2 wurde nicht als *Lentinellus cochleatus* bestätigt, sondern erwies sich als *Phanerochaete chrysosporium*.

Die phylogenetische Einordnung des Stammes L13-2 erfolgte nach Singh und Chen (2008). *Phanerochaete chrysosporium* L 13-2 ist mit den 6 Stämmen KCTC 6728, ATCC 24725, KCTC 6293, AFTOL-ID 776, PV1 und FCL 208 nah verwandt. Eine davon abgegrenzte Gruppe bilden die beiden Stämme IFM 47473 und IFM 47494. Dies läßt auf eine hohe Variabilität innerhalb der Unterarten von *Phanerochaete chrysosporium* schließen, die auf das Expressionsmuster von Enzymen erweitert werden kann (Singh und Chen 2008).

4.5 Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*

Seit den 60er Jahren wird *Phanerochaete chrysosporium* als Modellorganismus für die Weißfäule intensiv erforscht (Ahlgren und Eriksson 1967). Im Mittelpunkt des Interesses stehen extrazelluläre hydrolytische und oxidative Enzyme, die für den Weißfäuleprozess verantwortlich sind (Sato *et al.* 2007). Zum einen wurde die Sekretion dieser Enzyme unter Stickstoff- oder Kohlenstofflimitierung untersucht, zum anderen erfolgte die direkte Induktion mit Cellulose, Laminarin oder verschiedenen Holzsubstraten.

Phanerochaete chrysosporium und andere Pilze sind in der Lage, den sie umgebenden Glucosegehalt zu kontrollieren. So wird die Katabolitrepression von Hydrolasen und Oxidasen durch überschüssige Glucose vermieden, indem die Pilze aus vielen Glucosemolekülen ein Glucan aufbauen. Bei Glucosemangel werden wiederum Glucanasen induziert, die zum Glucanabbau führen (Bes *et al.* 1987, Stahmann *et al.* 1992). Unter Kohlenstofflimitierung werden schließlich vermehrt β -1,3-Glucanasen zum Abbau des β -1,3-Glucans der Pilzzellwand induziert. Im besonderen Maße wird die Exo-1,3- β -Glucanase Lam55 exprimiert

(Bes *et al.* 1987, Vanden Wymelenberg *et al.* 2009). Bei Stickstoffmangel werden die Gene der Glykosidhydrolasen dagegen nicht hochreguliert (Vanden Wymelenberg *et al.* 2009).

Die mit Cellulose oder Holz der Roteiche induzierten Sekretionsmuster unterschieden sich nicht voneinander (Sato *et al.* 2007). Mit diesen Substraten wurden neben Peroxidasen und Proteasen über 30 verschiedene Glykosidhydrolasen sekretiert, darunter Mitglieder der Glykosidhydrolasefamilie 16 (Vanden Wymelenberg *et al.* 2005). Ein Minimalmedium mit Laminarin als Kohlenstoffquelle führte überwiegend zu der Sekretion einer unspezifischen Endo-1,3(4)- β -Glucanase und einer weiteren nicht näher untersuchten β -1,3-Glucanase (Kawai *et al.* 2006b). Die Peptidsequenzierung der unspezifischen Endo-1,3(4)- β -Glucanase erfolgte nach Konzentrierung des Kulturüberstands mittels Ultrafiltration und anschließender SDS-PAGE.

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Induktionsmedium wurden neben dem erwünschten Enzym nur wenige weitere Proteine sekretiert, was die Reinigung der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* bis zur elektrophoretischen Homogenität mit einem chromatographischen Schritt ermöglichte (Abb. 3.21). Nach Konzentrierung des Kulturüberstands und anschließender Gelfiltrationschromatographie wurde in einer Fraktion Glucanaseaktivität nachgewiesen (3.4.1). Das gereinigte Enzym hatte bei einer Anreicherung von 5,2 und einer Ausbeute von 4,4% einen Anteil von 0,8% am Gesamtprotein des Kulturüberstands (Tab. 3.6). Die geringe Wiederfindung der auf die Säule gegebenen Aktivität von 4,0% kann auf einen Verdünnungseffekt zurückgeführt werden und hätte gegebenenfalls durch Konzentrierung oder Zugabe von Polyethylenglycol als „molecular crowder“ erhöht werden können (Minton 2000). Die Konzentrierung mittels Ultrazentrifugation hatte einen Ausbeuteverlust von knapp 70% zur Folge. Diese Problematik bei Verwendung kommerziell erhältlicher Ultrafiltrationseinheiten für die Reinigung von β -Glucanasen ist beschrieben (Martin *et al.* 2006). Vermutet werden Enzymbindestellen auf der Membranoberfläche, die zur irreversiblen Bindung der Enzyme führen. Geeignete

te Membranen für die Konzentrierung von Glucanasen wurden bisher nicht erwähnt (Martin *et al.* 2007). Galán *et al.* (1999) und Shu *et al.* (2006) nutzten als ersten Reinigungs- und Konzentrierungsschritt von Endo- β -Glucanasen aus Basidiomyceten alternativ zu Ultrafiltrationseinheiten die Ammoniumsulfatfällung. Die verwendeten Kultivierungsmedien enthielten jedoch kein Glucan, das durch Ammoniumsulfat ebenfalls ausfällt und die weitere Aufarbeitung stört (Li *et al.* 2006). Die Ausbeute einer Endo- β -Glucanase aus *Agaricus bisporus* lag nach weiterer Reinigung mittels Gelfiltrationschromatographie und präparativer nativer PAGE bei 2,9%, der Anreicherungsfaktor betrug 17,9 (Galán *et al.* 1999). Eine Endo- β -Glucanase aus *Agaricus brasiliensis* wurde mittels hydrophober Interaktionschromatographie um den Faktor 13,1 mit einer Ausbeute von 6,7% gereinigt (Shu *et al.* 2006).

4.5.1 Proteinbiochemische Eigenschaften

Die proteinbiochemischen Eigenschaften von β -Glucanasen aus Pilzen sind mit wenigen Ausnahmen sehr ähnlich. Das pH-Optimum liegt häufig im sauren pH-Bereich zwischen 4,0 und 6,0 (Pitson *et al.* 1993). Für kurze Inkubationszeiten wurden T-Optima von bis zu 60 °C ermittelt (Marcović *et al.* 1991). Bei β -Glucanasen aus Ascomyceten bewegen sich die isoelektrischen Punkte zwischen 4,0 und 8,0, wohingegen die Werte für β -Glucanasen aus Hefen in einem engeren Bereich zwischen 3,0 und 4,5 liegen. Das Molekulargewicht von β -Glucanasen aus Pilzen variiert stark zwischen 20 kDa und 80 kDa (Pitson *et al.* 1993). Die Einordnung der Enzyme nach IUBMB erfolgt nach Inkubation mit unterschiedlich verknüpften Glucanen. Für Enzyme der Klassen 3.2.1.6 und 3.2.1.39 aus Basidiomyceten wurden die Optima und isoelektrischen Punkte bisher nur von einer unspezifischen Endo-1,3(4)- β -Glucanase (EC-Nummer 3.2.1.6) aus *Schizophyllum commune* beschrieben, die bei BRENDA trotz der Aktivität gegenüber dem β -1,3-1,4-D-Glucan Lichenan offensichtlich falsch in die Klasse 3.2.1.39 eingeordnet wurde. Dieses Enzym besitzt ein Molekulargewicht von 36 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 3,9. Die Optima liegen bei einem pH-Wert von 5,5 und einer Temperatur von 50 °C (Prokop *et al.* 1994).

Kawai *et al.* (2006b) untersuchte eine heterolog exprimierte unspezifische Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* mit einem Molekulargewicht von 36 kDa hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber unterschiedlich verknüpften und verzweigten Substraten und ordnete dieses Enzym der Klasse 3.2.1.6 sicher zu. Eine durch horizontalen Gentransfer aus Bakterien erworbene Endo-1,3- β -Glucanase aus dem Kiefernholznematoden *Bursaphelenchus xylophilus* mit einem Molekulargewicht von 26 kDa zeigte mit dem ebenfalls in dieser Arbeit genutztem Citrat-Phosphat-Puffer mit pH 4,9 und 65 °C die gleichen Optima wie die Endo- β -Glucanase dieser Arbeit (Kikuchi *et al.* 2005). Bei einem pH-Optimum von 5,0 (s. 3.3.3) wurde ein Temperatur-Optimum von 63 °C bis 68 °C (s. 3.3.4) ermittelt. Dieser hohe Temperaturbereich lässt eine Stabilisierung des Enzyms durch das Substrat vermuten (Bodenmann *et al.* 1985). Im Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium* wurden nach isoelektrischer Fokussierung 2 Enzyme nachgewiesen, die Aktivität gegenüber Laminarin zeigten. Die jeweiligen isoelektrischen Punkte betragen 6,7 und 5,5 (s. 3.3.5). Das Molekulargewicht der gereinigten Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* betrug 39 kDa (GFC) bzw. 42 kDa (denaturierende SDS-PAGE) (s. 3.4.1).

Chesters und Bull (1963a) unterteilten β -Glucanasen nach papierchromatographischer Analyse der Hydrolyseprodukte von Laminarin in 3 Typen: Exo- β -Glucanase (hoher Glucoseanteil und Spuren von Laminaridextrinen), Endo- β -Glucanase (Spuren von Glucose und hoher Anteil von Laminaridextrinen) und Endo-Exo- β -Glucanase (hohe Anteile von Glucose und Laminaridextrinen). Bei β -1,3-1,6-D-Glucanen stoppen einige Exo- β -Glucanasen nicht an der β -1,6-Verzweigung, sondern spalten neben Glucose auch das β -1,6-Disaccharid Gentiobiose ab (Tsujiyama *et al.* 1981). Das Phänomen der Endo-Exo- β -Glucanase ist auf unzureichende Enzymreinigung und damit synergistische Wirkung mehrerer β -Glucanasen zurückzuführen (Pitson *et al.* 1993). Dieser Sachverhalt spiegelt sich in den Größenausschlusschromatogrammen dieser Arbeit wider (s. 3.3.6). Während mit den Exo- β -

Glucanasepräparaten aus *Penicillium funiculosum* Laminarin überwiegend zu Glucose abgebaut wurde, erfolgte die Hydrolyse von Laminarin mit der Endo- β -Glucanase (EC 3.2.1.39) aus der Weinbergschnecke *Helix pomatia* überwiegend zu Laminaridextrinen unterschiedlicher Größe, die im weiteren Verlauf der Inkubation zu Glucose abgebaut wurden. Auffällig war die Anreicherung von Abbauprodukten bei einer Retentionszeit von ca. 10 min, die nach Kalibrierung der Säule einem Molekulargewicht von 514 Da und damit einer Laminaritriose entsprechen könnte.

Hydrolyseprodukte dieser Größe wurden ebenfalls bei den Inkubationen mit den Exo- β -Glucanasepräparaten aus *Trichoderma longibrachiatum* und *Trichoderma harzianum*, der Endoglucase der TU Braunschweig und dem Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium* erhalten. Insbesondere bei den Exo- β -Glucanasepräparaten ist dies auf die Tatsache zurückzuführen, dass es sich um ungereinigte Enzympräparate mit entsprechenden Nebenaktivitäten handelt (Abb. 3.9). Beispielsweise setzt sich das in der Weinherstellung häufig verwendete Produkt Glucanex neben einer 1,3- β -Glucosidase (EC 3.2.1.58) aus einer Exo-1,3- β -Glucanase, einer Endo-1,3- β -Glucanase und einer Exo-1,6- β -Glucanase zusammen (Villettaz *et al.* 1984). Generell war das Auflösungsvermögen der verwendeten Größenausschluss säule nicht ausreichend, um die gebildeten Laminaridextrine voneinander zu trennen. Zudem war eine exakte Bestimmung des Molekulargewichts der Hydrolyseprodukte aufgrund der Verwendung des α -1,6-D-Glucans Dextran als Standard nicht möglich. Dennoch ist anhand der Analyse mittels Größenausschlusschromatographie eine Einstufung in Exo- oder Endoaktivität von β -Glucanasepräparaten möglich. Die Anreicherung von Abbauprodukten bei einer Retentionszeit von ca. 10 min im Größenausschlusschromatogramm deutete auf eine Endoaktivität hin. Bezüglich des Kulturüberstands von *Phanerochaete chrysosporium* wurde das Ergebnis des Screenings in Submerskultur, bei dem mit Hilfe des Substrats Laminarin azur eine Endo- β -Glucanaseaktivität nachgewiesen wurde, bestätigt.

4.5.2 Molekularbiologische Charakterisierung

Die gereinigte Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* wurde tryptisch verdaut und *de novo* ansequenziert (s. 3.4.2). Die 2. Peptidsequenz VNYVQNQATAVAK (Tab. 3.7) wurde neben anderen Sequenzen bereits von Vanden Wymelenberg *et al.* (2005) und Sato *et al.* (2007) nach Sekretomanalysen von *Phanerochaete chrysosporium* Kulturen mit Cellulose bzw. Holz erwähnt (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Bekannte Peptidsequenzen der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*

Referenz	Peptidsequenzen
Vanden Wymelenberg <i>et al.</i> (2005)	VNYVQNQATAVAK AYTTHVAIIDVR NAYWDIAAVR
Sato <i>et al.</i> (2007)	VNYVQNQATAVAK ADDTTVLSPSGPGR

In der Aminosäuresequenz des Enzyms sind alle in der Literatur beschriebenen Peptidsequenzen enthalten (Abb. 4.6).

MRPTLTSFVALAYCLSGALAGSYTLIDNYVGSTFLSAFVHEAIADPTHGRVNYVQNQATAV
AKNLTFASGNTLILRADDTTVLSPSGPGRNSVRIKRSVKAYTTHVAIIDVRHMPQGCGTWP
AFWETDGSNWPNGGEVDIIEGVNDQSPNAMTLHTGANCNMPASRAETGTPTGLNCDVNTD
GNTGCGVQAPTANSYGPALNAIGGWYAMERTNNFIKVVFFPRNGNTPSDLKNGASSINT
DNWGTPTAFFPNTNCDIGSHFDQNNIIINLTFCGDWAGAVYGNSGCPSTCVDYVNNNPSA
FKNAYWDIAAVRVYE*

Abb. 4.6: Aminosäuresequenz der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*; unterstrichen: in der Literatur beschriebene Peptidsequenzen (vgl. Tab. 4.2)

Abbas *et al.* (2005) induzierte mit Roteichenholz die Expression einer unspezifischen Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*, die auf Aminosäuresequenzebene eine Homologie von 78% zu der Endo- β -Glucanase aufweist (s. 3.6.4). Dieselbe Endo-1,3(4)- β -Glucanase wurde von Kawai *et al.* (2006b) mit Laminarin induziert und in *Pichia pastoris* heterolog exprimiert. Die

Regulation der Expression von Endo-1,3(4)- β -Glucanase und Endo- β -Glucanase ist unterschiedlich, aber noch nicht verstanden (Kawai *et al.* 2006b, Vanden Wymelenberg *et al.* 2009).

Die von Vasur *et al.* (2006) generierte Röntgenkristallstruktur der Endo-1,3(4)- β -Glucanase (PDB-ID 2CL2) diente der Berechnung des Strukturmodells der Endo- β -Glucanase (Abb. 3.31). Zudem existieren Röntgenkristallstrukturen im Komplex mit den Hydrolyseprodukten von Lichenan und Laminarin (Vasur *et al.* 2009). Die Endo- β -Glucanase weist alle Sequenzmerkmale der Endo-1,3(4)- β -Glucanase an identischen Stellen auf (Abb. 3.30).

Beide Enzyme besitzen das für die Glykosidhydrolasefamilie 16 charakteristische katalytische Motiv EXDXXE. Die Aminosäuren Glu₁₁₅ und Glu₁₂₀ der Endo-1,3(4)- β -Glucanase bzw. Glu₁₃₅ und Glu₁₄₀ der Endo- β -Glucanase entsprechen dem Nukleophil sowie der katalytischen Säure und korrespondierenden Base. Asp₁₁₇ bzw. Asp₁₃₇ ist hoch konserviert und dient der Stabilisierung des Nukleophils (Kawai *et al.* 2006b). Zunächst wird der vom Glucan abzusplattende Kohlenhydratrest durch die Koordination des glykosidischen Sauerstoffatoms mit der katalytischen Säure Glu₁₂₀ aktiviert. Anschließend erfolgt ein nukleophiler Angriff durch Glu₁₁₅, der zu der Bildung eines Glykosidesters führt. Der so abgesplattene Kohlenhydratrest diffundiert vom aktiven Zentrum weg und wird durch ein Wassermolekül ersetzt. Dieses greift unter Deprotonierung durch die korrespondierende Base der katalytischen Säure nukleophil am anomeren Zentrum an und spaltet die Esterbindung. Da beide Substitutionen unter Konfigurationsumkehr ablaufen, wird die Konfiguration insgesamt erhalten (Heightman und Vasella 1999). Der ursprünglich von Koshland (1953) vorgeschlagene Reaktionsmechanismus der hydrolytischen Spaltung von glykosidischen Verbindungen wurde nach zahlreichen Untersuchungen um Übergangszustände ergänzt, die einem Oxycarbenium-Ion ähneln und zwischen den Substitutionen durchlaufen werden (Sinnott 1990, Vasella *et al.* 2002, Abb. 4.7).

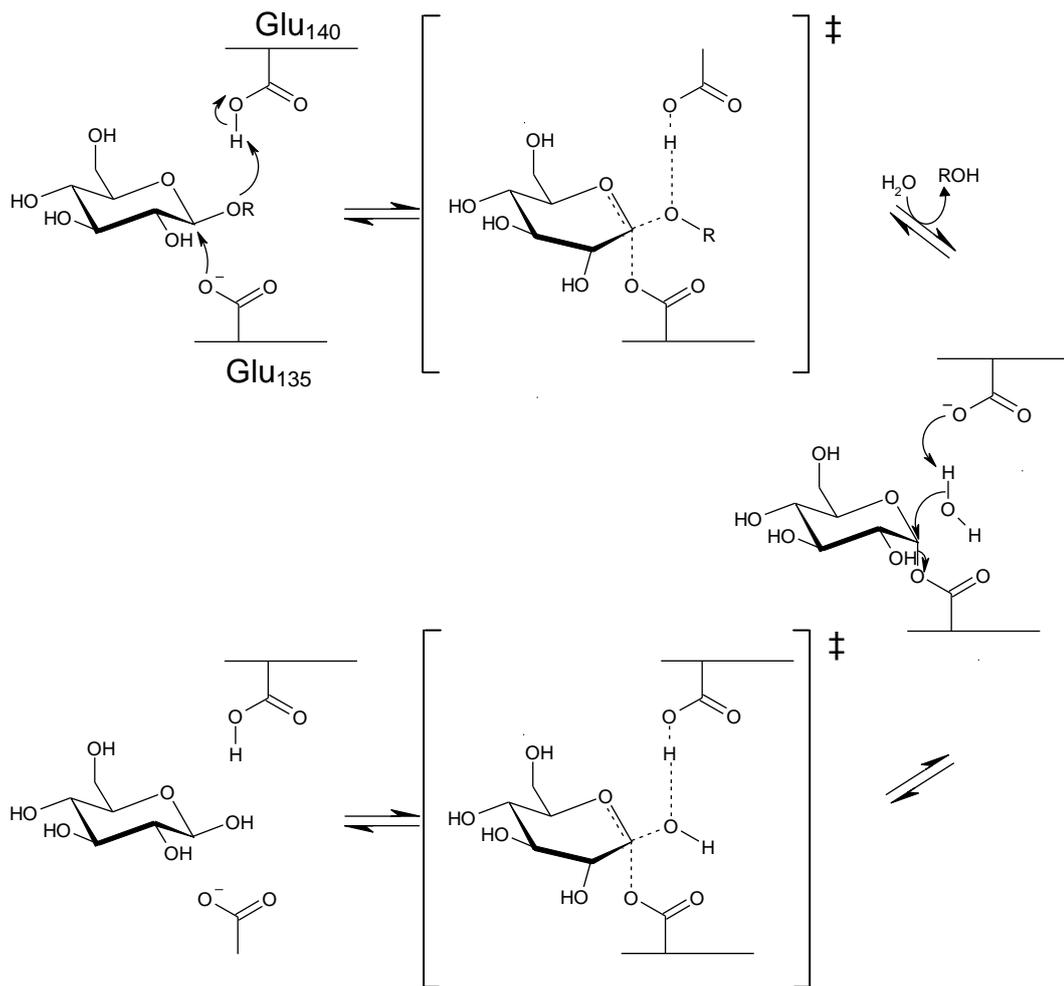


Abb. 4.7: Konfigurationserhaltender Reaktionsmechanismus von β -Glykosidasen mit den potentiell katalytisch aktiven Aminosäuren Glu₁₃₅ (Nukleophil) und Glu₁₄₀ (Säure/Base) der Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*; modifiziert nach Yip und Withers (2004)

Sowohl die Endo-1,3(4)- β -Glucanase als auch die Endo- β -Glucanase besitzen 2 potentielle N-Glykosidierungsstellen NXS/T. Vasur *et al.* (2006) identifizierte an Asn₄₃ ein verzweigtes Heptasaccharid mit 2 N-Acetylglucosaminen, 1 β -Mannose-Einheit und 4 α -Mannose-Einheiten, von denen eine verzweigt ist (Abb. 4.8).

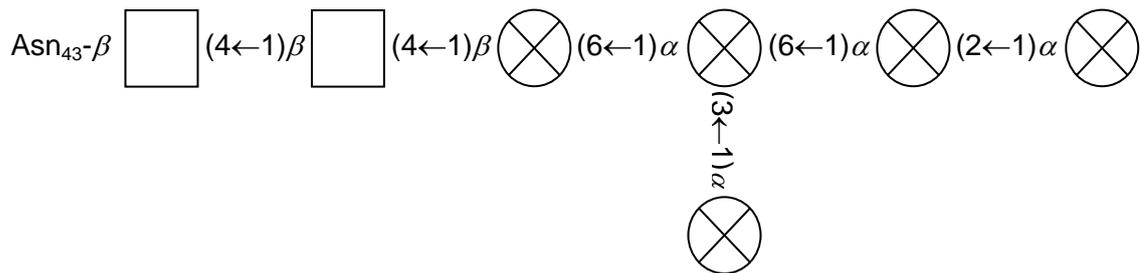


Abb. 4.8: N-Glykosidierung der Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* an Asn_{43} ; modifiziert nach Vasur *et al.* (2006)
 (□ – N-Acetylglucosamin; ⊗ – Mannose)

Die Glykanstruktur der Endo- β -Glucanase setzt sich nach Sequenzierung der Peptide mittels LC-MS/MS vermutlich aus 2 N-Acetylglucosaminen und 6 Mannose-Einheiten zusammen.

Die potentielle Glykosidierungsstelle an Asn_{250} in der Nähe des katalytischen Zentrums ist nicht glykosidiert. Eine Glykosidierung an dieser Stelle hätte eine Besetzung der Bindungsstellen -1 und -2 zur Folge, so dass keine Substratbindung mehr möglich wäre und in einem inaktiven Enzym resultieren würde.

Von Davies *et al.* (1997) wurde eine Nomenklatur von Kohlenhydrat-Bindungsstellen in Glykosidhydrolasen vorgeschlagen. Die Bindungsstellen werden von -n bis +n bezeichnet, wobei n einer ganzen Zahl entspricht. Die Spaltung des Substrats findet zwischen den Bindungsstellen -1 und +1 statt. Ausgehend von der Spaltstelle werden die Bindungsstellen in Richtung des nichtreduzierenden Endes mit negativen Zahlen belegt, in Richtung des reduzierenden Endes mit positiven (Abb. 4.9).

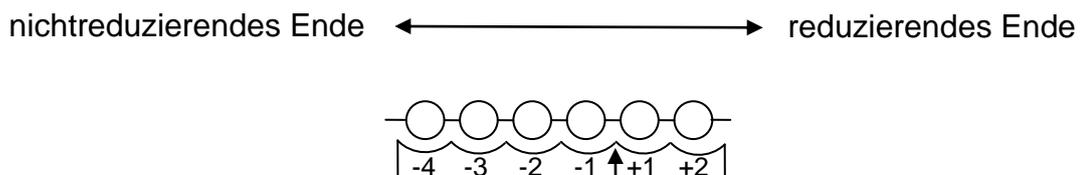


Abb. 4.9: Schema der Kohlenhydrat-Bindungsstellen von Endo-Polysaccharidasen, der Pfeil markiert die Spaltstelle; modifiziert nach Davies *et al.* (1997)

Charakteristisch für alle O-Glykosidhydrolasen ist ein hydrophober Bereich in Form einer aromatischen Aminosäure an der Bindungsstelle -1 (Nerinckx *et al.* 2003). Bei der Endo-1,3(4)- β -Glucanase und der Endo- β -Glucanase handelt es sich um Tryptophan (Trp₁₀₃ bzw. Trp₁₂₃). An der Bindungsstelle -2 befindet sich ein weiterer Tryptophanrest (Trp₁₁₀ bzw. Trp₁₃₀). Trp₁₀₃ und Trp₁₁₀ sind in einem rechten Winkel zueinander angeordnet und entsprechen damit der Geometrie einer β -1,3-Verknüpfung. Dies schließt eine β -1,4-Verknüpfung des Substrats an den Bindungsstellen -1 und -2 aus. Dadurch vermag die Endo-1,3(4)- β -Glucanase nur dann eine β -1,4-Verknüpfung zu spalten, wenn sich diese in Nachbarschaft zu β -1,3-Verknüpfungen befindet. Dementsprechend wird das β -1,3-1,4-D-Glucan Lichenan hauptsächlich zu 4-O-Glucosyl-Laminaribiose abgebaut (Kawai *et al.* 2006b, Abb. 4.10).

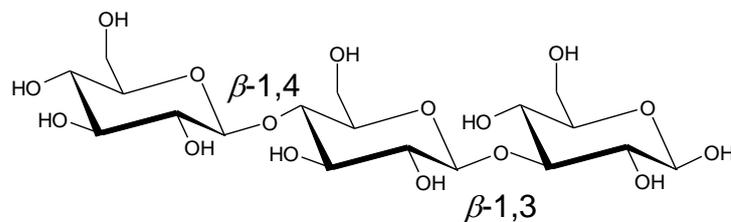


Abb. 4.10: 4-O-Glucosyl-Laminaribiose, Hydrolyseprodukt von Lichenan

Weitere für die Substratbindung wichtige Aminosäuren sind His₁₃₃ bzw. His₁₅₃ an der Bindungsstelle +1, eine Schleife von 4 Aminosäuren (Thr₁₅₉Asp₁₆₀Gly₁₆₁Asn₁₆₂ bzw. Thr₁₇₉Asp₁₈₀Gly₁₈₁Asn₁₈₂) und Trp₂₅₇ bzw. Trp₂₇₆. Zwischen His₁₃₃ und Asn₁₆₂ sowie zwischen Asn₁₆₂ und dem Nukleophil Glu₁₁₅ bilden sich bei Substratbindung Wasserstoffbrückenbindungen aus, die zu einer Konformationsänderung der Schleife führen. Indem dadurch das Substrat an der Bindungsstelle -1 im Übergangszustand stabilisiert wird und gleichzeitig das anomere Kohlenstoff dem Nukleophil Glu₁₁₅ näher kommt, wird das aktive Zentrum zur Katalyse befähigt. Bewegliche Schleifen werden unter den bekannten Kristallstrukturen im Komplex mit Substrat auch von anderen Mitgliedern der Glykosidhydrolasefamilie 16 beschrieben (Mark *et al.* 2009).

Als Besonderheit gegenüber anderen Strukturen des Clans B koordiniert die exponierte aromatische Aminosäure Trp₂₅₇ nicht die Hauptkette des Substrats Laminarin, sondern die β -1,6-Verzweigung. Weiterhin ist die helikale Struktur des Laminarins zu sperrig, um der Länge nach in die enge und an beiden Seiten geöffnete katalytische Spalte zu passen. Tatsächlich ist die Achse der Hauptkette senkrecht zu der Spalte ausgerichtet, so dass die Windungen der Helix nacheinander, jeweils gebunden an der β -1,6-Verknüpfung, hydrolysiert werden (Abb. 4.11).

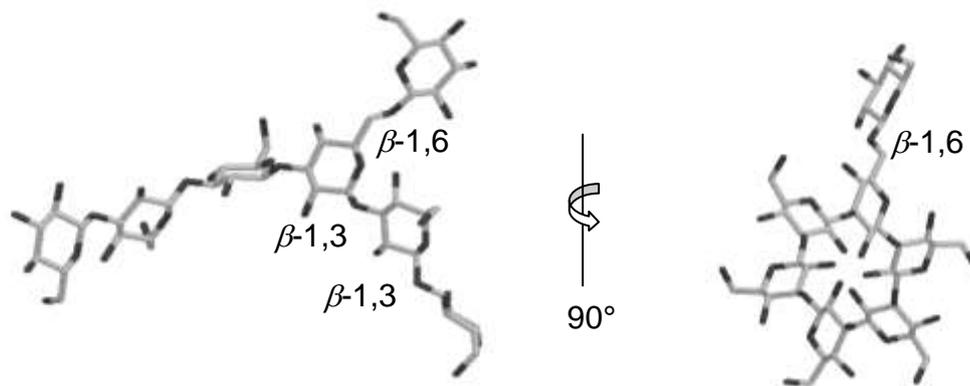


Abb. 4.11: Strukturmodell von Laminarin (SWEET2, Bohne *et al.* 1999)

Als Hydrolyseprodukt wird hauptsächlich unverzweigte 6-O-Glucosyl-Laminaritriose mit einem Molekulargewicht von 667 Da gebildet (Abb. 4.12). Unter Berücksichtigung des Auflösungsvermögens der verwendeten Größenausschluss säule und des Standards ist die Bildung dieses Abbauprodukts mit dem Kulturüberstand von *Phanerochaete chrysosporium* nicht ausgeschlossen (s. 4.5.1).

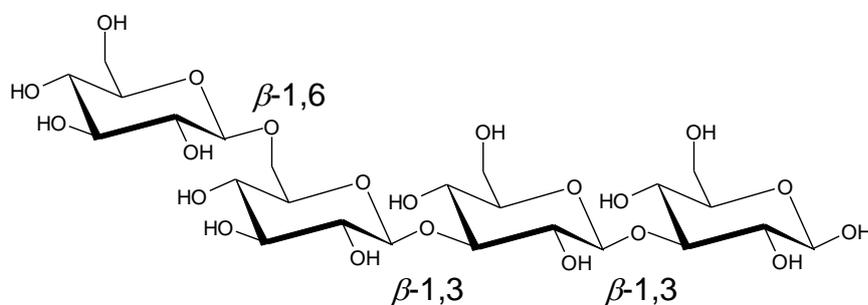


Abb. 4.12: 6-O-Glucosyl-Laminaritriose, Hydrolyseprodukt von Laminarin

Die katalytische Spalte ist für β -1,3-1,6-Glucane mit der Verzweigung an jeder dritten Glucoseeinheit wie Laminarin oder Cinerean ausgelegt. Eine Hydrolysierung stärker verzweigter β -1,3-1,6-Glucane wie Lentinan ist vermutlich nicht möglich, dies ist jedoch noch zu prüfen.

Bei der Bindung von Lichenan spielt Trp₂₅₇ keine Rolle. Lichenan wird aufgrund der unverzweigten und weniger raumfüllenden Struktur der Länge nach in die katalytische Spalte gebunden.

Zum derzeitigen Stand ist allein basierend auf der Aminosäuresequenz eine Einordnung von Glykosidhydrolasen in die Enzymklassen 3.2.1.6 bzw. 3.2.1.39 nicht möglich. Die bei BRENDA und CAZY gelisteten Enzyme aus Pilzen der Klasse 3.2.1.39 und Glykosidhydrolasefamilie 16 sind entweder augenscheinlich falsch eingeordnet oder unzureichend charakterisiert, so dass eine Zugehörigkeit zur Klasse 3.2.1.39 nicht sicher bestätigt werden kann (s. 4.1). Bei einem Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermotoga neapolitana* handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Endo-1,3- β -Glucanase, da die Aktivität gegenüber Laminarin mit 3.100 U mg^{-1} deutlich höher war als gegenüber Lichenan mit 90 U mg^{-1} (Zverlov *et al.* 1997). Ein Sequenzvergleich (Cobalt, Papadopoulos und Agarwala 2007) dieses Enzyms mit Endo-1,3(4)- β -Glucanasen aus *Phanerochaete chrysosporium* und dem phytopathogenen Pilz *Cochliobolus carbonum* zeigte bei einer geringen Gesamthomologie eine große Übereinstimmung von Aminosäuren, die für die Bindung und katalytische Umsetzung des Substrats verantwortlich sind (Abb. 4.13).

Z47974	DENARFEFQLGKSTGTVWIDTVWIDDVVMEDVGTLEVSGEENEIYTEEDEDKVEDWQLV-----WSQEFD-DGVIDPN	232
AB092837	-----MRFAALASLVAAALI-----PSSY-----AATYHLEDNWVGS AFLSTFTHEAIADPT	47
U81606	-----MSLKSL--FVSAPLLWRGVTALPAGPGSWTHGNSTIVSSSDFSA AAAYNLIDTYDASNWASKFNFDIADPT	70
Z47974	VWNFEIGNGHAKGIPGWGNAELEYTDKNAFVENGCLVIEARKEQVSDEYGYDYTSARITTEGKFEIKYKIEIRAKLP	312
AB092837	-----VDQATALAKNLTYASGDTLILRADHTTTLSPSGPGRNSVRIKTYTHVAVFDRHMP-	113
U81606	HGFVDY-----VTLQQAQQYGLFKTQNNQVYMGVDSTSTLNPNGPGRRSVRIQSKTAYNRALVIADFAHVPG	137
Z47974	KGKGIWPALWMLGNNIGEVGWPTCGEIDIMEMLGHDTRTVLRTAHGPGYS-----GGASIG	368
AB092837	QCGGTWPAAWETD---EGDWPNGGEVDIIEGVNDQSPNAMTLHTGANCAMPASRT-MTG HATNNNCDVNTDGNITGCGVQ	188
U81606	SACGSWPAFWMVG---P-NWPNQGEIDIYEGVHLSNQVTLHTSPGCNPSIGPGGETGRRLAGDCGAD-GGFNGCGIQ	211
Z47974	VAYHLPEEVPDFSEDFHVFSIEWDENEVE-WYVDGQLYHVLKDELAE LG---LEWVFDHPFF-----LI	429
AB092837	APTANSYGPSFNANGGGWYAMERTNSFIKVVFFPRNAGNVNDIASGPATINTDNWGTPTAFFPNTNCDIGSHFDANNII	268
U81606	ADNPFVSGTFFNANGGGVYATLWTSSGVKVVYFATR--NIPANIKSGNP--DPSAWGTPIANFGNNGCDFDAKFRDLNIV	287
Z47974	LNVAMGGYWPGYP-----DETTQFPQRMV-IDYIRVYKDMNPETITGEVDDCEYEQSQQQTGPEVTY	490
AB092837	INLTFCGDWAGQA-SIFNGAGCPGSCVDYVNNNPSAFANAYWDIASVRVYQ-----	318
U81606	FDVTFCGDWAGGVWGSTTRAQVNPSCVAYVASQPQNFSESYWVLSVVKVYSV-----	339

Abb. 4.13: Vergleich der Aminosäuresequenzen von verschiedenen β -1,3-glucan-hydrolysierenden Glucanasen der Glykosidhydrolasefamilie 16

(Endo-1,3- β -Glucanase aus *Thermotoga neapolitana* (Zugriffsnummer Z47974),

Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium*

(Zugriffsnummer AB092837), Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus

Cochliobolus carbonum (Zugriffsnummer U81606);

- : konservierte Aminosäuren für Substratbindung und -koordination;
- ▼: katalytisch aktive Aminosäuren; unterstrichen: bewegliche Schleife)

Alle 3 Enzyme weisen die katalytisch aktiven Aminosäuren auf. Die bewegliche Schleife der Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* scheint nicht konserviert und nicht ausschlaggebend für die Substratspezifität zu sein, da sowohl die Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Cochliobolus carbonum* als auch die Endo-1,3- β -Glucanase aus *Thermotoga neapolitana* an gleicher Position keine Homologie aufweisen. Hinsichtlich der für die Substratbindung wichtigen Aminosäuren besteht der einzige Unterschied in einem Histidinrest hinter dem katalytischen Motiv, den die Enzyme der Klasse 3.2.1.6 aufweisen und das Enzym der Klasse 3.2.1.39 nicht. Es ist unwahrscheinlich, dass allein durch diese Aminosäure die Substratspezifität des Enzyms bestimmt wird. Folglich ist es anhand der Aminosäuresequenz möglich, Enzyme in Glykosidhydrolasefamilien einzuordnen. Die phylogenetische Untersuchung zwischen Vertretern verschiedener Enzymklassen auf Basis der Aminosäuresequenz kann zudem Hinweise auf die Zugehörigkeit einer Klasse geben. Die Aminosäuresequenz

der Endo- β -Glucanase zeigte eine deutliche Verwandtschaftsbeziehung zur Enzymklasse 3.2.1.6 (s. 3.6.6). Eine sichere Kategorisierung in Klassen gelingt jedoch ausschließlich durch die Untersuchung der jeweiligen Substratspezifitäten im Vergleich zwischen den Glucanen Laminarin und Lichenan.

4.5.3 Heterologe Expression

Für die Produktion größerer Enzymmengen zur näheren Charakterisierung der Endo-1,3- β -Glucanase wurde die heterologe Expression im Bakterium *E. coli* angestrebt. Um eine korrekte Translation in *E. coli* zu gewährleisten, wurde die Codon Usage des Gens inklusive der potentiellen Signalsequenz an den Expressionsorganismus angepasst. Die Berechnung möglicher Signalpeptidaseschnittstellen erfolgte mittels SignalP 3.0, das jedoch bei Enzymen aus Basidiomyceten nur bedingt geeignet erscheint. Sowohl bei einer polyvalenten Peroxidase aus *Pleurotus eryngii* (Scheibner 2006) als auch bei einer Xanthophyllesterase aus *Pleurotus sapidus* (Bouws 2007) stimmte die mittels SignalP 3.0 vorhergesagte Signalsequenz nicht mit der nach N-terminalem Edmanabbau erhaltenen Sequenz überein. Bei der Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* ergibt sich dagegen als Ergebnis der Analyse mittels SignalP 3.0 eine Übereinstimmung mit der bestimmten N-terminalen Sequenz (Kawai *et al.* 2006b). Dieses Enzym wurde in der gereiften Form mit der hefespezifischen α -Faktor-Signalsequenz in *Pichia pastoris* exprimiert. Andere Glycosidasen aus Pilzen wurden ebenfalls ohne Signalsequenz und ohne Anpassung der Codon Usage erfolgreich in *E. coli* exprimiert (Ooi *et al.* 1993, Okada *et al.* 1998). Die Endoglucanase EGL 1 aus dem phythopathogenen Pilz *Macrophomina phaseolina* besitzt selbst keine Signalsequenz. Die Fusion mit der Signalsequenz der Endoglucanase EGL 3 aus *Trichoderma reesei* führte nach Expression in *E. coli* zu keinem Aktivitätsverlust gegenüber der heterologen Expression ohne Signalsequenz (Wang und Jones 1999). Welche Auswirkungen die Signalsequenz auf Expression und Enzymaktivität hat, muss im Einzelfall untersucht werden.

Bakterielle Systeme sind nicht in der Lage, eine posttranslationale Modifizierung eukaryontischer Enzyme wie z. B. Glykosidierung, die für die Funktionalität von Enzymen notwendig sein kann, auszuführen. Die Endo- β -Glucanase besitzt zwei potentielle Glykosidierungsstellen. Eine ähnliche Endo-1,3(4)- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* ist an einer dieser Stellen glykosidiert, was jedoch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hat (Vasur *et al.* 2009).

Als Expressionssystem wurde das pMAL Protein Fusion and Purification System (New England Biolabs) mit chemisch kompetenten *E. coli* K12 TB1 und die Vektoren pMAL-c4X für die cytoplasmatische bzw. pMAL-p4X für die periplasmatische Expression verwendet. Gemäß Southworth *et al.* (1996) erfolgte die Induktion bei 20 °C, um eine möglichst hohe Enzymlöslichkeit zu erreichen. Das Zielenzym wurde mit beiden Vektoren als Fusionsprotein mit einem Maltosebindeprotein exprimiert. Die Expression war insofern erfolgreich, dass das Fusionsprotein mittels Western Blot und polyklonalen Antikörpern gegen das Maltosebindeprotein nachgewiesen wurde (s. 3.7.2). Dennoch ist der Abbau des Fusionsproteins bis zum stabilen Maltosebindeprotein eindeutig, der durch Verwendung eines proteasedefizienten Stammes wie z. B. *E. coli* BL21 vermindert werden könnte. Insgesamt war die exprimierte Proteinmenge zu gering und die Abbaurate zu groß, um Gesamtglucanaseaktivität nachweisen zu können.

4.6 Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*

Eine Schlüsselkomponente des Grapefruitaromas und damit ein viel gefragter Aromastoff ist (+)-Nootkaton. Als Ausgangsstoff für die biotechnologische Produktion dient (+)-Valencen, das bei der Herstellung von Orangensaft in großen Mengen als Reststoffstrom anfällt. Die Biotransformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton wurde bereits mit isolierten Enzymen aus der Klasse 1 der Oxidoreduktasen sowie mit Ganzzellsystemen bzw. Zellextrakten aus Bakterien, Pflanzen und Pilzen untersucht. Mit einer Lipoxygenase aus Sojabohnen wurde nur unter drastischen Reaktionsbedingungen und dadurch fraglicher Enzymaktivität eine hohe Ausbeute an (+)-Nootkaton erreicht (Muller *et al.* 1998). (+)-Valencen wurde unter anderem mit gentechnisch verändertem Cytochrom P450_{cam} aus *Pseudomonas putida* bzw. Cytochrom P450_{BM-3} aus *Bacillus megaterium* umgesetzt (Sowden *et al.* 2005). Dennoch eignen sich Cytochrom P450 Enzyme aufgrund ihrer Komplexität, ihres Bedarfs an Cofaktoren und der diffizilen Reinigung unter Erhalt der Aktivität derzeit nicht für den industriellen Produktionsmaßstab (van den Brink *et al.* 1998). Der Einsatz von pflanzlichen Suspensionskulturen führte zwar ebenfalls zu einer Umsetzung von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton (Sakamaki *et al.* 2005), generell ist diese Art der Kulturführung bei einer niedrigen Produktausbeute allerdings langwierig und kostenintensiv (Fraatz *et al.* 2009). Während mit dem Ascomyceten *Chaetomium globosum* nur geringe Konzentrationen von (+)-Nootkaton gebildet wurden (Kaspera *et al.* 2005), lieferte die Transformation von (+)-Valencen mit frischem bzw. gefriergetrocknetem Myzel des Speisepilzes *Pleurotus sapidus* große Mengen (+)-Nootkaton (Fraatz *et al.* 2009). Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym wurde gereinigt und nach tryptischem Verdau *de novo* sequenziert. Einige der ermittelten Peptidsequenzen zeigten Homologien ausschließlich zu Lipoxygenasen aus den Ascomyceten *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus* und *Gibberella moniliformis* (Fraatz 2007). Aus Basidiomyceten war zu jenem Zeitpunkt noch kein vergleichbares Enzym kloniert worden.

Lipoxygenasen zählen zur Familie der monomeren nichthämeisenhaltigen Dioxygenasen. Sie katalysieren die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren zu den korrespondierenden Hydroperoxiden. Typische Substrate stellen bei Pflanzen Linol- und Linolensäure dar (Rosahl 1996), während bei Säugetieren überwiegend Arachidonsäure umgesetzt wird (Yamamoto 1992). Die von Lipoxygenasen gebildeten Hydroperoxide dienen anderen Enzymen wiederum als Substrat, was zu einer Vielfalt von Sekundärmetaboliten führt (Knust und von Wettstein 1992). Produkte von Lipoxygenasen haben in Säugetieren einen physiologischen Effekt auf verschiedenste Vorgänge in der Zelle und spielen z.B. bei der Biosynthese von Leukotrienen und Lipoxinen eine Rolle (Samuelsson 1983). Produkte pflanzlicher Lipoxygenasen dienen als Vorstufe des Phytohormons Jasmonsäure und ihrer Methylester, die Funktionen in der Wundheilung und der Abwehr von Pathogenen besitzen (Gardner 1991). Überdies ist die Bildung aromaaktiver Komponenten wie unter anderem Aldehyde, Ketone und Alkohole aus ungesättigten Fettsäurehydroperoxiden in Früchten und Gemüse bekannt (Filippovich *et al.* 2001). Im Gegensatz zu den umfassend untersuchten Lipoxygenasen aus Pflanzen und Säugetieren ist über mikrobielle Lipoxygenasen wenig bekannt. Aus Pilzen wurden Lipoxygenasen unter anderem aus den Phytopathogenen *Fusarium proliferatum* (Bisakowski *et al.* 1998) und *Gaeumannomyces graminis* (Su und Oliw 1998) sowie aus dem Basidiomyceten *Pleurotus ostreatus* (Kuribayashi *et al.* 2002) beschrieben. Auf molekularer Ebene wurden Lipoxygenasen aus Pilzen überwiegend im Rahmen von Genomprojekten erwähnt. Ausnahme bildet eine kürzlich veröffentlichte cDNA-Sequenz einer Lipoxygenase aus *Pleurotus ostreatus*, die bisher nicht näher charakterisiert wurde (Zugriffsnummer AB472334).

4.6.1 Molekularbiologische Charakterisierung

Basierend auf den von Fraatz (2007) ermittelten Peptidsequenzen wurde für die Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* eine cDNA-Sequenz mit 1.191 bp kloniert, die einer Proteinsequenz von 396 Aminosäuren entspricht. Das berechnete Molekulargewicht des Proteins beträgt 44 kDa (s. 3.8.4) und ist damit kleiner als die über SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichte von 60 kDa, 63 kDa und

66 kDa (Fraatz 2007). Zudem enthielt die Proteinsequenz nicht alle der zuvor ermittelten Peptidsequenzen. Mit der Veröffentlichung der Genomsequenz des nah verwandten Pilzes *Pleurotus ostreatus* wurde ein Sequenzvergleich von Lipoxygenasen beider Basidiomyceten möglich. Eine mutmaßliche Lipoxygenase mit der Protein-ID 77103 und einem berechneten Molekulargewicht von 74 kDa wies Ähnlichkeit mit 2 der fehlenden Peptidsequenzen und eine Homologie von 96% zu der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* auf (JGI, *Pleurotus ostreatus* PC9 v1.0). Geringere Homologie von 77% zeigte eine Lipoxygenase aus *Pleurotus ostreatus* mit einem berechneten Molekulargewicht von 72 kDa, die ebenfalls Hinweise auf die 2 Peptidsequenzen gibt (Abb. 4.14). Beide Lipoxygenasen haben ein geringfügig größeres berechnetes Molekulargewicht gegenüber der gereinigten Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*. Die Peptidsequenzen 3, 8, 9, 12, 15 und 16 fehlen weiterhin, was auf eine ungenügende Reinigung der Oxygenase zurückzuführen ist. Im Genom von *Pleurotus ostreatus* befinden sich die Lipoxygenasen an unterschiedlicher Position. Während sich die der Oxygenase sehr ähnlichen mutmaßlichen Lipoxygenase auf Scaffold 3 befindet, liegt die klonierte Lipoxygenase auf Scaffold 11.

77103	MNTRNSPPLDIVSTSTMVHNVLSRRKALHNVHLPYMQRPKPTGYNVALKNAEAGYD	60
FM200795	-----	
AB472334	-----MAPTMSLS-RSALKNVHLPYMQHPEPTDCSTAMKHAAGYD	41
77103	KARMAVWLYDIADYESSV <u>PQTFSL</u> QKTKDYTWELSDFFPHLAIIVPSDQAVSAPSI FS	120
FM200795	-----	
AB472334	RARQMIAFLFDILDYESSV <u>PQKFTPEEK</u> KEKYTWSHSDKFPPHLAIIPEDIDVPAYI FS	101
77103	PVRLAQTLIMSSLWYDDHTELPAGPEQNTMQKLEWNERHRDQGWIVKDMFNAPNIGL	180
FM200795	-----	
AB472334	IVRLVQTLSIMSGIQCNER--LAPGPEQNTMEKLT <u>TKWNAER</u> HKNQGW-VKDMFNEPNIGL	158
77103	RNDWFTDEVFAQQFFTGPNPTTITLANDTWVSAFTDEAKAQNNAKMLALFGSAPPNSFYV	240
FM200795	-----	
AB472334	RNDWYTDVFAQQFFTGPNPTTITLASDTWMKAFTEEAASQGKRDLISLFRSAPPNSFYV	218
77103	QDFSDFRARMGAKPDEELFNDSG-AMRYGCAAVAFYLTSAAGKLHPLAIIPDYKGSMAA	299
FM200795	-----MRYGCAAVAFYLTAMGKLHPLAIIPDYKGSMAA	34
AB472334	QDFSDFRARMGAKPDEELCATSDGGVTRYGCAAVAFYLPPTGELHPLAIIPDYKGSMAA	278
	*****. . * :*****:*****	
77103	SVTIFNKRTDPLDMTVNQANDWPWRYAKTCVLSDDWALHEMI IHLNNTHLVEEAVIVAAQ	359
FM200795	SVTIFNKRTNPLDISVQANDWPWRYAKTCVLSDDWALHEMI IHLNNTHLVEEAVIVAAQ	94
AB472334	SITLFNKRVDPSDASVDQANDWPWRYAKTCVLSADWVLHEMI IHLNNTHLVQEAVIVAVQ	338
	:.****.:* * :*:*****:*****:*.*****:*****.*	
77103	RKLSPSHIVFRLLLEPHWVTVLSLNAARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRGSFTNFDW	419
FM200795	RKLSPSHIVFRLLLEPHWVTVLSLNAARSVLIPEVIVPIAGFSAPHIFQFIRESFTNFDW	154
AB472334	RTLPSHIVFRLLKPHWVTVLSLNAQARSVLIPEVIVPIAGFSELRI FQFVGHAFNFDW	398
	..*****:***** ***** ***** :****: :*****	
77103	KSLYVPADLESRGFPIDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASV	479
FM200795	KSLYVPADLESRGFPVDQLNSPKFHNYAYARDINDMWTTLKKFVSSVLQDAQYYPDDASV	214
AB472334	KALYVPTDLEFRGFPLDRDLDDDKFHNYAYAKDIKDMWMLRKFVSSVLKDGKYYPPDDASV	458
	*:****:* * * * :*. * :*****:*. * :*****:*. * :*****:.*	
77103	AADTQIQAWCDEMRSRGMGAGMTNFPESITTVDDLVDVMTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQ	539
FM200795	AGDTQIQAWCDEMRSRGMGAGMTNFPESITTVDDLVDVMTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQ	274
AB472334	AADAQIQAWCDEMRSRGMGAGMTNFPESISTLDDLIDVMTMCIHIAAPQHTAVNYLQQYYQ	518
	..*** ***** * * * :*****:*. * :*****:*****	
77103	TFVFNKPSALFSPPLPKSIAQLQKYTESDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQVQEDEN	599
FM200795	TFVFNKPSALFSPPLPTSIAQLQKYTESDLMAALPLNAKRQWLLMAQIPYLLSMQVQEDEN	334
AB472334	TFVFNKPSALFSPPLTLLSQLESYTESDLMAALPLGAKQEWLLMAQVYLLSKEVEQDGN	578
	.**. :*:*.*****:*. * :*****:***** :*: * *	
77103	IVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLANSQQLDDQNTPYDVLAPEQLAKAI	659
FM200795	IVTYAANASTDKDPIIASAGRQLAADLKKLAAVFLVNSAQLDDQNTPYDVLAPEQLANAI	394
AB472334	IVTYAGTASNEDPIIAAAGKELSDLVILAGVFLKNSEKLDQNTAYNVLAPDQLANAI	638
	*****. * * :*****:*. * :*. * * * * * :*****:*. * :*****:*. * *	
77103	VI 661	
FM200795	VI 396	
AB472334	VI 640	
	**	

Abb. 4.14: Vergleich der Aminosäuresequenzen von zwei mutmaßlichen Lipoxygenasen aus *Pleurotus ostreatus* mit der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (77103: mutmaßliche Lipoxygenase, JGI PC9 v1.0; FM200795: Oxygenase; AB472334: mutmaßliche Lipoxygenase; unterstrichen: ähneln den Peptidsequenzen 1 und 5, vgl. Tab. 3.13)

Die Adaptersequenz SMART II A der cDNA befand sich am nicht-kodierenden Bereich des 5'-Endes (Abb. 3.43). Gemeinsam mit dem Vorhandensein eines Startcodons und eines offenen Leserahmens ohne Stopcodon lag die Vermutung nahe, die cDNA-Sequenz der Oxygenase sei mit 1.191 bp vollständig. Die erst seit kurzer Zeit möglichen Sequenzvergleiche mit Lipoxygenasen aus *Pleurotus ostreatus* lassen einen anderen Schluss zu. Vermutlich wurde die Sequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* nicht vollständig kloniert. Der Grund dafür kann in der Sekundärstruktur der RNA in Form von Schleifen oder Haarnadeln liegen, die zu einem verfrühten Abbruch der cDNA-Synthese führen (Zhang *et al.* 2001). Eine mögliche Degradierung der RNA wurde durch eine kapillargelelektrophoretische Qualitätskontrolle ausgeschlossen (s. 3.8.1). Für die vollständige Klonierung der Oxygenase sollte die cDNA-Synthese zur Veringerung der RNA-Sekundärstrukturen bei erhöhter Temperatur mit geeigneter reverser Transkriptase erfolgen. Eine erneute Primerableitung sollte anhand der Sequenz der mutmaßlichen Lipoxygenase aus *Pleurotus ostreatus* mit der Protein-ID 77103 erfolgen.

Die Lipoxygenase-1 aus der Sojabohne (*Glycine max*) fungiert nach intensiver Erforschung (Andreou und Feussner 2009) und aufgeklärter Röntgenkristallstruktur (Minor *et al.* 1996) als Modellenzym für die Familie der Lipoxygenasen verschiedener Quellen. Obwohl es sich bei der Lipoxygenase-1 mit 839 Aminosäuren um ein deutliches größeres Protein als die Oxygenase mit 396 Aminosäuren handelt und die Homologie beider Sequenzen nur 20% beträgt, befinden sich die notwendigen Aminosäuren für die Bindung des Eisens im katalytischen Zentrum bei beiden Enzymen an gleicher Position. Aus diesen Gründen diene die Röntgenkristallstruktur der Lipoxygenase-1 (PDB-ID 1YGE) als Grundlage für die Berechnung des Modells der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* (s. 3.8.6). Lipoxygenase-1 besteht aus einer Polypeptidkette, die in einer Zweidomänenstruktur gefaltet ist (Mei *et al.* 2008). Die kleinere N-terminale Domäne mit 146 Aminosäuren bildet ein β -Barrel. Die übrigen 693 Aminosäuren der C-terminalen Domäne sind in 23 α -Helices und 8 β -Faltblättern organisiert (Maccarrone *et al.* 2001). Die C-terminale Domäne beinhaltet das katalytische

Nichthämeisen, welches tief in der mutmaßlichen Substratbindungstasche liegt (Mei *et al.* 2008). Die Komplexierung des Eisens erfolgt durch die Imidazolringe der drei Histidinreste His₄₉₉, His₅₀₄, His₆₉₀ und der Carboxylgruppe des terminalen Isoleucin Ile₈₃₉ (Minor *et al.* 1996). Der in Lipoxygenasen aller Quellen hoch konservierte Aminosäurerest Asparagin Asn₆₉₄ und ein Wassermolekül kommen als weitere Liganden in Frage, sind mit einem Abstand von 3,3 Å jedoch zu weit vom Eisen entfernt. Möglich ist aber ihre Beteiligung an der Eisenkomplexierung während des katalytischen Zyklus (Prigge *et al.* 1997). Innerhalb der Sequenz für die Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* entspricht dies den Aminosäuren His₇₈, His₈₃, His₂₆₃, Asn₂₆₇ und Ile₃₉₆ (Abb. 3.45). Eine Glykosidierung liegt bei der Lipoxygenase-1 vermutlich nicht vor (Minor *et al.* 1996). Die Oxygenase scheint ebenfalls nach einem Deglykosidierungsversuch mit Endoglykosidase H nicht glykosidiert zu sein (Abb. 3.49).

Typischerweise werden von Lipoxygenasen Substrate mit (*Z,Z*)-Penta-1,4-dien-Struktur über die Bildung eines mesomeriestabilisierten Pentadienylradikals zu dem korrespondierenden Hydroperoxid umgesetzt (Prigge *et al.* 1997, Abb. 4.15).

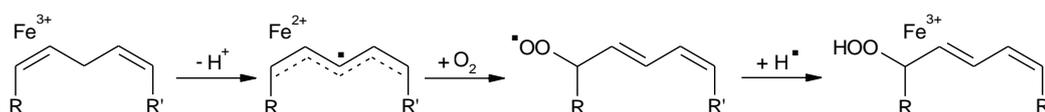


Abb. 4.15: Mesomeriestabilisierter Mechanismus von Lipoxygenasen;
modifiziert nach Prigge *et al.* (1997)

Ein weiterer möglicher Reaktionsmechanismus wurde von Corey und Nagata (1987) vorgeschlagen, bei dem eine konzertierte Deprotonierung durch die elektrophile Addition des Eisen(III)-Ions erfolgt, die zu einem Organo-Eisen-Intermediat führt.

Die Einführung molekularen Sauerstoffs führt zu der Bildung des Hydroperoxids (Abb. 4.16).

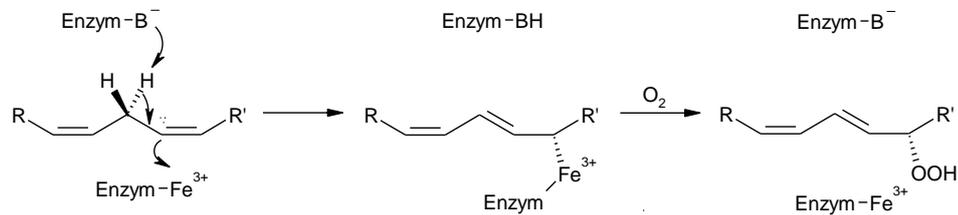


Abb. 4.16: Organo-Eisen-Mechanismus von Lipoxygenasen;
modifiziert nach Corey and Nagata (1987)

In Bezug auf das Substrat (+)-Valencen vermutete Fraatz (2007) in Analogie zu Abb. 4.16 eine allylische Hydroperoxidation. Eine anschließende Schenck-Umlagerung sollte zu (+)-Nootkaton und in geringen Mengen zu den Nebenprodukten α - und β -Nootkatol führen. Krügener *et al.* (2010) isolierte aus dem Transformationsansatz die sekundären Valencen-Hydroperoxide [3] und [3'], die als Zwischenprodukte entstehen (Abb. 4.17).

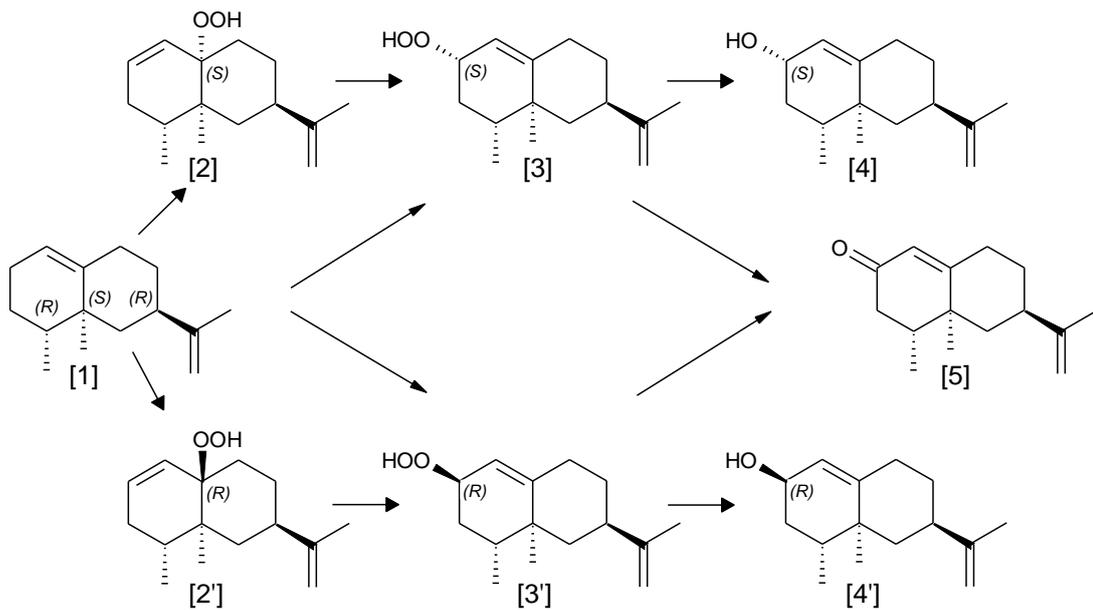


Abb. 4.17: Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton über allylische Hydroperoxidation durch eine Oxygenase aus *Pleurotus sapidus*
 ([1]: (+)-Valencen; [2]: tertiäres (+)-Valencen-(S)-hydroperoxid;
 [2']: tertiäres (+)-Valencen-(R)-hydroperoxid; [3]: sekundäres (+)-Valencen-(S)-hydroperoxid; [3']: sekundäres (+)-Valencen-(R)-hydroperoxid; [4]: β -Nootkatol;
 [4']: α -Nootkatol; [5]: (+)-Nootkaton; modifiziert nach Krügener *et al.* (2010)

4.6.2 Nachweis mittels polyklonaler Antikörper

Anhand des berechneten Strukturmodells der Oxygenase wurde ein an der Oberfläche exponierter Bereich als Antigen determinante für die Herstellung polyklonaler Antikörper ausgewählt. Bei der Verwendung von frischem Myzel von *Pleurotus sapidus* wurde im Western Blot selektiv eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa nachgewiesen. Allerdings führte die Nutzung von gefriergetrocknetem Myzel oder Ultrafiltrationseinheiten im Reinigungsprozess zu einem Abbau der Bande zu mehreren Abbaubanden, die hauptsächlich ein Molekulargewicht von 66 kDa und kleiner besitzen (Schmidt *et al.* 2010). Fraatz (2007) nutzte für die Reinigung der Oxygenase Lyophilisat und Ultrafiltrationseinheiten, was zu 3 Banden mit Molekulargewichten von 66 kDa, 63 kDa und 60 kDa führte.

Der polyklonale Antikörper war bei nativen Proben nur eingeschränkt nutzbar, da sowohl das Wildtypenzym als auch das rekombinante Enzym für eine Detektion mittels Western Blot denaturiert werden mussten (Abb. 4.18).

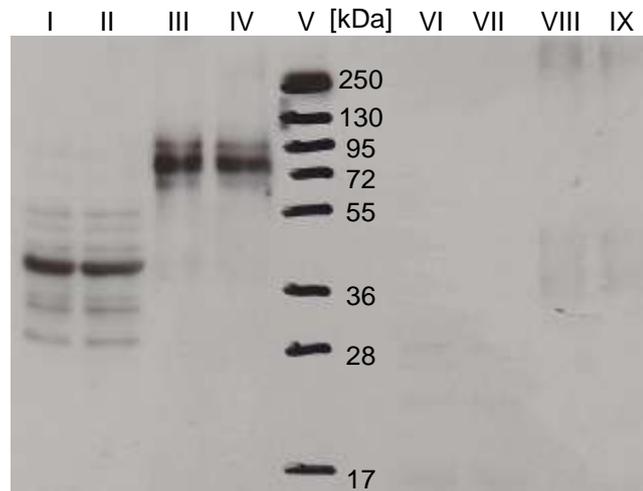


Abb. 4.18: Western Blot der Zellaufschlüsse von *Hansenula polymorpha* und *Pleurotus sapidus* nach halbnativer SDS-PAGE, 12%ig
(Lebensmittelchemikerin Katharina Schmidt)

(I: Zellaufschluss von *Hansenula polymorpha*, denaturiert, 20 μ L; II: Zellaufschluss von *Hansenula polymorpha*, denaturiert, 20 μ L; III: Zellaufschluss von *Pleurotus sapidus*, denaturiert, 20 μ L; IV: Zellaufschluss von *Pleurotus sapidus*, denaturiert, 20 μ L; V: Referenzproteine; VI: Zellaufschluss von *Hansenula polymorpha*, nativ, 20 μ L; VII: Zellaufschluss von *Hansenula polymorpha*, nativ, 20 μ L; VIII: Zellaufschluss von *Pleurotus sapidus*, nativ, 20 μ L; IX: Zellaufschluss von *Pleurotus sapidus*, nativ, 20 μ L)

Dagegen erfolgten die Dot Blots mit nativen Proben (s. 3.8.7), bei denen jedoch eine geringfügige Denaturierung durch beispielsweise die Membranbindung nicht ausgeschlossen werden kann. Vermutlich befindet sich die nach dem Strukturmodell an der Oberfläche liegende Antigen determinante bei den Enzymen an verdeckter Stelle, so dass erst eine Entfaltung des Proteins eine Antikörperbindung ermöglicht. Dies ist auf die geringe Homologie von 20% zwischen Lipoxygenase-1 aus Sojabohne und Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* und damit auf eine ungenaue Berechnung des Strukturmodells zurückzuführen.

4.6.3 Heterologe Expression

Um die für eine Charakterisierung der Oxygenase notwendige Proteinmenge zu erhalten, erfolgte die heterologe Expression einer an die Codon Usage der Hefe *Hansenula polymorpha* angepassten Sequenz durch die Firma Artes Biotechnology. Das Molekulargewicht des exprimierten löslichen Konstrukts lox entsprach mit 45 kDa dem berechneten Molekulargewicht der vermutlich im N-terminalen Bereich unvollständigen cDNA-Sequenz (s. 3.8.7 und 4.6.1). Während der C-terminale Bereich die katalytisch aktiven Aminosäuren beinhaltet und bei vielen Lipxygenasen oftmals große Homologien aufweist (Minor *et al.* 1993), ist die Funktion des kleineren, bei Lipxygenasen aus Säugetieren gar nicht vorhandenen N-terminalen Bereichs noch nicht vollständig verstanden (Maccarrone *et al.* 2001). Vermutet werden Einflüsse bei der Substratbindung (Brash 1999) und der Proteinfaltung (Sudharshan und Appu Rao 1997). Maccarrone *et al.* (2001) zeigte bei der Lipxygenase-1 aus Sojabohne, dass die Entfernung der 30 kDa großen N-Domäne in keiner Aktivitätsminderung, sondern sogar in einer -steigerung resultiert. Dagegen lieferte die Expression am N-Terminus verkürzter Gene von Lipxygenase-1 inaktive Enzyme (Steczko *et al.* 1991). Dies legt die Vermutung nahe, dass die N-Domäne für eine korrekte Faltung des Enzyms notwendig ist. Die Expression der unvollständigen cDNA-Sequenz der Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* resultierte dementsprechend in einem inaktiven Enzym. Mit der Klonierung der vollständigen cDNA-Sequenz sollte die Expression aktiven Enzyms möglich sein.

4.7 Nachhaltigkeit

Gemäß der Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) ist ein wesentliches Element der Nachhaltigkeit in der Industrie, durch kontinuierliche Neuerung, Optimierung und Anwendung umweltfreundlicher Technologien zur Minimierung von Schadstoffbelastungen und Ressourcenverbrauch beizutragen. Praktisch bedeutet dies, Material- und Energieflüsse sowie Schadstoffe zu reduzieren, die Verwendung von erneuerbaren Ressourcen zu maxi-

mieren und recyclefähige bzw. biologisch abbaubare Produkte herzustellen (Sang und Ryu 2005). Biotechnologische Herstellungsprozesse werden häufig als umweltfreundlich angesehen, weil sie für gewöhnlich bei moderaten Drücken und Temperaturen ablaufen und somit einen entsprechend geringeren Energiebedarf als die äquivalenten chemischen Prozesse besitzen (Stottmeister *et al.* 2005). Zudem kommen unter dem Gesichtspunkt der Nachhaltigkeit bei biotechnologischen Prozessen überwiegend erneuerbare Rohstoffe, wie Reststoffströme aus anderen verarbeitenden Industrien, zum Einsatz. Vorteile bieten biotechnologische Verfahren insbesondere wenn es um die Herstellung von Fein- und Spezialchemikalien geht, weil konventionelle chemische Methoden oftmals aufgrund der mangelnden Regio- und Stereospezifität versagen. Die Implementierung enzymatischer Reaktionen in chemische Synthesestrategien kann dagegen in umweltschonender Weise zum Erfolg führen (Sang und Ryu 2005).

Inzwischen führten einige Untersuchungen zu der Erkenntnis, dass biotechnologische Prozesse nicht grundsätzlich ökonomisch und ökologisch vorteilhaft gegenüber chemischen Prozessen sind (Brinkmann *et al.* 2010). Daher sollte bereits im Stadium der Forschung und Entwicklung mit Hilfe geeigneter Software eine Ökoeffizienzanalyse erfolgen, um die ökonomische und ökologische Effizienz eines Prozesses vergleichend beurteilen zu können. Hinsichtlich der nativen Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* wurde dies im Rahmen eines vom DBU-Verbund ChemBioTec geförderten Projekts (Az. 13187) durchgeführt. Dabei erfolgte in Kooperation mit der Ifu Hamburg ein Ökoeffizienzvergleich zwischen einem biotechnologischen und einem chemosynthetischen Verfahren zur Synthese von (+)-Nootkaton. Mit Hilfe der Software Sabento wurde zunächst die Herstellung des Biokatalysators bilanziert. Dagegen erfolgte für das chemosynthetische Verfahren noch keine nähere Untersuchung auf weitere Energiebedarfe und Abfallströme. Während für das biotechnologische Verfahren die Umweltbewertungszahl UBZ bei 3 lag, wurde für die Chemosynthese von (+)-Nootkaton eine UBZ von 726 berechnet. Die Höhe der UBZ korreliert mit den potentiellen Umweltwirkungen. Des Weiteren betrug der Energieindex der

Chemosynthese basierend auf den vorliegenden Daten ca. $48.000 \text{ kJ kg}^{-1}$ und ist damit um den Faktor 5 höher als für das biotechnologische Verfahren. Für eine abschließende Ökoeffizienzanalyse sind Daten zu Produktausbeute und Substratrecycling notwendig. Allerdings wurden durch die deutlich geringeren Werte von Umweltbewertungszahl und Energieindex des biotechnologischen Verfahrens die erwarteten Vorteile hinsichtlich der ökologischen Kompatibilität nachgewiesen.

Eine Ökoeffizienzanalyse in Bezug auf die rekombinante Oxygenase und auf die Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* ist zum derzeitigen Forschungsstand noch nicht möglich.

5 Ausblick

Für die erfolgreiche heterologe Expression einer aktiven Endo- β -Glucanase aus *Phanerochaete chrysosporium* sollte zunächst ein proteasedefizienter Stamm wie z. B. *E. coli* BL21 genutzt werden. Anschließend sollte das Enzym zur Einordnung in die richtige Enzymklasse auf den Abbau des β -1,3-1,4-D-Glucans Lichenan untersucht werden. Die Substratspezifität kann mit Substraten wie Cellulose (β -1,4-D-Glucan), Curdlan (β -1,3-D-Glucan) und Pustulan (β -1,6-D-Glucan) überprüft werden. Die Anwendung des Enzyms zur Viskositätserniedrigung und damit der Verbesserung der Filtrationsfähigkeit von Most mit relevantem Cinereangehalt sollte, gegebenenfalls in Kombination mit Exo- β -Glucanasen, erprobt und mittels Viskositätsmessungen analysiert werden.

Die cDNA-Sequenz einer Oxygenase aus *Pleurotus sapidus* gilt es zunächst anhand der Genomsequenz von *Pleurotus ostreatus* vollständig zu klonieren. Anschließend kann die heterologe Expression des aktiven Enzyms in der Hefe *Hansenula polymorpha* erfolgen. Angestrebt wird eine Optimierung der Transformation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton im Fermentermaßstab von bis zu 100 L. Weiterhin bleibt zu klären, inwieweit die Oxygenase lipxygenase-spezifische Reaktionen durchzuführen vermag. Dies könnte Aufschluss über die Biosynthese weiterer Aromen wie z. B. Oct-1-en-3-ol, dem Schlüsselaromastoff im Champignon- und Camembertaroma, geben. Eine Kristallisierung des rekombinanten Enzyms mit angeschlossener Röntgenstrukturanalyse könnte klären, welches Metallion sich im katalytischen Zentrum befindet und überdies weitere Informationen über den außergewöhnlichen Reaktionsmechanismus liefern.

6 Literatur

Abbas A, Koc H, Liu F, Tien M (2005) Fungal degradation of wood: Initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. *Curr Genet* 47:49-56.

Ahlgren E, Eriksson K-E (1967) Characterization of cellulases and related enzymes by isoelectric focusing gel filtration and zone electrophoresis II. Studies on *Stereum sanguinolentum*, *Fomes annosus* and *Chrysosporium lignorum* enzymes. *Acta Chem Scand* 21:1193-2000.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.

Andreou A, Feussner I (2009) Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry* 70:1504-1510.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195-201.

Bes B, Pettersson B, Lennholm H, Iversen T, Eriksson K-E (1987) Synthesis, structure, and enzymatic degradation of an extracellular glucan produced in nitrogen-starved cultures of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Appl Biochem* 9:310-318.

Bisakowski B, Kermasha S, Spinnler E (1998) Characterization of purified lipoxygenase extracts from *Fusarium proliferatum*. *J Agric Food Chem* 46:2382-2388.

Blanchette RA (1991) Delignification by wood-decay fungi. *Annu Rev Phytopathol* 29:381-398.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.

Bodenmann J, Heiniger U, Hohl HR (1985) Extracellular enzymes of *Phytophthora infestans*: Endo-cellulase, β -glucosidases, and 1,3- β -glucanases. *Can J Microbiol* 31:75-82.

Bohne A, Lang E, Lieth CW von der (1999) SWEET – WWW-based rapid 3D construction of oligo- and polysaccharides. *Bioinformatics* 15:767-768.

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

Bouws H, Wattenberg A, Zorn H (2008) Fungal secretomes – Nature's toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:381-388.

Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Brash AR (1999) Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 274:23679-23682.

Breuil C, Saddler JN (1985) Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme Microb Technol* 7:327-332.

Brinkmann T, Rubbeling H, Fröhlich P, Katzberg M, Bertau M (2010) Application of material and energy flow analysis in the early stages of biotechnical process development – A case study. *Chem Eng Technol* 33:618-628.

Burdsall HH Jr. (1985) A contribution to the taxonomy of the genus *Phanerochaete* (*Corticaceae*, *Aphyllophorales*). *Mycol Mem* 10:1-165.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycomics. *Nucleic Acids Res* 37:D233-D238.

Cao P, Jung K-H, Ronald PC (2010) A survey of databases for analysis of plant cell wall-related enzymes. *Bioenergy Res* 3:108-114.

Chaplin MF, Kennedy JF (2003) Carbohydrate analysis: A practical approach. IRL Press, Oxford.

Chesters CGC, Bull AT (1963a) The enzymic degradation of laminarin. 2. The multicomponent nature of fungal laminarinases. *Biochem J* 86:31-38.

Chesters CGC, Bull AT (1963b) The enzymic degradation of laminarin. 3. Some effects of temperature pH and various chemical reagents on fungal laminarinases. *Biochem J* 86:38-46.

Corey EJ, Nagata R (1987) Evidence in favor of an organoiron-mediated pathway for lipoxygenation of fatty acids by soybean lipoxygenase. *J Am Chem Soc* 109:8107-8108.

Daglia M, Aceti C, Giorgetti S, Papetti A, Gazzani G (2005) Purification and characterization of soluble *Cichorium intybus* var. *silvestre* lipoxygenase. *J Agric Food Chem* 53:6448-6454.

Davies GJ, Wilson KS, Henrissat B (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J* 321:557-559.

Decelle B, Tsang A, Storms RK (2004) Cloning, functional expression and characterization of three *Phanerochaete chrysosporium* endo-1,4- β -xylanases. *Curr Genet* 46:166-175.

Dubourdieu D, Desplanques C, Villettaz J-C, Ribereau-Gayon P (1985) Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *Carbohydr Res* 144:277-287.

Dubourdieu D, Ribereau-Gayon P, Fournet B (1981) Structure of the extracellular β -D-glucan from *Botrytis cinerea*. *Carbohydr Res* 93:294-299.

Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* 430:35-44.

El-Katatny MH, Gudelj M, Robra K-H, Elnaghy MA, Gübitz GM (2001) Characterization of a chitinase and an endo- β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:137-143.

Filippovich SY, Rybakov YA, Afanasieva TP, Bachurina GP, Lukina GP, Ezhova IE, Nosova AV, Artjushkina TV, Sineokii SP, Kritskii MS (2001) Characterization of lipoxygenase from fungi of the genus *Mortierella*. *Appl Biochem Microbiol* 37:473-479.

Fraatz MA (2007) Enzymatische Oxidation von Mono- und Sesquiterpenen. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Fraatz MA, Berger RG, Zorn H (2009) Nootkatone – A biotechnological challenge. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:35-41.

Frazzetto G (2003) White biotechnology. *EMBO Rep* 4:835-837.

Galán B, Mendoza CG, Calonje M, Novaes-Ledieu M (1999) Production, purification, and properties of an endo-1,3- β -glucanase from the basidiomycete *Agaricus bisporus*. *Curr Microbiol* 38:190-193.

Gardner HW (1991) Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim Biophys Acta* 1084:221-239.

Gupta R, Jung E, Brunak S (2004) Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. *In preparation*.

Hart DO, He S, Chany CJ II, Withers SG, Sims PFG, Sinnott ML, Brumer H III (2000) Identification of Asp-130 as the catalytic nucleophile in the main α -galactosidase from *Phanerochaete chrysosporium*, a family 27 glycosyl hydrolase. *Biochemistry* 39:9826-9836.

Heightman TD, Vasella AT (1999) Neue Erkenntnisse über Hemmung, Struktur und Mechanismus konfigurationserhaltender Glycosidasen. *Angew Chem* 111:794-815.

Henriksson G, Nutt A, Henriksson H, Pettersson B, Ståhlberg J, Johansson G, Pettersson G (1999) Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur J Biochem* 259:88-95.

Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280:309-316.

Henrissat B, Bairoch A (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* 316:695-696.

Hunter GLK, Brogden WB Jr. (1965) Conversion of valencene to nootkaton. *J Food Sci* 30:876-878.

Ishida T, Fushinobu S, Kawai R, Kitaoka M, Igarashi K, Samejima M (2009) Crystal structure of glycoside hydrolase family 55 β -1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 284:10100-10109.

Ishida T, Yaoi K, Hiyoshi A, Igarashi K, Samejima M (2007) Substrate recognition by glycoside hydrolase family 74 xyloglucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS J* 274:5727-5736.

Jacobs PP, Callewaert N (2009) N-glycosylation engineering of biopharmaceutical expression systems. *Curr Mol Med* 9:774-800.

Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S (2005) Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15:153-164.

Kanemitsu T, Kanie O (1999) Carbohydrate-related libraries. *Trends Glycosci Glycotechnol* 11:267-276.

Kaspera R (2004) Oxyfunktionalisierung von Terpenkohlenwasserstoffen zu aromaaktiven Terpenoiden durch selektive Biokatalyse. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Kaspera R, Krings U, Nanzad T, Berger RG (2005) Bioconversion of (+)-valencene in submerged cultures of the ascomycete *Chaetomium globosum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 67:477-483.

Kawai R, Igarashi K, Samejima M (2006a) Gene cloning and heterologous expression of glycoside hydrolase family 55 β -1,3-glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol Lett* 28:365-371.

Kawai R, Igarashi K, Yoshida M, Kitaoka M, Samejima M (2006b) Hydrolysis of β -1,3/1,6-glucan by glycoside hydrolase family 16 endo-1,3(4)- β -glucanase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:898-906.

Kikuchi T, Shibuya H, Jones JT (2005) Molecular and biochemical characterization of an endo- β -1,3-glucanase from the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* acquired by horizontal gene transfer from bacteria. *Biochem J* 389:117-125.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008) *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi*. CAB International, Wallingford.

Klis FM (1994) Review: Cell wall assembly in yeast. *Yeast* 10:851-869.

Knust B, Wettstein D von (1992) Expression and secretion of pea-seed lipoxygenase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 37:342-351.

Koshland DE Jr. (1953) Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol Rev Camb Philos Soc* 28:416-436.

Krügenger S, Krings U, Zorn H, Berger RG (2010) A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation. *Bioresour Technol* 101:457-462.

Kühne W (1877) Ueber das Verhalten verschiedener organisirter und sog. ungeformter Fermente. In: Naturhistorisch-Medizinischer Verein (Hg.) *Verhandlungen des Naturhistorisch-Medizinischen Vereins zu Heidelberg*, Universitätsbuchhandlung Carl Winter, Heidelberg 1:190-193.

Kuribayashi T, Kaise H, Uno C, Hara T, Hayakawa T, Joh T (2002) Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *J Agric Food Chem* 50:1247-1253.

La Cruz J de, Pintor-Toro JA, Benítez T, Llobell A, Romero LC (1995) A novel endo- β -1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *J Bacteriol* 177:6937-6945.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.

Lavín JL, Ramírez L, Ussery DW, Pisabarro AG, Oguiza JA (2010) Genomic analysis of two-component signal transduction proteins in basidiomycetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 18:63-73.

Li W, Cui SW, Kakuda Y (2006) Extraction, fractionation, structural and physical characterization of wheat β -D-glucans. *Carbohydr Polym* 63:408-416.

Maccarrone M, Salucci ML, van Zadelhoff G, Malatesta F, Veldink G, Vliegenthart JFG, Finazzi-Agrò A (2001) Tryptic digestion of soybean lipoxygenase-1 generates a 60 kDa fragment with improved activity and membrane binding ability. *Biochemistry* 40:6819-6827.

Marcović I, Marcović-Devčić B, Joveva S (1991) Some physico-biochemical properties of β -glucanase from *Polyporus* sp. *Monatsschr Brauwiss* 44:312-317.

Mark P, Baumann MJ, Eklöf JM, Gullfot F, Michel G, Kallas ÅM, Teeri TT, Brumer H, Czjzek M (2009) Analysis of nasturtium *TmNXG1* complexes by crystallography and molecular dynamics provides detailed insight into substrate recognition by family GH16 xyloglucan endo-transglycosylases and endo-hydrolases. *Proteins* 75:820-836.

Martin K, McDougall BM, McIlroy S, Jayus, Chen J, Seviour RJ (2007) Biochemistry and molecular biology of exocellular fungal β -(1,3)- and β -(1,6)-glucanases. *FEMS Microbiol Rev* 31:168-192.

Martin KJ, Rygiewicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol* 5:28.

Martin KL, McDougall BM, Unkles SE, Seviour RJ (2006) The three β -1,3-glucanases from *Acremonium blochii* strain C59 appear to be encoded by separate genes. *Mycol Res* 110:66-74.

Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, Gelpke MDS, Huang K, Chapman J, Helfenbein KG, Ramaiya P, Detter JC, Larimer F, Coutinho PM, Henrissat B, Berka R, Cullen D, Rokhsar D (2004) Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nat Biotechnol* 22:695-700.

McCarthy T, Hanniffy O, Savage AV, Tuohy MG (2003) Catalytic properties and mode of action of three endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble β -1,4- and β -1,3;1,4-linked glucans. *Int J Biol Macromol* 33:141-148.

McGovern PE, Glusker DL, Exner LJ, Voigt MM (1996) Neolithic resinated wine. *Nature* 381:480-481.

Mei G, Di Venere A, Nicolai E, Angelucci CB, Ivanov I, Sabatucci A, Dainese E, Kuhn H, Maccarrone M (2008) Structural properties of plant and mammalian lipoxygenases. Temperature-dependent conformational alterations and membrane binding ability. *Biochemistry* 47:9234-9242.

Michel G, Chantalat L, Duee E, Barbeyron T, Henrissat B, Kloareg B, Dideberg O (2001) The κ -carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of clan-B glycoside hydrolases. *Structure* 9:513-525.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428.

Minor W, Steczko J, Bolin JT, Otwinowski Z, Axelrod B (1993) Crystallographic determination of the active site iron and its ligands in soybean lipoxygenase L-1. *Biochemistry* 32:6320-6323.

Minor W, Steczko J, Stec B, Otwinowski Z, Bolin JT, Walter R, Axelrod B (1996) Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry* 35:10687-10701.

Minton AP (2000) Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr Opin Struct Biol* 10:34-39.

Moreno-Arribas MV, Polo MC (2005) Winemaking biochemistry and microbiology: Current knowledge and future trends. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45:265-286.

Muller B, Dean C, Schmidt C, Kuhn J-C (1998) Process for the preparation of nootkatone. Patent US 5847226.

Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153:375-380.

Nelson TE, Scaletti JV, Smith F, Kirkwood S (1963) The use of enzymes in structural studies on polysaccharides: I. The mode of attack of a β -D-(1 \rightarrow 3)-glucanase on laminarin. *Can J Chem* 41:1671-1678.

Nerinckx W, Desmet T, Claeysens M (2003) A hydrophobic platform as a mechanistically relevant transition state stabilising factor appears to be present in the active centre of all glycoside hydrolases. *FEBS Lett* 538:1-7.

Noronha EF, Ulhoa CJ (2000) Characterization of a 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol Lett* 183:119-123.

Ohloff G (1994) Scent and fragrances: The fascination of odors and their chemical perspectives. Springer, Berlin.

Okada H, Tada K, Sekiya T, Yokoyama K, Takahashi A, Tohda H, Kumagai H, Morikawa Y (1998) Molecular characterization and heterologous expression of the gene encoding a low-molecular-mass endoglucanase from *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl Environ Microbiol* 64:555-563.

Ooi T, Minamiguchi K, Kawaguchi T, Okada H, Murao S, Arai M (1993) Expression of the cellulase (FI-CMCase) gene of *Aspergillus aculeatus* in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:1960-1961.

Papadopoulos JS, Agarwala R (2007) COBAL: Constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23:1073-1079.

Pass F (1981) Biotechnology, a new industrial revolution. *J Am Acad Dermatol* 4:476-477.

Pérez J, Muñoz-Dorado J, La Rubia T de, Martínez J (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *Int Microbiol* 5:53-63.

Pesentseva MS, Kusaykin MI, Anastyuk SD, Sova VV, Zvyagintseva TN (2008) Catalytic properties and mode of action of endo-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucanase and β -D-glucosidase from the marine mollusk *Littorina kurila*. *Carbohydr Res* 343:2393-2400.

Philpott WA, Chapman JM (1977) New improved method for assay of endo- β -1,3-glucanase. *Anal Biochem* 79:257-262.

Pielken P, Stahmann P, Sahm H (1990) Increase in glucan formation by *Botrytis cinerea* and analysis of the adherent glucan. *Appl Microbiol Biotechnol* 33:1-6.

Pitson SM, Seviour RJ, McDougall BM (1993) Noncellulolytic fungal β -glucanases: Their physiology and regulation. *Enzyme Microb Technol* 15:178-192.

Prigge ST, Boyington JC, Faig M, Doctor KS, Gaffney BJ, Amzel LM (1997) Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* 79:629-636.

Prokop A, Rapp P, Wagner F (1994) Production, purification, and characterization of an extracellular endo- β -1,3-glucanase from a monokaryon of *Schizophyllum commune* ATCC 38548 defective in exo- β -1,3-glucanase formation. *Can J Microbiol* 40:18-23.

Richardson JS (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. Academic Press, New York.

Rosahl S (1996) Lipoxygenases in plants – Their role in development and stress response. *Z Naturforsch C J Biosci* 51:123-138.

Sakamaki H, Itoh K-i, Taniai T, Kitanaka S, Takagi Y, Chai W, Horiuchi CA (2005) Biotransformation of valencene by cultured cells of *Gynostemma pentaphyllum*. *J Mol Catal B Enzym* 32:103-106.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Samuelsson B (1983) Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 220:568-575.

Sang B-I, Ryu J-C (2005) Next generation technology to minimize ecotoxicity and to develop the sustainable environment: White Biotechnology. *Mol Cell Toxicol* 1:143-148.

Sato S, Liu F, Koc H, Tien M (2007) Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates. *Microbiology* 153:3023-3033.

Scheibner M (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoid-abbauender Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimtz M, Boer L de, Berger RG, Zorn H (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade β -carotene. Appl Microbiol Biotechnol 77:1241-1250.

Schmidt K, Fraatz MA, Riemer SJL, Zelena K, Linke D, Berger RG, Zorn H (2010) Biochemical and molecular biological characterization of a novel oxygenase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. Proceedings of the 9th Wartburg-Symposium, Eisenach, *in press*.

Shu C-H, Xu C-J, Lin E-S (2006) Production, purification and partial characterization of a novel endo- β -1,3-glucanase from *Agaricus brasiliensis*. Process Biochem 41:1229-1233.

Sigma-Aldrich (1995) Enzymatic assay of laminarinase (EC 3.2.1.6). Online verfügbar unter http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Enzyme_Assay/l5272enz.Par.0001.File.tmp/l5272enz.pdf, zuletzt aktualisiert am 22.08.2007.

Sigma-Aldrich (1997) Suitability assay for laminarin azure as a substrate for laminarinase. Online verfügbar unter http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/laminarinase_using_laminarin_azure.Par.0001.File.dat/laminarinase_using_laminarin_azure.pdf, zuletzt aktualisiert am 05.06.2007.

Singh D, Chen S (2008) The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Conditions for the production of lignin-degrading enzymes. Appl Microbiol Biotechnol 81:399-417.

Sinnott ML (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. Chem Rev 90:1171-1202.

Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. J Biol Chem 195:19-23.

Southworth MW, Fuhrman JA, Robbins PW, Beauregard K, Perler FB (1996) Gene cloning and production of active recombinant *Brugia malayi* microfilarial chitinase. Gene 177:55-58.

Sowden RJ, Yasmin S, Rees NH, Bell SG, Wong L-L (2005) Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450_{cam} and P450_{BM-3}. Org Biomol Chem 3:57-64.

Sprecher E, Hanssen H-P (1982) Influence of strain specificity and culture conditions on terpene production by fungi. Planta Med 44:41-43.

Stahmann K-P, Pielken P, Schimz K-L, Sahn H (1992) Degradation of extracellular β -(1,3)(1,6)-D-glucan by *Botrytis cinerea*. Appl Environ Microbiol 58:3347-3354.

Steczko J, Donoho GA, Dixon JE, Sugimoto T, Axelrod B (1991) Effect of ethanol and low-temperature culture on expression of soybean lipoxygenase L-1 in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 2:221-227.

Stottmeister U, Aurich A, Wilde H, Andersch J, Schmidt S, Sicker D (2005) White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses. J Ind Microbiol Biotechnol 32:651-664.

Strohmeier M, Hrmova M, Fischer M, Harvey AJ, Fincher GB, Pleiss J (2004) Molecular modeling of family GH16 glycoside hydrolases: Potential roles for xyloglucan transglucosylases/hydrolases in cell wall modification in the poaceae. Protein Sci 13:3200-3213.

Su C, Oliw EH (1998) Manganese lipoxygenase – Purification and characterization. J Biol Chem 273:13072-13079.

Sudharshan E, Appu Rao AG (1997) Rapid method to separate the domains of soybean lipoxygenase-1: Identification of the interdomain interactions. FEBS Lett 406:184-188.

Sumner JB (1926) The recrystallization of urease. J Biol Chem 70:97-98.

Suzuki M, Horii T, Kikuchi R, Ohnishi T (1987) Purification of laminarinase from Antarctic krill *Euphausia superba*. Nippon Suisan Gakkai Shi 53:311-317.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 24:1596-1599.

Tsujiisaka Y, Hamada N, Kobayashi R (1981) Purification and some properties of an exo- β -1,3-glucanase from basidiomycete species. Agric Biol Chem 45:1201-1208.

Uzcategui E, Johansson G, Ek B, Pettersson G (1991a) The 1,4- β -D-glucan glucanohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. Re-assessment of their significance in cellulose degradation mechanisms. J Biotechnol 21:143-160.

Uzcategui E, Ruiz A, Montesino R, Johansson G, Pettersson G (1991b) The 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*. I. A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*. J Biotechnol 19:271-285.

van den Brink H(J)M, van Gorcom RFM, van den Hondel CAMJJ, Punt PJ (1998) Cytochrome P450 enzyme systems in fungi. *Fungal Genet Biol* 23:1-17.

van Rensburg P, Pretorius IS (2000) Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalysts for efficient biotransformations – A review. *S Afr J Enol Vitic* 21:52-73.

Vanden Wymelenberg A, Gaskell J, Mozuch M, Kersten P, Sabat G, Martinez D, Cullen D (2009) Transcriptome and secretome analyses of *Phanerochaete chrysosporium* reveal complex patterns of gene expression. *Appl Environ Microbiol* 75:4058-4068.

Vanden Wymelenberg A, Sabat G, Martinez D, Rajangam AS, Teeri TT, Gaskell J, Kersten PJ, Cullen D (2005) The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: Database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium. *J Biotechnol* 118:17-34.

Vasella A, Davies GJ, Böhm M (2002) Glycosidase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 6:619-629.

Vasur J, Kawai R, Larsson AM, Igarashi K, Sandgren M, Samejima M, Ståhlberg J (2006) X-ray crystallographic native sulfur SAD structure determination of laminarinase Lam16A from *Phanerochaete chrysosporium*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62:1422-1429.

Vasur J, Kawai R, Andersson E, Igarashi K, Sandgren M, Samejima M, Ståhlberg J (2009) X-ray crystal structures of *Phanerochaete chrysosporium* laminarinase 16A in complex with products from lichenin and laminarin hydrolysis. *FEBS J* 276:3858-3869.

Villettaz J-C, Steiner D, Trogus H (1984) The use of a β -glucanase as an enzyme in wine clarification and filtration. *Am J Enol Vitic* 35:253-256.

Wang H, Jones RW (1999) Properties of the *Macrophomina phaseolina* endoglucanase (EGL 1) gene product in bacterial and yeast expression systems. *Appl Biochem Biotechnol* 81:153-160.

Weinstock KG, Bush D (2009) Nucleic acid and amino acid sequences relating to *Aspergillus fumigatus* for diagnostics and therapeutics. Patent US 7504490B1.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Hg.) *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego: 315-322.

Wilcox WW (1968) Changes in wood microstructure through progressive stages of decay. United States Department of Agriculture, Forest Service, Research Paper, Forest Products Laboratory FPL 70:1-45.

Yamamoto S (1992) Mammalian lipoxygenases: Molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta* 1128:117-131.

Yip VLY, Withers SG (2004) Nature's many mechanisms for the degradation of oligosaccharides. *Org Biomol Chem* 2:2707-2713.

Zeković DB, Kwiatkowski S, Vrvić MM, Jakovljević D, Moran CA (2005) Natural and modified (1→3)- β -D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Crit Rev Biotechnol* 25:205-230.

Zhang Y-J, Pan H-Y, Gao S-J (2001) Reverse transcription slippage over the mRNA secondary structure of the LIP1 gene. *BioTechniques* 31:1286-1294.

Zverlov VV, Volkov IY, Velikodvorskaya TV, Schwarz WH (1997) Highly thermostable endo-1,3- β -glucanase (laminarinase) LamA from *Thermotoga neapolitana*: nucleotide sequence of the gene and characterization of the recombinant gene product. *Microbiology* 143:1701-1708.