

Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Thilo Peters
geboren am 31.03.1973 in Einbeck

2004

Tag der Promotion: 27.05.2004

Referent: Prof. Dr. Ralf Günter Berger

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Hahn

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1999 bis März 2003 am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ralf Günter Berger angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem verehrten Doktorvater

Prof. Dr. Ralf Günter Berger

für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, seine stete Gesprächsbereitschaft, den gewährten großen Freiraum bei der Bearbeitung des Themas und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Prof. Dr. Andreas Hahn danke ich für die Übernahme des Korreferats.

PD Dr. Holger Zorn danke ich herzlich für die Einführung in molekularbiologische Arbeitstechniken, zahlreiche anregende Diskussionen, viele gute Tips, seine stete Hilfsbereitschaft sowie die konstruktive Kritik beim Schreiben dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für eine Zeit, die nie langweilig wurde, für die gute Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis. Ganz besonders danke ich meinem Laborkollegen Carsten Weiß für zahlreiche anregende Diskussionen und vor allem für eine unvergeßliche Zeit in R515. Besonders danken möchte ich auch Bianca Brauer und Sylvia Borchers, die sowohl durch ihre fachliche als auch soziale Kompetenz meine Zeit am Institut für Lebensmittelchemie geprägt haben.

Herrn Dr. Manfred Nimtz von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig, danke ich für die Sequenzierung von Peptiden mittels ESI-MS/MS.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Braun und Holger Eubel vom Institut für Angewandte Genetik danke ich für die Einführung in die 2D-Elektrophorese und die Unterstützung bei der Aufnahme von Fluoreszenzbildern.

Herrn Dr. Hans Dieter Werlein vom Institut für Lebensmittelwissenschaften danke ich für die Unterstützung bei der Aufnahme von Digitalfotos.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die unumstößlich an mich glauben und mich unterstützen.

Vor allem aber danke ich meiner Frau Imke, denn ohne ihre Liebe und Unterstützung wäre diese Arbeit nie vollendet worden.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der industriellen Lebensmittelverarbeitung fallen ligninhaltige Abfallstoffe wie beispielsweise Nußschalen oder Extraktionsrückstände der Essenzengewinnung in großem Maßstab an. Insbesondere Basidiomyceten verfügen über eine Reihe lignolytischer Enzyme, welche in der Natur für den Abbau von Lignin und Lignocellulose verantwortlich sind. 46 Basidiomyceten wurden in Oberflächenkulturen mit gemahlenen Erdnußschalen über einen Zeitraum von 28 Tagen kultiviert. Die Expression und Aktivität vier verschiedener lignolytischer Redox-Systeme (Polyphenoloxidasen, Laccasen, Tyrosinasen und Peroxidasen) wurde im Verlauf der Kultivierung durch Farbreaktionen überprüft und mit Kulturen ohne Zusatz von Erdnußschalen verglichen. Besonders hohe Enzymaktivitäten sowohl mit als auch ohne Erdnußschalen zeigten die Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* (ein naher Verwandter des Austernseitlings (*P. ostreatus*)), *Marasmius scorodonius* (Knoblauchschwinding), *Lepista irina* (Veilchen-Rötelritterling) und *Meripilus giganteus* (Riesenporling). Für die Analyse der in das Kulturmedium sekretierten Proteine mittels hochauflösender zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) wurden *L. irina* und *P. sapidus* ausgewählt. Die Organismen wurden auf Erdnußschalen bzw. Glaswolle immobilisiert und sieben Tage statisch inkubiert. Danach wurde mit Nährmedium versetzt und unter Schütteln weitere sieben Tage bis zur Aufarbeitung der Kulturmedien inkubiert. Die sekretierten Proteine aus Kultivierungen auf Erdnußschalen und Glaswolle wurden mittels 2D-PAGE verglichen. Ausgewählte Proteinspots aus 2D-PA-Gelen von *P. sapidus*-Kultivierungen wurden einer *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS zugeführt und anhand von Datenbankrecherchen bestimmten Enzymklassen zugeordnet. Hochsignifikante Homologien zu Manganperoxidasen und verschiedenen Peptidasen wurden erhalten. Zur Untersuchung der Expressionskinetik in das Kulturmedium sezernierter Proteine von *P. sapidus* auf Erdnußschalen wurden 2D-PA-Elektropherogramme nach Inkubationszeiten von zwei, vier, sechs und acht Tagen erstellt. Für eine molekularbiologische Charakterisierung der Enzyme wurde eine cDNA-Bibliothek von *P. sapidus* erstellt und Primerpaare für die PCR konstruiert. Durch *multiple sequence alignment* von Laccase-cDNA-Sequenzen verschiedener Basidiomyceten wurde eine Konsensussequenz formuliert. An die Konsensussequenz bindende Primerpaare lieferten nach PCR-Amplifikation, Ligation des erhaltenen Amplifikats in einen Plasmidvektor und Sequenzierung eine cDNA-Sequenz mit hochsignifikanten Homologien zu Laccasen aus *P. ostreatus* und *P. sajor-caju*. Durch Kombination von klassischer IEF mit immobilisiertem pH-Gradienten und SDS-PAGE als Variante der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde eine neue Lipase aus *P. sapidus* charakterisiert, die effektiv die Hydrolyse von Sorbitanestern katalysiert.

Schlagworte: Basidiomyceten, *Pleurotus sapidus*, *Lepista irina*, extrazelluläre Proteine, Laccase, zweidimensionale Gelelektrophorese

ABSTRACT

Food processing industry produces high amounts of lignin-containing waste, i.e. nutshells or extraction residues. Especially basidiomycetes are capable of degrading lignin and lignocellulose.

46 basidiomycetes were cultivated on agar plates containing ground peanut shells over 28 days. Four different lignolytic enzyme systems (polyphenol oxidases, laccases, tyrosinases and peroxidases) were tested by dye forming reactions and compared to basidiomycetes growing without peanut shells. *Pleurotus sapidus*, *Marasmius scorodoni*, *Lepista irina* and *Meripilus giganteus* showed high enzyme activity with and without peanut shells as substrate.

During submerged cultivation of *P. sapidus* and *L. irina* with peanut shells proteins secreted into the culture medium were analysed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). Both organisms were incubated separately over seven days (non shaken) on peanut shells or glass wool for complete immobilization to the substrate. 2D-gel protein patterns of cultivations on peanut shells or glass wool were compared and protein spots were analysed by ESI-MS/MS *de novo* sequencing. Significant homologies to manganese peroxidases and several peptidases were obtained. In order to analyse the kinetics of protein secretion 2D-gels were made after two, four, six and eight days of incubation.

For further characterization of the proteins a cDNA library of *P. sapidus* and PCR primers were constructed. A consensus for laccase was formulated by multiple sequence alignment of different laccase cDNAs. After PCR amplification, ligation into a plasmid vector and sequencing a new laccase cDNA was obtained, highly homologous to *P. ostreatus* and *P. sajor-caju* laccases.

By combination of conventional IEF using immobilized pH gradients and SDS-PAGE as a variation on two-dimensional gel electrophoresis, a new *P. sapidus* lipase capable of hydrolysing sorbitane esters was found.

Keywords: basidiomycetes, *Pleurotus sapidus*, *Lepista irina*, extracellular proteins, laccase, two-dimensional gel electrophoresis.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
AA	Acrylamid
AAO	Arylalkoholoxidase
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)-Diammoniumsalz
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
b	Base(n)
bidest.	Bidestilliert
BisAA	N,N-Methylen-bisacrylamid
BFM	Biofeuchtmasse
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Chl	Chloramphenicol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Erwartungswert als Maß für die Ähnlichkeit von DNA- u. Peptidsequenzen
EC	Enzymkommission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
$\epsilon_{x \text{ nm}}$	Extinktionskoeffizient bei x nm
ESI	Elektrospray-Ionisierung
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
k	kilo
KAc	Kaliumacetat
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertani
LiP	Ligninperoxidase
Lsg.	Lösung
M	molar
MALDI	matrix assisted laser desorption ionization
m	milli oder Meter
mA	Milliampere
μ	mikro

min	Minute(n)
MnP	Manganperoxidase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (Größenausschluß)
n	nano
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Ribonukleosid-5'-triphosphat
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD _{x nm}	Optische Dichte bei x nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
pfu	<i>plaque forming units</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography, Größenausschlußchromatographie
SL	Stammlösung
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	time of flight
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	ultravioletter Wellenlängenbereich des Lichts
V	Volt
Vh	Voltstunden
% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (m/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt. Eine Zahl hinter der Bezeichnung kennzeichnet die Position der Aminosäure innerhalb des Proteins.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zielsetzung.....	8
2	MATERIAL	10
2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	10
2.1.1	Lösungsmittel	12
2.1.2	Substrat	13
2.2	Basidiomyceten	13
2.3	Geräte	15
2.4	Materialien für die Molekularbiologie	16
2.4.1	Reagenzienzusammenstellungen	16
2.4.1.1	RNA-Isolierung aus Pilzen	16
2.4.1.2	Erstellung von cDNA-Bibliotheken	16
2.4.1.3	Verpackung von λ -Phagen-DNA	16
2.4.1.4	Präparation von λ -Phagen-DNA	16
2.4.1.5	DNA-Extraktion aus Agarose.....	16
2.4.1.6	Klonierung von PCR-Fragmenten in Plasmid-Vektoren.....	16
2.4.2	Enzyme	16
2.4.3	Standards	16
2.4.4	Bakterienstämme	17
2.4.5	Puffer, Medien und Stammlösungen	17
3	METHODEN	18
3.1	UV/VIS-Spektroskopie.....	18
3.2	Mikrobiologie	18
3.2.1	Sterilisation der Kulturmedien	18
3.2.2	Kulturmedien für Basidiomyceten	18
3.2.2.1	Standardnährmedium mit Hefeextrakt (SNL-H) [SPRECHER, 1959]	18
3.2.2.2	Stickstoffarmes Nährmedium [mod. nach ABRAHAM, 1994]	19
3.2.2.3	Festes Nährmedium mit Lignin und Erdnußschalen (L/E-Agar)	20
3.2.2.4	Festes Nährmedium mit Erdnußschalen	20
3.2.3	Kultivierung der Basidiomyceten	21

3.2.3.1	Stammkulturen	21
3.2.3.2	Stammkulturen auf festem Nährmedium mit Lignin	21
3.2.3.3	Vorkulturen	21
3.2.3.4	Hauptkulturen.....	21
3.2.4	Bestimmung der Kulturparameter.....	22
3.2.4.1	pH-Wert	22
3.2.4.2	Glucose.....	22
3.2.4.3	Feuchtmasse	22
3.2.4.4	Prüfung auf Kontaminationsfreiheit.....	22
3.2.4.5	Bestimmung der Glucoseoxidase-Aktivität	22
3.2.4.6	Bestimmung der Laccaseaktivität	24
3.2.4.7	Bestimmung des Proteingehaltes	25
3.2.4.8	Bestimmung der Lipaseaktivität	26
3.2.5	Ligninabbau: Nachweis relevanter Enzyme	26
3.2.5.1	Diskontinuierliche Detektion durch Farbreaktionen.....	26
3.3	Gelelektrophorese	27
3.3.1	Probenvorbereitung.....	27
3.3.1.1	Dialyse	27
3.3.1.2	Proteinfällung.....	28
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.3.3	Isoelektrische Fokussierung.....	29
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	30
3.3.5	Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	31
3.3.5.1	Stammlösungen [AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1998]	31
3.3.5.2	Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten.....	33
3.3.5.3	Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese.....	34
3.3.6	Färbemethoden für die Gelelektrophorese.....	35
3.3.6.1	Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat)	35
3.3.6.2	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue.....	36
3.3.6.3	Silberfärbung.....	37
3.4	Proteinanalytik.....	39
3.4.1	Massenspektrometrische Analyse.....	39

3.4.2	Testverfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Sorbitanestern [nach ZORN <i>et al.</i> , 2003a]	40
3.5	Molekularbiologische Methoden	41
3.5.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	41
3.5.2	Temperaturprogramme für den Thermocycler	42
3.5.3	Propagation von λ -Phagen [nach SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989]	42
3.6	Sonstige Methoden	43
3.6.1	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach GUTFINGER (1981)	43
4	ERGEBNISSE	45
4.1	Erdnußschalen als ligninhaltiges Substrat	45
4.2	Auswahl von ligninabbauenden Basidiomyceten	45
4.3	Submerskultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i> und <i>Lepista irina</i>	49
4.3.1	Statisch-dynamische Kultivierung	49
4.3.1.1	Submerskultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i>	49
4.3.1.2	Submerskultivierung von <i>Lepista irina</i>	53
4.3.2	Kultivierung im <i>fed batch</i> -Verfahren	56
4.4	Sekretom-Analytik mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese	59
4.4.1	Probenvorbereitung	59
4.4.2	Methodenentwicklung zur Visualisierung der Proteinmuster	59
4.4.2.1	Präzipitation der Proteine	59
4.4.2.2	Reproduzierbarkeit	62
4.4.3	pI-Bereich der Proteinexpression	63
4.5	Expressionsmuster bei induzierter und nicht induzierter Kultivierung von <i>Lepista irina</i>	64
4.6	Kinetik der Proteinexpression bei <i>P. sapidus</i>	66
4.6.1	Expressionsmuster bei induzierter und nicht induzierter Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i>	70
4.7	Proteinidentifizierung	74
4.8	Konstruktion einer cDNA-Bibliothek von <i>P. sapidus</i>	79
4.8.1	Konstruktion von Primerpaaren für die PCR	81
4.9	Charakterisierung einer neuen Lipase aus <i>P. sapidus</i>	86
5	DISKUSSION	89
5.1	Auswahl eines ligninhaltigen Substrats	90

5.2	Auswahl von ligninabbauenden Basidiomyceten	91
5.3	Kultivierung von <i>Pleurotus sapidus</i> und <i>Lepista irina</i>	94
5.4	Analytik mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese	99
5.5	Kinetik der Proteinexpression bei <i>Pleurotus sapidus</i>	102
5.6	Proteinidentifizierung	105
5.7	Konstruktion einer cDNA-Bibliothek von <i>Pleurotus sapidus</i>	114
5.8	Charakterisierung einer neuen Lipase aus <i>Pleurotus sapidus</i>	116
5.9	Fazit und Ausblick	120
6	LITERATUR.....	122
7	ANHANG.....	139
7.1	Ligninabbau: Diskontinuierliche Detektion von relevanten Enzymen durch Farbreagenzien.....	139
7.2	<i>multiple sequence alignment</i> mit CLUSTAL W.....	149

1 EINLEITUNG

Lignin ist nach Cellulose das zweithäufigste Biopolymer auf unserem Planeten. Es gehört ebenso wie Cellulose zu den Hauptkomponenten pflanzlichen Materials und ist eine in nahezu unbegrenzter Menge verfügbare Form aromatischer Verbindungen. Der Abbau von Lignin ist deshalb von unmittelbarer Bedeutung für den globalen Kohlenstoffkreislauf.

In der Natur liegen Lignin und Cellulose fast immer vergesellschaftet vor. Lignocellulose ist ein kompakter, teilweise kristalliner Komplex. Polysaccharide formen Cellulose- oder Hemicellulosemicrofasern, die dicht gepackt zwischen Ligninschichten liegen.

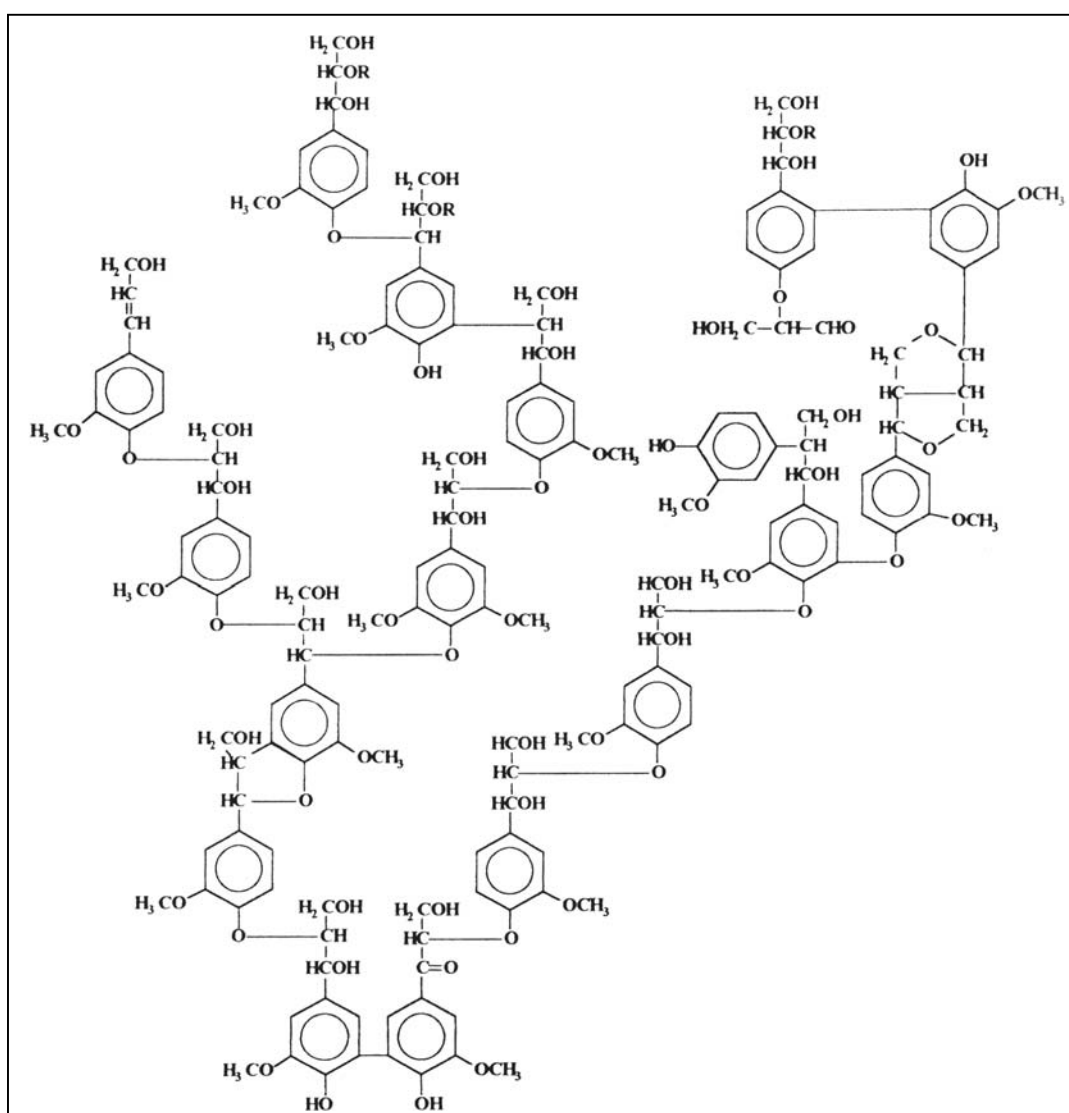


Abb. 1.1: Strukturmodell von Fichtenholzignin nach Adler [CHO & DREHER, 2001]

Diese Ligninschichten schützen vor einem hydrolytischen Angriff, wirken als Bestandteil des Xylem durch Hydrophobisierung unterstützend bei der Regulation des Wassertransportes und

verleihen der Pflanze die nötige Festigkeit und Steifheit [LEONOWICZ *et al.*, 1997]. Der Terminus „Lignin“, abgeleitet vom lateinischen „lignum“ (= Holz), wurde erstmals 1838 von PAYEN eingeführt. In Abbildung 1.1 ist ein Strukturmodell von Lignin dargestellt.

Die komplexe Natur des Lignins entsteht durch die verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten der drei Grundbausteine Coniferyl-, Sinapyl- und Cumarylalkohol [SARKANEN & LUDWIG, 1971]. So stellt der komplexe Aufbau des Lignins für die meisten Mikroorganismen eine Barriere dar. Ein Abbau ist nur durch oxidativen Angriff möglich, da sich die Bindungen im Ligninpolymer hydrolytisch nicht spalten lassen [HOFRICHTER & STEINBÜCHEL, 2001].

Die effizientesten und am besten untersuchten ligninabbauenden Mikroorganismen sind die zu den Basidiomyceten (Ständerpilzen) gehörenden Weißfäulepilze. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind z.B. beliebte Speisepilze wie Shiitake (*Lentinus edodes*), Hallimasch (*Armillaria mellea*) oder der Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*). Als Saprophyten leben sie vom Um- und Abbau des Lignins und verfügen daher über eine Reihe extrazellulärer Enzyme.

Diese Enzyme können in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe faßt die Enzyme zusammen, die direkt das verholzte Material angreifen. Dazu gehören Enzyme, die entweder Kohlenhydratkomponenten (Cellulose und Hemicellulose) oder das Lignin umwandeln:

- Cellulasen:

- Endo-1,4- β -glucanasen (EDG; EC 3.2.1.4)

- Exo-1,4- β -glucanasen (EXG; Cellobiohydrolasen (CBH; EC 3.2.1.91),

- Glucohydrolasen (GCH))

- β -Glucosidasen (BGS; EC 3.2.1.21).

- Phenoloxidasen für den Ligninabbau:

- Ligninperoxidasen (LiP; EC 1.11.1.14)

- Manganperoxidasen (MnP; EC 1.11.1.13)

- Laccasen (LAC; EC 1.10.3.2)

- Tyrosinase (TYR; als Monophenol-Monooxygenase EC 1.14.18.1 oder

- Catechinoxidase EC 1.10.3.1).

- Dioxygenasen:

- Protocatechuat-3,4-dioxygenase (P34D; EC 1.13.11.3)

- 1,2,4-Trihydroxybenzen-1,2-dioxygenase (TBH12D)

- Catechol-1,2-dioxygenase (C12D; EC 1.13.11.1).

Die zweite Gruppe der extrazellulären Enzyme beinhaltet Superoxid-Dismutasen (SOD; EC 1.15.1.1) und Glyoxaloxidasen (GLO; EC 1.2.3.5). Diese Enzyme arbeiten mit denen der ersten Gruppe zusammen und katalysieren den Abbau verholzten Gewebes nur indirekt. Superoxid-Dismutasen treten in nahezu allen Organismen auf. In ihrem aktiven Zentrum können verschiedene Metallionen wie z.B. Eisen (FeSOD), Mangan (MnSOD) oder Kupfer und Zink (CuZnSOD) enthalten sein. Ihre Aufgabe besteht darin, die Zelle vor oxidativem Streß zu schützen. Als Oxidoreduktasen wandeln sie das Radikalanion Hyperoxid O_2^- („Superoxid“) in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff um [MCCORD & FRIDOVICH, 1969; LEHMANN *et al.*, 1996]. Die toxischen Hyperoxidradikale treten gewöhnlich während des Chinon-Redoxzyklus auf, bei dem wiederum Laccasen eine wichtige Rolle spielen (LEONOWICZ *et al.*, 1999).

Zur dritten Gruppe gehören die sogenannten *feed back*-Enzyme. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Verknüpfung der unterschiedlichen Metabolismen während des Abbaus von verholzten Substraten. Dazu gehören folgende Enzyme: Glucose-1-oxidasen (GOD; EC 1.1.3.4), Arylalkoholoxidasen (AAO; EC 1.1.3.7, z.B. Veratrylalkoholoxidase VAO), Pyranose-2-oxidase (P2O; EC 1.1.3.10), Cellobiose:Chinon-Oxidoreduktase (CBQ; EC 1.1.5.1) und Cellobiosedehydrogenase (CDH; EC 1.1.99.18).

Die oben genannten Enzyme sind in der Lage, sowohl einzeln als auch in Kooperation miteinander zu arbeiten.

Lignolytische Enzyme wurden jedoch nicht nur in Weißfäulepilzen gefunden, sondern beispielsweise auch in *Neurospora crassa* [GERMANN *et al.*, 1988], *Aspergillus nidulans* [ARAMAYO & TIMBERLAKE, 1990] oder *Rhizoctonia solani* [WAHLEITHNER *et al.*, 1996].

Eine schematische Darstellung des Abbaus von Lignocellulose ist in Abbildung 1.2 gezeigt. Das Enzym Glucoseoxidase spielt dabei eine zentrale Rolle. So sorgt es für die Verknüpfung der einzelnen, zunächst getrennten Abbaupfade des Lignins und der Cellulose. Cellulose wird durch Cellulasen hydrolysiert. Die dabei entstandene Glucose dient als Substrat für die GOD. Anstelle von Sauerstoff können auch die von Laccase produzierten Chinone aus Lignin-oligomeren als Substrate der GOD dienen. D-Glucose- δ -lacton wird als Produkt der Glucose-Oxidation im Pentosephosphat-Zyklus oder in der Glykolyse weiterverwertet. Das bei der Glucose-Oxidation ebenfalls entstehende Wasserstoffperoxid aktiviert Manganperoxidasen und Lignin, das in kleinere Fragmente mit Methoxygruppen zerfällt. Laccasen demethylieren diese Oligomere und bauen sie dadurch zu noch kleineren Fragmenten ab [POTTHAST *et al.*, 1995]. Glucoseoxidasen verhindern weiterhin, daß ein Überschuß an Chinonen entsteht und

damit eine mögliche Repolymerisation stattfindet. Die Chinone werden zu den entsprechenden Phenolen reduziert, welche wiederum als Substrat für die Dioxygenasen dienen. Es entstehen Ketosäuren als Abbauprodukte der aromatischen Systeme, die im Krebs-Zyklus weiter verstoffwechselt werden. Nach diesem Mechanismus kann der Abbau von Lignocellulose durch diejenigen Pilzen erfolgen, die über die beschriebene Enzymausstattung verfügen [LEONOWICZ *et al.*, 1999].

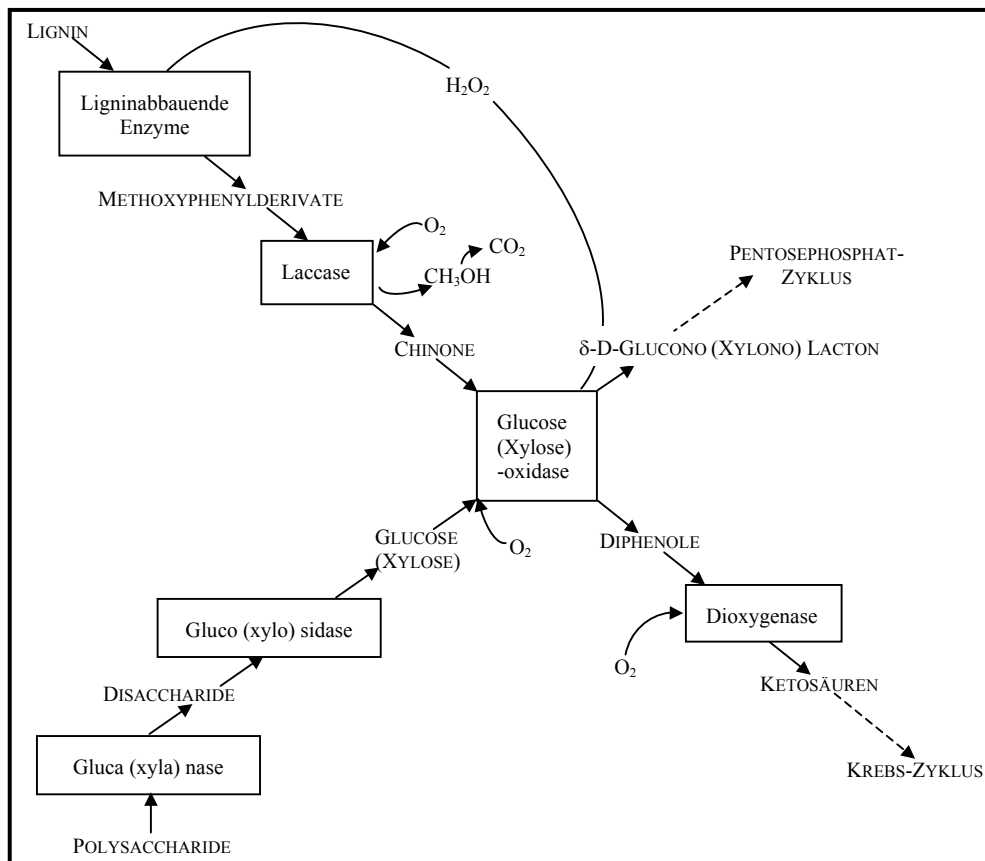


Abb. 1.2: Hypothetischer Mechanismus für die Lignocellulose-Transformation durch Enzyme aus Weißfäulepilzen (nach LEONOWICZ *et al.*, 1986).

Entsprechend der ausgeschiedenen lignolytischen Enzyme können fünf Gruppen der Weißfäulepilze unterschieden werden [HATAKKA, 1994]:

- Mn- und Lignin-Peroxidase-Gruppe (MnP-LiP)
- Lignin-Peroxidase- und Laccase-Gruppe (LiP-LAC)
- Mn-Peroxidase- und Laccase-Gruppe (MnP-LAC)
- Mn-Lignin-Peroxidase- und Laccase-Gruppe (MnP-LiP-LAC)
- Streuzersetzer (Mn-Peroxidase und Laccase).

Bei der menschlichen Ernährung spielen Lignin, Cellulose und Hemicellulose als Ballaststoffe eine wichtige Rolle. Sie sind unverdauliche Nahrungsbestandteile, regen die Darmtätigkeit und die Verdauung an und verkürzen die Darmpassage. Darüber hinaus soll eine Einnahme von 25-35 g Ballaststoffen pro Tag das Risiko für Darmkrebs deutlich senken [EASTWOOD, 1974; KELSAY, 1978; MARLETT *et al.*, 2002].

Das phenylpropanoide Ligninpolymer stellt einen idealen Ausgangsstoff für eine Bio-transformation in potente Aromastoffe oder antioxidativ wirksame Verbindungen dar. Um die enzymatische Lyse eines bestimmten pflanzlichen Substrates zu optimieren, ist es zunächst notwendig, einen für den Abbau geeigneten Organismus zu finden. Bei Beschränkung auf ausschließlich in der Natur vorkommende Organismen und Substrate für eine Bio-transformation werden nach europäischem Lebensmittelrecht „natürliche“ Aromen oder Antioxidantien erhalten [AROMENVO §1(1) i.V.m. Anl. 1]. Ein kostengünstiges ligninhaltiges Substrat stellen Erdnußschalen (*Arachis hypogaea* L.) dar, die bei der industriellen Lebensmittelverarbeitung in großen Mengen als Abfall anfallen. Als effiziente Verwerter von Erdnußschalen zeigten sich *Pleurotus sapidus*, ein naher Verwandter des Austernseitlings (*P. ostreatus*) und ebenso geschätzter Speisepilz, *Lepista irina* (Veilchen-Rötelritterling), der „Würzpilz“ *Marasmius scorodoni* (Küchenschwindling oder Knoblauchpilz) und *Meripilus giganteus* (Riesenporling) (vgl. Kap. 4.2).

Während lignolytische Enzyme aus Weißfäulepilzen in der papierverarbeitenden Industrie bereits seit langem technologisch genutzt werden und eine Vielzahl von Patentschriften vorliegt (SCOTT & AKHTAR, 2001), ist das Potential dieser Enzyme zur Produktion hochwertiger Lebensmittelinhaltsstoffe bislang nur wenig untersucht. So erwies sich kürzlich eine Lipase aus *Pleurotus sapidus* als hocheffizient bei der Esterspaltung von Lutein- und Capsanthinestern [ZORN *et al.*, 2003a]. Diese Carotinoide finden vor allem als Lebensmittelzusatzstoffe und Nahrungsergänzungsmittel Verwendung. Des weiteren bilden *L. irina* und *M. scorodoni* beim Abbau von β,β -Carotin flüchtige Verbindungen, die wertvolle Aromastoffe für die Riechstoffindustrie darstellen [ZORN *et al.*, 2003d & 2003e]. Bei dem β,β -Carotin-spaltenden Enzym aus *L. irina* handelt es sich um eine polyvalente Peroxidase, welche typische katalytische Eigenschaften sowohl von Manganperoxidasen als auch von Ligninperoxidasen aufweist. Polyvalente Peroxidasen oxidieren ein breites Spektrum an phenolischen und nicht-phenolischen aromatischen Substraten entweder direkt (wie Ligninperoxidasen) oder ähnlich wie Manganperoxidasen indirekt über die Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{3+} [GOMEZ-TORIBIO *et al.*, 2001; RUIZ-DUENAS *et al.*, 1999 & 2001].



Abb. 1.3: **Links:** Fruchtkörper von *Lepista irina* (Veilchen-Rötelritterling),
 Quelle: http://www.pilzepilze.de/piga/zeige.htm?name=lepista_irina (17.01.2004)
Rechts: Fruchtkörper von *Pleurotus sapidus*,
 Quelle: http://botit.botany.wisc.edu/images/332/Basidiomycota/Hymenomycetes/Agaricales/Pleurotus/P.sapidus_in_bag_2_tjv.html (17.01.2004)

Um den Abbau lignocellulosehaltiger Substrate zielgerichtet beeinflussen zu können, ist es nötig, detaillierte Informationen über Art, Expressionsmuster und Induktion der beteiligten Enzyme zu erhalten und so die hochkomplexen Wechselwirkungen in ihrer Gesamtheit zu erfassen. Die Charakterisierung des sogenannten „Sekretoms“, der extrazellulären, an die Umgebung abgegebenen Proteine, erfolgt daher am sinnvollsten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese als hochauflösende Trennmethode.

Die erste Gelelektrophorese wurde in den Dreißiger Jahren von dem schwedischen Wissenschaftler Arne Tiselius entwickelt, der unter anderem dafür 1948 den Nobelpreis für Chemie erhielt [TISELIUS, 1958]. Polyacrylamidgele wurden durch RAYMOND & WEINTRAUB (1959) und Agarosegele durch HJERTEN (1962) als inerte Matrices eingeführt, und kurze Zeit später war die sogenannte diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach LAEMMLI, 1970) als Grundlage moderner Elektrophoreseverfahren entwickelt [ORNSTEIN, 1964; DAVIS, 1964].

Durch die Synthese von Trägerampholyten wurde ein neues Trenn- und Meßprinzip für Proteine realisiert [VESTERBERG & SVENSSON, 1966]. Bei der sogenannten isoelektrischen Fokussierung (IEF) wandern Proteinmoleküle in einem pH-Gradienten bis zu dem pH-Wert, der ihrem isoelektrischen Punkt entspricht und an dem sie eine Nettoladung von Null und daher keine Wanderungsgeschwindigkeit mehr haben. 1967 kamen die Elektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen [SHAPIRO *et al.*] und die Gradientengeltechnik von MARGOLIS & KENRICK hinzu.

1975 konnten O'FARELL & KLOSE durch Kombination von isoelektrischer Fokussierung und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erstmals ganze Zelllysate in ihre sämtlichen Proteine auftrennen und hatten damit die zweidimensionale Elektrophorese (2D-Elektrophorese) entwickelt.

Durch die Einführung immobilisierter pH-Gradienten wurden 1982 die Probleme der isoelektrischen Fokussierung und der damit verbundenen geringen Reproduzierbarkeit der 2D-Elektropherogramme gelöst [BJELLQVIST *et al.*], woraufhin 1988 durch GÖRG *et al.* die 2D-Elektrophorese mit immobilisierten pH-Gradienten etabliert werden konnte. Es war eine neue Generation der 2D-Gelelektrophorese entstanden, eine Analysenmethode mit höchstem Auflösungsvermögen zur Trennung komplexer Proteingemische, welche sich sowohl durch ihre hohe Reproduzierbarkeit der 2D-Muster für qualitative und quantitative Vergleiche als auch durch ihre hohe Beladungskapazität (bis zu 10 mg Protein pro Gel) für die mikropräparative Auftrennung auszeichnete.

Die ersten 2D-Elektrophoresen wurden unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Erst durch den Einsatz von Harnstoff, β -Mercaptoethanol und dem nicht-ionischen Detergenz Nonidet NP-40 gelang es, ganze Zellinhalte mit nochmals erhöhter Reproduzierbarkeit aufzutrennen [STRAHLER *et al.*, 1987]. Die Einführung der Silberfärbung erhöhte deutlich die Sensitivität der Analytik mittels 2D-PAGE und erlaubte die Visualisierung einiger tausend Proteinspots auf einem einzigen Gel [MERRIL & WASHART, 1998]. Dadurch wurde die Komplexität verschiedener Proteome vor allem von Säugerzellen deutlich, die wahrscheinlich umfangreicher ist als das beste Trennungsvermögen aktueller 2D-Systeme. Denn Proteine sind nach ihrer Synthese in der Zelle posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Acetylierung und Glycosylierung unterworfen. Sämtliche Stadien der Modifikation eines einzelnen Proteins sind auf 2D-Gelen sichtbar und generieren Ketten von *Spots* aus einem Vorläufermolekül [GOOLEY & PACKER, 1997].

Zur Zeit ist die 2D-Gelelektrophorese die einzige Trenntechnik, die in der Lage ist, einen Trennraum für etwa 10000 Komponenten zur Verfügung zu stellen [GÖRG & WESTERMEIER, 1998; GÖRG *et al.*, 2000].

Die durch 2D-Gelelektrophorese getrennten Proteine lassen sich als angefärbte *Spots* in der Gelmatrix ausschneiden und mit Trypsin in definierte Polypeptide hydrolysieren, die anschließend mittels massenspektrometrischer Analyse (ESI-MS/MS) *de novo* sequenziert werden können. Eine weitere Charakterisierung erfolgt durch Vergleich der Aminosäuresequenzen über Online-Datenbanken. Bei Organismen, deren Genom vollständig sequenziert

wurde, können Proteine anhand ihres charakteristischen Peptidmusters in vergleichsweise kurzer Zeit mittels automatisierbarer MALDI-MS identifiziert werden.

In der Klasse der Pilze (*fungi*) befinden sich eine Reihe von Spezies, deren Genome bereits vollständig sequenziert sind. Dazu gehören neben der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (und weiterer Vertreter der Gattung *Saccharomyces*) und der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* auch *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea* und *Aspergillus nidulans*. In einem kommerziellen Gemeinschaftsprojekt mehrerer Firmen wurde 2001 das Genom des Deuteromyceten *Aspergillus niger* sequenziert [DSM, 2001]. Das erste frei zugängliche Genom eines Basidiomyceten ist das von *Phanerochaete chrysosporium*, einem der am besten untersuchten Weißfäulepilze [DOE JOINT GENOME INSTITUTE, 2002].

Bei der Sequenzierung von Mikroorganismen wird heute standardmäßig die Methode der *Expressed Sequence Tags* (ESTs) eingesetzt [ADAMS *et al.*, 1991]. ESTs sind 100 bis 300 Basenpaar lange Sequenzen von Genen. Sie tragen selbst keine Funktion, erlauben jedoch über die Basensequenz den schnellen Vergleich mit bereits aus anderen Organismen bekannten Genen und erleichtern so die Entschlüsselung eines unbekannten Genoms. Bei dieser „Schrotschuß“-Methode wird zunächst eine cDNA-Bibliothek erstellt und die einzelnen cDNAs in Vektoren kloniert. Die erhaltenen Klone werden anschließend zufällig ausgewählt und sequenziert. Zum Vergleich kann eine EST-Datenbank (dbEST) beim amerikanischen *National Centre of Biological Information* (NCBI) herangezogen werden, wodurch die erhaltenen ESTs bekannten Genen zugeordnet werden können.

Diese Methode eignet sich auch für die Untersuchung und den Vergleich verschiedener Kultivierungsstadien bei Basidiomyceten wie z.B. *Agaricus bisporus* (Zuchtchampignon) [OSPINA-GIRALDO *et al.*, 2000].

1.1 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, den enzymatischen Abbau von Erdnußschalen durch Basidiomyceten zu untersuchen. Um Organismen, die eine effiziente Biotransformation gewährleisten, ausfindig zu machen, sollten zunächst in einem *Screening* Basidiomyceten auf die Expression ihrer extrazellulären, für den Ligninabbau verantwortlichen Redox-Enzymsysteme untersucht werden.

Für den mikrobiologischen Prozeß stand die detaillierte Untersuchung der extrazellulären Enzyme im Vordergrund des Interesses. Als Methode zur Analyse sämtlicher durch den Organismus in das Kulturmedium sezernierter Proteine sollte die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese dienen.

Folgende Pläne wurden für die Arbeit formuliert:

1. *Screening* einer möglichst großen Anzahl von Basidiomyceten auf ihre Fähigkeit zum effizienten Abbau von Erdnußschalen.
2. Detaillierte Analyse des Sekretoms ausgewählter Basidiomyceten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.
3. Aufnahme einer Kinetik der Enzymexpression über den Kultivierungsverlauf und Vergleich der Expression bei Kultivierung mit und ohne Erdnußschalen.
4. Charakterisierung ausgewählter Enzyme des Sekretoms durch *de novo*-Sequenzierung mittels ESI-MS/MS und Datenbankrecherche.
5. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek für eine molekularbiologische Charakterisierung exprimierter Enzyme.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Nährmedienbestandteile

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
Agar-Agar	f. Mikrobiol.	Merck (Darmstadt)
Ammoniumtartrat	$\geq 99 \%$	Fluka (Neu-Ulm)
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Fluka
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	purum	Fluka
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	99 %	Baker (Griesheim)
D(+)-Glucose-Monohydrat	f. Mikrobiol.	Merck
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	reinst	Riedel-de Haën (Seelze)
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Fluka
H_3BO_3	reinst	Riedel-de Haën
Hefeextrakt	f. Mikrobiol.	Merck
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Fluka
KH_2PO_4	f. Mikrobiol.	Merck
L-Asparagin-Monohydrat	99 %	Merck
Lignosulfonsäure-Natriumsalz	-	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
MgSO_4	DAB 7	Riedel-de Haën
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Fluka
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$> 98 \%$	Fluka
NaCl	p.a.	Fluka
Nitrilotriacetat	purum	Fluka
Organosolv-Lignin	-	Aldrich
Thiaminhydrochlorid	$> 99 \%$	Fluka
Titriplex III (EDTA)	$> 99 \%$	Merck
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	puriss. p.a.	Fluka

Tabelle 2.2: Chemikalien für die Proteinbiochemie

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
Acrylamidlsg. (Rotiphorese Gel A)	30 %	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid-/Bisacrylamidlsg.	40 % (37,5 : 1)	Merck
Agarose	f. Molekularbiol.	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	> 98 %	Roth
L-Arginin	f. Mikrobiol.	Fluka
L-Asparaginsäure	-	ICN (Eschwege)
Bisacrylamidlsg. (Rotiphorese Gel B)	2 %	Roth
Bradford-Reagenz (Roti [®] -Quant)	-	Roth
Bromphenolblau	f. Elektrophorese	Roth
Citronensäure Monohydrat	puriss. p.a.	Fluka
Ethylendiamin	-	Merck
Formaldehyd	37 %	Sigma-Aldrich
L-Glutaminsäure	> 99 %	Fluka
Glycerol	> 98 %	Roth
L-Glycin	analytical grade	Serva (Heidelberg)
Kerosin	purum	Fluka
KH ₂ PO ₄	p.a.	Riedel-de Haën
L-Lysin	> 97 %	Fluka
2-Mercaptoethanol	98 %	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	p.a.	Fluka
Natriumdodecylsulfat	>99 %	Roth
(NH ₄) ₂ SO ₄	f. biochem. Zwecke	Merck
Rinder-Serumalbumin	-	Fluka
Saccharose	99 %	Sigma
TEMED	99 %	Roth
Trichloressigsäure	> 99,5 %	Fluka
Tris	>99 %	Fluka

Tabelle 2.3: Sonstige Chemikalien

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz (ABTS)	> 99%	Fluka
3,3'-Dimethoxybenzidin-dihydrochlorid	-	Fluka
Borax	-	Riedel-de Haën
2-Butanol	p.a.	Merck
Folin-Ciocalteu Phenolreagenz	-	Merck
KOH	p.a.	Riedel-de Haën
Na ₂ SO ₄	98 %	Riedel-de Haën
NaCl	reinst	AppliChem (Darmstadt)
NaHCO ₃	reinst	Riedel-de Haën
NaOH	reinst	Riedel-de Haën
Salzsäure (HCl)	reinst	Riedel-de Haën

2.1.1 Lösungsmittel

Hochschullieferungen (Faßware) wurden vor Gebrauch über eine Füllkörperkolonne destillativ aufgereinigt.

Tabelle 2.4: Lösungsmittel

Lösungsmittel	Verwendung	Qualität	Herkunft
Chloroform	Proteinfällung	p.a.	Merck
Ethanol, unvergällt	Gelelektrophorese	redest.	Kraul & Wilkening (Hannover)
Ethanol, vergällt m. 1% Petrolether	Gelelektrophorese	redest.	Hochschullieferung
Methanol	Proteinfällung	redest.	Hochschullieferung

Für Gelelektrophorese, enzymatische Tests und Mikrobiologie wurde vollentsalztes Wasser (spezifischer Widerstand $\rho > 17 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$) eingesetzt (im folgenden mit „H₂O_{bidest.}“ bezeichnet).

2.1.2 Substrat

Verwendet wurden handelsübliche Erdnüsse (*Arachis hypogaea*). Lediglich die Erdnußfruchtwand (Schale), getrennt von Samenschale und Samen, diente als Substrat. Die Fruchtwand wurde mit einem Küchenmixer grob zerkleinert und anschließend mit einer Gewürzmühle fein vermahlen.

Für die Kultivierung der Basidiomyceten auf festem Medium zur Überprüfung der Enzymaktivitäten (vgl. 3.2.2.4 & 3.2.5.1) wurden die gemahlenen Schalen gesiebt und die Fraktion mit einer Partikelgröße zwischen 1000 und 1400 µm verwendet.

Für die *fed batch*-Kultivierung wurden unzerkleinerte Erdnußschalen verwendet.

2.2 Basidiomyceten

Die untersuchten Stämme wurden bezogen von:

- der niederländischen Sammlung für Pilzkulturen, Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), in Baarn (List of cultures 1994)
- der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig
- der Pilzkulturensammlung der Friedrich Schiller Universität (FSU) in Weimar
- der American Type Culture Collection (ATCC)
- Dept. of Experimental Mycology (CAS), Prag, Tschechische Republik

Die Abkürzungen der jeweiligen Institute (CBS, DSMZ, FSU, ATCC, CAS) sind in Tabelle 2.5 unter „Herkunft & Nr.“ wiedergegeben.

Tabelle 2.5: Verwendete Basidiomyceten

Nr.	Name		Herkunft & Nr.
1	<i>Bjerkandera adusta</i>	(Willdenow : Fries) Karsten	CBS 414.48
2	<i>Clitocybe lignatilis</i>	Karsten	FSU C 31-2
3	<i>Collybia peronata</i>	Kummer	CAS 353
4	<i>Cyathus earlei</i>	Lloyd	CBS 440.80
5	<i>Cyathus helenae</i>	Brodie	CBS 372.80
6	<i>Cyathus julietae</i>	Brodie	CBS 373.80
7	<i>Cyathus limbatus</i>	Tulasne	CBS 335.81
8	<i>Cyathus pallidus</i>	Berkeley & Curtis	CBS 376.80

Nr.	Name	Herkunft & Nr.
9	<i>Cyathus striatus</i>	DSMZ 1652
10	<i>Fomitopsis pinicola</i>	DSMZ 4957
11	<i>Ganoderma applanatum</i>	(Persoon) Patouillard CBS 250.61
12	<i>Gloeophyllum odoratum</i>	(Wulfen : Fries) Imazeki CBS 444.61
13	<i>Grifola frondosa</i>	(Dickson : Fries) S.F. Gray CBS 480.63
14	<i>Hericium erinaceus</i>	(Bulliard : Fries) Persoon CBS 260.74
15	<i>Hypomyces odoratus</i>	G. Arnold CBS 764.68
16	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	(Wahlenberg : Fries) Karsten CBS 311.29
17	<i>Lentinellus cochleatus</i>	FSU FSU L 13-2
18	<i>Lentinula edodes</i>	(Berkeley) Pegler FSU A 20-8
19	<i>Lentinula edodes</i>	(Berkeley) Pegler CBS 225.51
20	<i>Lentinula edodes</i>	(Berkeley) Pegler CBS 389.89
21	<i>Lentinus lepideus</i>	Fries CBS 450.79
22	<i>Lepista irina</i>	(Fries) Bigelow CBS 458.79
23	<i>Lepista nuda</i>	(Bulliard : Fries) Cooke CBS 300.58
24	<i>Marasmius alliaceus</i>	Fries CAS 413
25	<i>Marasmius scorodonius</i>	Fries CBS 850.87
26	<i>Marasmius scorodonius</i>	Fries CBS 166.44
27	<i>Marasmius scorodonius</i>	Fries CBS 137.83
28	<i>Meripilus giganteus</i>	(Persoon : Fries) Karsten CBS 561.86
29	<i>Nidula niveo-tomentosa</i>	(P. Hennings) Lloyd ATCC 38357
30	<i>Nidula niveo-tomentosa</i>	(P. Hennings) Lloyd CBS 380.80
31	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Burdsall CBS 316.75
32	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Burdsall CBS 481.73
33	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Burdsall CBS 671.71
34	<i>Phellinus pini (Tram. pini)</i>	DSMZ 5238
35	<i>Piptoporus betulinus</i>	Karsten CAS 583
36	<i>Pholiota populnea</i>	(Persoon : Fries) Kuyper & Tjallingii CBS 264.32
37	<i>Pholiota squarrosa</i>	DSMZ 5127
38	<i>Pleurotus sanguineus</i>	CBS 614.73
39	<i>Pleurotus sapidus</i>	DSMZ 8266
40	<i>Polyporus umbellatus</i>	Fries CBS 483.72
41	<i>Psilocybe cubensis</i>	(Earle) Singer CBS 324.58

Nr.	Name	Herkunft & Nr.
42	<i>Trametes suaveolens</i>	DSMZ 5237
43	<i>Trametes versicolor</i>	ITAL 93
44	<i>Tyromyces floriformis</i>	(Quélet) Bondarzew & Singer CBS 232.53
45	<i>Tyromyces sambuceus</i>	(Lloyd) Imazeki CBS 492.76
46	<i>Wolfiporia cocos</i>	(Schweinitz) Ryvarden & Gilbertson CBS 279.55

2.3 Geräte

Die meisten Geräte werden bei ihrer Anwendung in den Folgekapiteln spezifiziert.

Tabelle 2.6: Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	VST 50/70	Zirbus (Osterode)
Autoklav	Varioklav 75 S	H+P (Oberschleißheim)
Brutschrank	BE 500	Memmert (Schwabach)
Gewürzmühle	A 10	IKA-Werke (Staufen)
Kältezelle	CS 0900 S	Viessmann (Allendorf)
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph (Schwabach)
Mixer	-	Krups (Solingen)
pH-Meter	731 Calimatic	Knick (Berlin)
Schüttler	Infors HAT	Infors (Einsbach)
Siebmaschine	-	Engelsmann (Ludwigshafen)
Spannungsquelle	Power Supply 2	Bio-Rad (München)
Sterile Werkbank	Clean Air CA RE 4	Thermo Electron (Dreieich)
Thermocycler	Mastercycler Personal	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge	5415 C	Eppendorf
Ultratiefkühlschrank	VX 350 Series 2	Jouan (Unterhaching)
Ultra-Turrax	TP-18/10	IKA-Werke (Staufen)
Vakuumzentrifuge	RC 28 S	Kendro (Hanau)
Zentrifuge	Varifuge 20 RS	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge	RT7 Plus	Kendro

2.4 Materialien für die Molekularbiologie

2.4.1 Reagenzienzusammenstellungen

2.4.1.1 RNA-Isolierung aus Pilzen

RNeasy Plant Mini Kit

QIAGEN (Hilden)

2.4.1.2 Erstellung von cDNA-Bibliotheken

SMARTTMPCR cDNA Library Construction Kit

Clontech (Heidelberg)

2.4.1.3 Verpackung von λ -Phagen-DNA

Gigapack[®] III Gold-4 Packaging Extract

Stratagene (La Jolla, USA)

2.4.1.4 Präparation von λ -Phagen-DNA

QIAGEN[®] Lambda Kit

QIAGEN

2.4.1.5 DNA-Extraktion aus Agarose

MinElute Gel Extraction Kit

QIAGEN

2.4.1.6 Klonierung von PCR-Fragmenten in Plasmid-Vektoren

Topo TA Cloning[®] Kit

Invitrogen (Karlsruhe)

2.4.2 Enzyme

HotStarTaqTM DNA Polymerase

QIAGEN

Proteinase K

Roth

2.4.3 Standards

500 kb DNA Standard

Roth

1 kb DNA Standard

Roth

100 bp DNA Leiter

New England Biolabs (Schwalbach)

500 bp DNA Leiter

Roth

1 kb DNA Leiter

New England Biolabs

2.4.4 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>endA1, gyrA96, hsdR17, lac⁻, recA1, relA1, supE44, thi-1, [F' lacI^qZ ΔM15, proAB, Tn 10]</i> (Stratagene)

2.4.5 Puffer, Medien und Stammlösungen

LB-Agar (Miller) Merck

LB-Medium (Lennox) Becton Dickinson (Heidelberg)

Maltose-SL:

20 g Maltose werden in 80 mL H₂O_{bidest.} gelöst. Dann wird mit H₂O_{bidest.} auf 100 mL aufgefüllt und die Lösung sterilfiltriert.

LB-Medium mit MgSO₄ und Maltose (LB MM):

1 L LB-Medium wird mit 10 mL 1 M MgSO₄ versetzt und autoklaviert. Nach Abkühlen auf 50 °C werden 10 mL Maltose-SL zugegeben.

3 METHODEN

3.1 UV/VIS-Spektroskopie

Spektrometer:	Perkin Elmer Lambda 12
Datenaufnahme:	UV Win Lab (Version 2.0)
Schichtdicke der Küvette:	1 cm

3.2 Mikrobiologie

3.2.1 Sterilisation der Kulturmedien

Feste Substrate und Instrumente wurden 30 min, feste und flüssige Nährmedien 20 min durch Autoklavieren mit Heißdampf bei 121 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert.

3.2.2 Kulturmedien für Basidiomyceten

Die Medienbestandteile wurden in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gelöst, die Nährlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und in 300 mL (100 mL Füllmenge) oder 500 mL Erlenmeyerkolben (300 mL Füllmenge) überführt. Die Kolben wurden mit Cellulosestopfen verschlossen, mit Alufolie abgedeckt und anschließend sterilisiert.

3.2.2.1 Standardnährmedium mit Hefeextrakt (SNL-H) [SPRECHER, 1959]

D(+)-Glucose-Monohydrat	30,0 g L ⁻¹
L-Asparagin-Monohydrat	4,5 g L ⁻¹
Hefeextrakt	3,0 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,5 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (s.u.)	1,0 mL L ⁻¹ ;
Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M KOH.	

Um festes Nährmedium zu erhalten, wurden 1,5 % (m/v) Agar-Agar zugefügt und vor dem Sterilisieren durch Aufkochen des Mediums vollständig gelöst.

Spurenelementlösung:

$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	$0,08 \text{ g L}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	$0,09 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$0,03 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	$0,005 \text{ g L}^{-1}$
Titriplex III (EDTA)	$0,4 \text{ g L}^{-1}$.

3.2.2.2 Stickstoffarmes Nährmedium [mod. nach ABRAHAM, 1994]

Lösung A:

1 M Natriumphosphatpuffer pH 5,2	10 mL
Salzlösung 1	100 mL
Salzlösung 2	10,0 mL;
Einstellung auf pH 5,2 mit 1 M HCl,	
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 950 mL.

Lösung B:

Ammoniumtartrat	$0,2 \text{ g L}^{-1}$
D(+)-Glucose-Monohydrat	10 g L^{-1}
Thiaminhydrochloridlösung	$1,0 \text{ mL L}^{-1}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$	ad 50 mL.

Salzlösung 1:

KH_2PO_4	$20,0 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	$7,1 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	$1,1 \text{ g L}^{-1}$.

Salzlösung 2:

Nitrilotriacetat (NTA)	$10,5 \text{ g L}^{-1}$
NaCl	$7,0 \text{ g L}^{-1}$
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	$3,5 \text{ g L}^{-1}$
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	$0,7 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	$0,7 \text{ g L}^{-1}$
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	$0,7 \text{ g L}^{-1}$
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$	$0,07 \text{ g L}^{-1}$
$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	$0,07 \text{ g L}^{-1}$

H ₃ BO ₃	0,07 g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,07 g L ⁻¹ .

Lösung A wurde wie unter 3.2.1 sterilisiert. Lösung B wurde kurz vor Verwendung des stickstoffarmen Nährmediums sterilfiltriert (MILLEX-GP, Millipore (Eschborn), 0,22 µm) und unter sterilen Bedingungen zu Lösung A gegeben. Anschließend wurde mit sterilem H₂O_{dest.} auf 1000 mL aufgefüllt. Um festes Nährmedium zu erhalten, wurden 1,5 % (m/v) Agar-Agar zugefügt und vor dem Sterilisieren durch Aufkochen des Mediums vollständig gelöst.

3.2.2.3 Festes Nährmedium mit Lignin und Erdnußschalen (L/E-Agar)

1 M Natriumphosphatpuffer pH 5,2	10 mL
Salzlösung 1 (siehe 3.2.2.2)	100 mL
Salzlösung 2 (siehe 3.2.2.2)	10,0 mL
D(+)-Glucose-Monohydrat	10,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
Malzextrakt	10,0 g
Agar-Agar	15,0 g
Tween 40 TM	4 mL
Tween 80 TM	4 mL
Organosolv-Lignin	2,5 g
Lignosulfonsäure –Natriumsalz	2,5 g
Gemahlene Erdnußschalen	10,0 g;
Einstellung auf pH 5,2 mit 1 M HCl;	
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 mL.

3.2.2.4 Festes Nährmedium mit Erdnußschalen

1 M Natriumphosphatpuffer pH 5,2	10 mL
Salzlösung 1(siehe 3.2.2.2)	100 mL
Salzlösung 2 (siehe 3.2.2.2)	10,0 mL
D(+)-Glucose-Monohydrat	10,0 g
L-Asparagin-Monohydrat	0,3 g
Malzextrakt	3,0 g
Agar-Agar	15,0 g;

Einstellung auf pH 5,2 mit 1 M HCl:

H₂O_{dest.}

ad 1000 mL.

Nach dem Gießen wurden unter sterilen Bedingungen vor dem Erstarren pro Petrischale (Durchmesser = 96 mm) jeweils 200 mg sterilisierte, gemahlene Erdnußschalen (siehe dazu auch 2.1.2) zugegeben.

3.2.3 Kultivierung der Basidiomyceten

3.2.3.1 Stammkulturen

Von jedem verwendeten Organismus wurden jeweils mindestens zwei Stammkulturen in Petrischalen auf SNL-H-Agar (vgl. 3.2.2.1) gehalten. Die Platten wurden mit gut bewachsenen, etwa 1 cm² großen Stücken von Agarplatten-Vorkulturen beimpft und je nach Wachstumsgeschwindigkeit ein bis vier Wochen bei 24 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Kulturen bis zu sechs Monate bei 4 °C gelagert.

3.2.3.2 Stammkulturen auf festem Nährmedium mit Lignin

Von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* wurden Stammkulturen auf L/E-Agar (vgl. 3.2.2.3) angelegt, um die lignolytische Aktivität der Organismen zu induzieren. Die Erneuerung der Stammkulturen erfolgte nach jeweils drei Monaten.

3.2.3.3 Vorkulturen

Von der Stammkultur wurde ein gut bewachsenes, etwa 1 cm² großes Stück aus dem Randbereich mit einem sterilen Spatel herausgeschnitten, in 100 mL SNL-H (vgl. 3.2.2.1) überführt, mittels Ultra-Turrax homogenisiert und sieben Tage im Schüttler bei 24 °C und 150 rpm inkubiert.

3.2.3.4 Hauptkulturen

Die Vorkultur wurde in sterilen Zentrifugengefäßen 10 min bei 3300 × g und 4 °C zentrifugiert. Nach Bestimmung der Feuchtmasse gemäß 3.2.4.3 wurden die Mycelpellets in den Zentrifugengefäßen mittels Ultra-Turrax homogenisiert. 25 g Homogenat wurden mit 10 mL steriler Lösung A (siehe stickstoffarmes Nährmedium, 3.2.2.3) resuspendiert und in

einen 1 L-Erlenmeyerkolben mit 4 g steriler Glaswolle oder mit 7 g gemahlenden Erdnußschalen (ebenfalls steril) gegeben. Die Inkubation erfolgte zunächst statisch und unter Lichtausschluß im Brutschrank bei 24 °C für sieben Tage. Danach wurde mit 250 mL stickstoffarmem Nährmedium versetzt und im Schüttler bei 24 °C und 100 rpm inkubiert.

3.2.4 Bestimmung der Kulturparameter

3.2.4.1 pH-Wert

Die Bestimmung des pH-Wertes im Kulturmedium erfolgte direkt nach der Probenahme mit einem zuvor kalibrierten pH-Meter.

3.2.4.2 Glucose

Der Glucosegehalt im Kulturmedium wurde sofort nach der Probenahme mit Glucose-Teststreifen, Diabur Test 5000 (Boehringer, Mannheim), halbquantitativ abgeschätzt.

3.2.4.3 Feuchtmasse

Nach Zentrifugation der Kulturen wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und die Mycelmasse in den Zentrifugenbehältern ausgewogen.

3.2.4.4 Prüfung auf Kontaminationsfreiheit

Durch regelmäßige mikroskopische Untersuchungen wurde sichergestellt, daß die Kulturen nicht kontaminiert waren.

3.2.4.5 Bestimmung der Glucoseoxidase-Aktivität

Der Aktivitätstest beruht auf der Bildung von H_2O_2 bei der Oxidation von D-Glucose durch Glucoseoxidase (GOD) [BERGMEYER, 1970]. Das gebildete H_2O_2 oxidiert o-Dianisidin (3,3'-Dimethoxybenzidindihydrochlorid, farblos) zu einem rotem Farbstoff, der spektrophotometrisch bei 436 nm gegen einen Reagenzienblindwert erfaßt werden kann. Eine Einheit [U] Glucoseoxidase oxidiert in 1 min 1 μmol β -D-Glucose (25 °C, pH 7). Pro Molekül oxidiertes β -D-Glucose wird ein Molekül o-Dianisidin ($\epsilon_{436 \text{ nm}} = 8,3 \cdot 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) oxidiert.

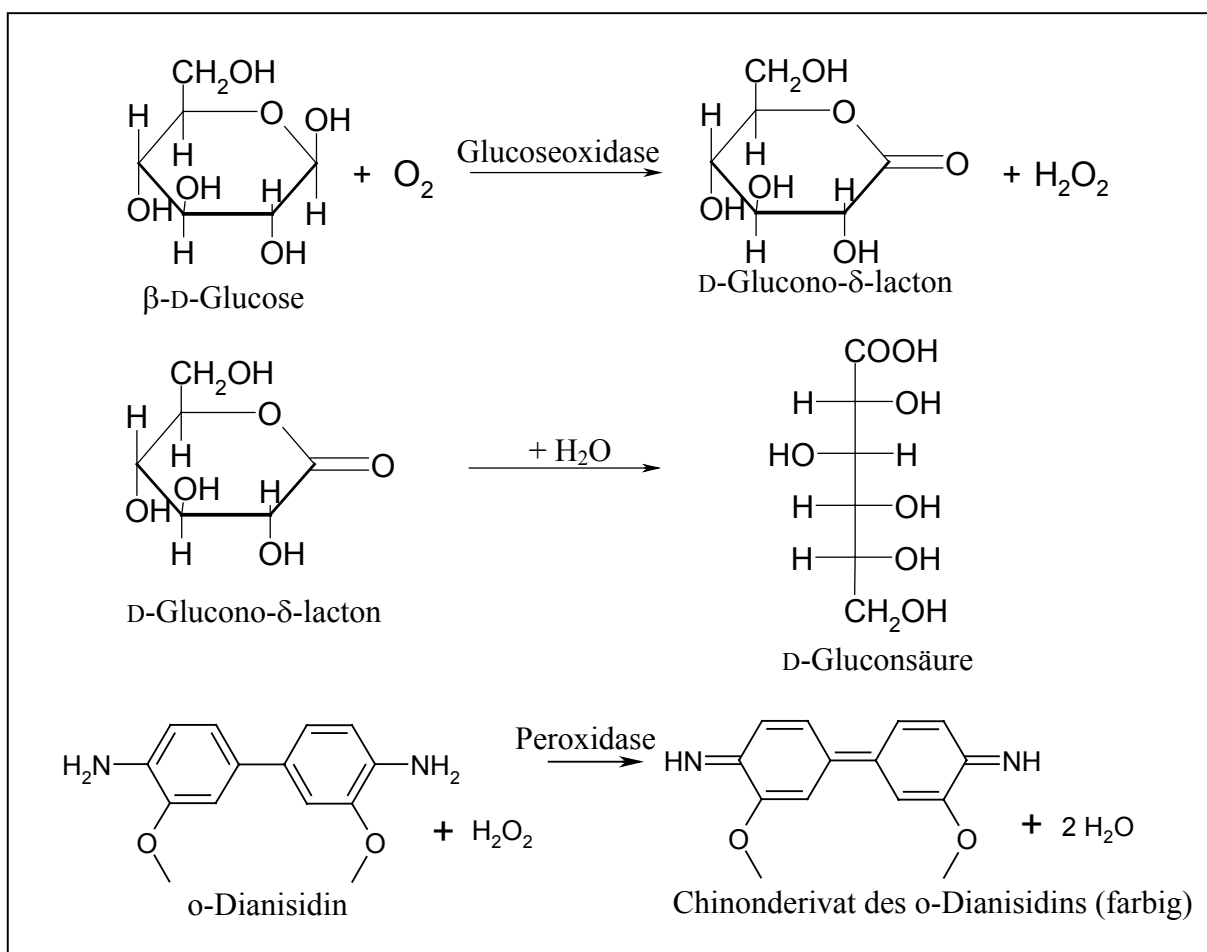


Abb. 3.1: Oxidation von Glucose durch Glucoseoxidase und Entstehung der Farbreaktion (schematisch)

Testansatz für eine Halbmikroküvette:

- | | |
|---------------------------|--|
| 1,0 mL | 3,3'-Dimethoxybenzidindihydrochlorid-Stammlösung (2 mg mL ⁻¹ 3,3'-Dimethoxybenzidindihydrochlorid in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0; gesättigt mit O ₂), |
| 0,25 mL | D-Glucose-Lösung (100 g L ⁻¹ in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0), |
| 5 μ L | Peroxidase-Lösung (2 mg mL ⁻¹ , Peroxidase aus Meerrettich, Fluka), |
| zum Starten der Reaktion: | |
| 0,25 mL | Kulturüberstand. |

Unmittelbar nach Zugabe des Kulturüberstandes wurde die Zunahme der Extinktion bei 436 nm über einen Zeitraum von 5 min aufgezeichnet. Die Aktivität A_{GOD} berechnet sich nach:

$$A_{GOD} [U L^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot 10^9 \cdot V_{gesamt}}{8,3 \cdot V_{Probe}}$$

mit	ΔE	Änderung der Extinktion pro Minute
	V_{gesamt}	Gesamtvolumen in der Küvette in mL
	V_{Probe}	Volumen der Probenlösung in mL.

3.2.4.6 Bestimmung der Laccaseaktivität

Das Prinzip dieses Aktivitätstests beruht auf der Oxidation von ABTS zum grünblauen Radikalkation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ durch Laccase [MAJCHERCZYK, 1999]. Die Bildung von $\text{ABTS}^{\bullet+}$ lässt sich spektrophotometrisch bei 420 nm verfolgen ($\epsilon_{420 \text{ nm}} = 36000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Eine Einheit [U] ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 μmol ABTS zu $\text{ABTS}^{\bullet+}$ pro Minute zu oxidieren.

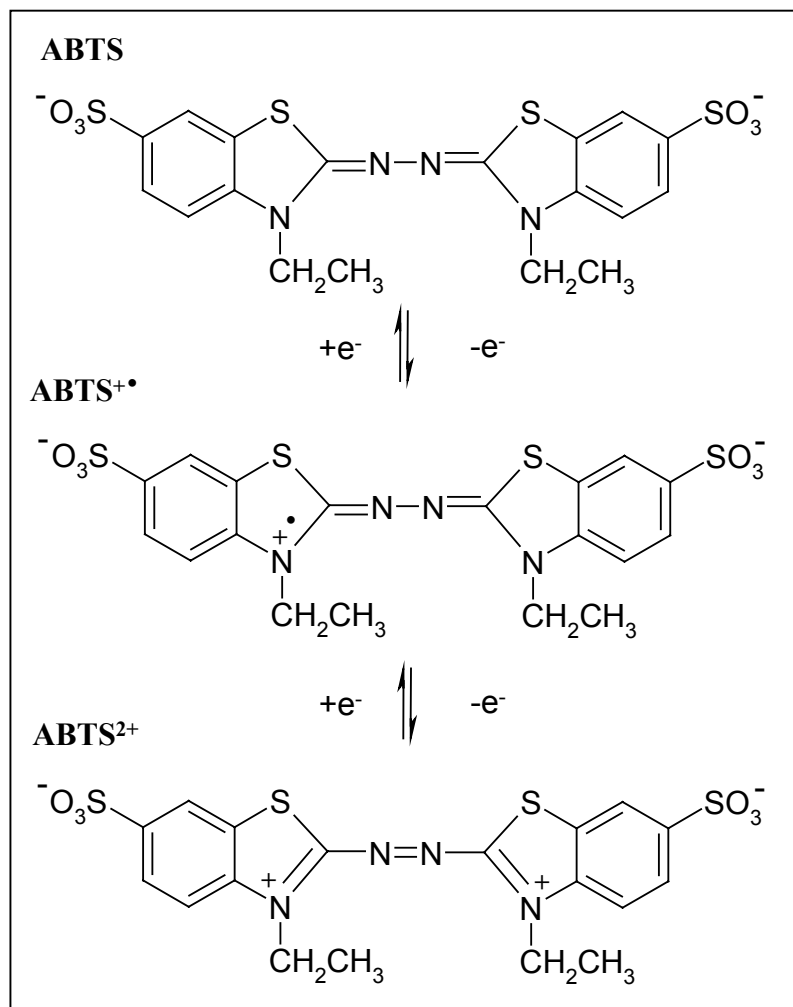


Abb. 3.2: Oxidation von ABTS zum grünblauen Radikalkation $\text{ABTS}^{\bullet+}$; weitere Oxidation z.B. mit Peroxodisulfat führt zum purpurroten Dikation ABTS^{2+}

Testansatz für eine Halbmikroküvette:

800 µL 0,1 M Natriumtartratpuffer pH 4,5,

100 µL 5 mM ABTS,

zum Starten der Reaktion:

100 µL Kulturüberstand.

Unmittelbar nach Zugabe des Kulturüberstandes wurde die Zunahme der Extinktion bei 420 nm über einen Zeitraum von 1 min gegen einen Reagenzienblindwert aufgezeichnet. Die Aktivität A_{Laccase} läßt sich berechnen nach:

$$A_{\text{Laccase}} [\text{U L}^{-1}] = \frac{\Delta E \cdot V_{\text{gesamt}}}{0,036 \cdot V_{\text{Probe}}}$$

mit	ΔE	Änderung der Extinktion pro Minute
	V_{gesamt}	Gesamtvolumen in der Küvette in mL
	V_{Probe}	Volumen der Probenlösung in mL.

3.2.4.7 Bestimmung des Proteingehaltes

A. Bradford-Assay:

Die Proteinbestimmung nach der Methode von BRADFORD (1976) wurde unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Farbstofflösung (*Roti[®]-Quant*, Roth) durchgeführt. Der *Assay* beruht auf der Adsorption von Proteinen an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue, wobei in saurer Lösung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm auftritt.

Testansatz für eine Halbmikroküvette:

800 µL Probenlösung,

200 µL *Roti[®]-Quant*-Farbstofflösung, Roth.

Nach 10 min Reaktionszeit wurde die Extinktion bei 595 nm spektrophotometrisch gegen einen Reagenzienblindwert gemessen. Die Kalibriergerade wurde mit Rinder-Serumalbumin (BSA) als Standard erstellt.

B. Lowry-Assay:

Die Proteinbestimmung nach der Methode von LOWRY *et al.* (1951) wurde unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Lösungen (*DC Protein Assay*, Bio-Rad) durchgeführt. Der

Assay beruht darauf, daß Cu^+ -Ionen aus der Biuret-Reaktion mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz einen blauen Komplex bilden, der als Maß für die Proteinkonzentration dient.

Testansatz für eine Halbmikroküvette:

250 µL	Probenlösung,
125 µL	Bio-Rad DC Lösung A,
1000 µL	Bio-Rad DC Lösung B.

Nach 15 min Reaktionszeit wurde die Extinktion bei 750 nm spektrophotometrisch gegen einen Reagenzienblindwert gemessen. Die Kalibriergerade wurde mit Rinder-Serumalbumin (BSA) als Standard erstellt.

3.2.4.8 Bestimmung der Lipaseaktivität

Zur quantitativen Erfassung der Lipaseaktivität in den Kulturüberständen diene eine kommerziell erhältliche Reagenzienzusammenstellung (*Lipase-PS*, Sigma-Aldrich).

3.2.5 Ligninabbau: Nachweis relevanter Enzyme

3.2.5.1 Diskontinuierliche Detektion durch Farbreaktionen

46 Basidiomycetenstämme (vgl. 2.2) wurden auf jeweils vier Agarplatten mit Erdnußschalen (Nährmedium vgl. 3.2.2.4) bei 25 °C im Brutschrank inkubiert. Nach jeweils sieben Tagen wurde eine der vier Platten mit vier Reagenzien versetzt, welche die Anwesenheit von Peroxidasen, Laccasen, Polyphenoloxidasen und Tyrosinasen durch einfache Farbreaktionen nachweisen [LYR, 1958].

30 Minuten nach dem Auftragen der Reagenzien wurde die Farbintensität nach folgendem Schema bestimmt:

keine Aktivität	= 0,
schwache Aktivität	= 1,
mittlere Aktivität	= 2,
starke Aktivität	= 3.

A. Reagenz zum Nachweis von Peroxidase:

Verwendet wurde eine Mischung von 25 mL 0,6 % (m/v) H₂O₂ und 25 mL 1 % (m/v) Pyrogallol-Lösung; bei Anwesenheit von Peroxidasen ist eine gelbbraune Färbung zu beobachten.

B. Reagenz zum Nachweis von Polyphenoloxidase:

1,6 % (m/v) ethanolische Guajakharzlösung; bei Anwesenheit von Polyphenoloxidasen tritt eine blaue Färbung auf.

C. Reagenz zum Nachweis von Laccase:

1,4 % (m/v) ethanolische α -Naphthol-Lösung; bei Anwesenheit von Laccasen ist eine violette Färbung zu beobachten.

D. Reagenz zum Nachweis von Tyrosinase:

1,1 % (m/v) ethanolische p-Kresol-Lösung; bei Anwesenheit von Tyrosinasen tritt Orangefärbung auf.

3.3 Gelelektrophorese

3.3.1 Probenvorbereitung

Das Kulturmedium wurde zunächst abdekantiert und durch Zentrifugation von Mycel- und Substratbestandteilen getrennt (10 min, 10000 $\times$ g, 4 °C) . Nach erneutem Abdekantieren wurden die Proben durch Ultrafiltration in Centricon Plus-80-Zentrifugationseinheiten (MWCO = 10 kDa, Millipore) so weit konzentriert, daß mindestens eine Volumenreduzierung um 80 % erhalten wurde.

3.3.1.1 Dialyse

Die unter 3.3.1 erhaltenen Konzentrate wurden sofort zur weiteren Konzentrierung einer Dialyse unterzogen.

Dialysepuffer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Kaliumphosphatpuffer (300 mM pH 7,5)	30 mM	50 mL
H ₂ O _{bidest.}		100 mL
Glycerol (p.a.)	70% (v/v)	ad 500 mL

Dazu wurde die Probe in nach Herstellerangaben vorbereitete Dialyseschläuche (ZelluTrans 6,0; MWCO 8-10 kDa; Roth) pipettiert und über Nacht bei 4 °C unter Rühren equilibriert. Die konzentrierten Lösungen wurden anschließend aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

3.3.1.2 Proteinfällung

A. TCA-Fällung modifiziert nach POLACHEK & CABIB (1981):

Die Proteinlösung wurde mit dem gleichen Volumen 20 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt, gut vermischt und 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 × g, 4 °C) wurde der Überstand entfernt. Das Proteinpellet wurde sofort mit eiskaltem Aceton (-20 °C) gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert. Nach Abtrennung des Überstandes wurde der Waschvorgang nochmals wiederholt und das Pellet anschließend bei 4 °C getrocknet.

B. Chloroform-Methanol-Fällung [WESSEL & FLÜGGE, 1984]:

100 µL Proteinlösung wurden mit 400 µL Methanol versetzt und durchmischt. Anschließend wurden 100 µL Chloroform hinzugefügt und die Lösung wiederum kurz geschüttelt. Nach Zugabe von 300 µL H₂O_{bidest.} und guter Durchmischung wurde die Probe fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte die Zentrifugation (2 min, 9000 × g, 4 °C) bis zur deutlichen Phasentrennung. Die Proteine befanden sich in der Interphase.

Die wässrige Phase wurde ohne Zerstörung der Interphase abgenommen. Zum verbleibenden Rest wurden 300 µL Methanol gegeben und nach dem Mischen fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 13000 × g, 4 °C) zur Sedimentation der Proteine wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei 4 °C getrocknet.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Angewendet wurde die Methode nach LAEMMLI (1970).

Molekulargewichtsmarker:

Roti[®]-Mark STANDARD, Roth

Stammlösungen:

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris mit 0,4 % (m/v) SDS; mit HCl auf pH 8,8 eingestellt
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris mit 0,4 % (m/v) SDS; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt
SDS-SL:	20 % (m/v) SDS
APS-SL:	40 % (m/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, jeweils frisch angesetzt
Acrylamid-SL:	30 % (m/v) Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel A, Roth)
BIS-SL:	2 % (m/v) Bisacrylamid (Rotiphorese [®] Gel B, Roth)
10 x SDS-Laufpuffer:	0,25 M Tris mit 1,92 M Glycin und 0,4 % (m/v) SDS

Pipettierschema für ein diskontinuierliches Gel:

Vernetzungsgrad (Crosslinking) C = 3 %

	<u>Sammelgel (1 mL)</u>	<u>Trenngel (4 mL)</u>
Totalacrylamid	T = 6,0 %	T = 12,5 %
Acrylamid-SL	0,194 mL	1,617 mL
Bisacrylamid-SL	0,09 mL	0,75 mL
H ₂ O _{bidest}	0,466 mL	0,633 mL
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,250 mL	-
Trenngelpuffer (pH 8,8)	-	1 mL
Zum Starten der Polymerisation:		
TEMED	2 µL	5 µL
APS-SL	5 µL	10 µL

3.3.3 Isoelektrische Fokussierung

Für die IEF wurden Fertiggele verwendet (Servalyte Precotes pH 3-6, 300 µm, 125 mm × 125 mm, Serva).

Proteinstandard:

IEF-Marker pI 3-10 Liquid Mix, Serva

Elektrophorese:

Probenauftrag:	Mit Lochband in der Gelmitte.			
Auftragsvolumen:	Bis zu 12 µL.			
Bedingungen:	Phase 1:	200 V	6 mA	12 W
	Phase 2:	1500 V	6 mA	12 W
				100 Vh
				4900 Vh

Nach der Elektrophorese wurde das IEF-Gel für die nachfolgenden Nachweismethoden in zwei Hälften zerschnitten.

Aktivitätsfärbung:

Für den Nachweis von Lipasen wurde ein Testagarstück in Größe des halben IEF-Gels hergestellt (vgl. 3.4.2), auf das IEF-Gel gelegt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Proteinnachweis:

Zum Vergleich wurde die zweite Gelhälfte mit einer kolloidalen Coomassie-Färbung behandelt (vgl. 3.3.6.2).

3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

EDTA-Lösung pH 8:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
EDTA	0,5 M	37,22 g
Einstellen des pH-Werts mit 4 M NaOH		
H ₂ O _{bidest.}		ad 200 mL

TAE-Lösung (50fach, nach SAMBROOK *et al.* (1989)):

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
EDTA-Lösung pH 8 (s.o.)	50 mM	100 mL
TRIS	2 M	242 g
Eisessig		57,1 mL
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

TAE-Laufpuffer:

	<u>Menge</u>
TAE-Lösung (s.o.)	20 mL
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 mL

Auftragspuffer (nach GASSEN & SCHIMPF (1999)):

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
SDS	0,2 % (m/v)	20 mg
Glycerol	50 % (v/v)	5 mL
Bromphenolblau		1,5 mg
Xylencyanol		1,5 mg
TAE-Laufpuffer		ad 10 mL

Für die Auftrennung der DNA wurden 1,2 %ige (m/v) Agarosegele mit TAE-Laufpuffer hergestellt, denen bei der Herstellung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Auftragspuffer versetzt, aufgetragen und die DNA mit einer angelegten Spannung von 0,5–5 V/cm Elektrodenabstand getrennt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht (Anregung bei 312 nm; UV-Transilluminator Vilber-Lourmat TFX-20.M (Torcy, Frankreich)) und das erhaltene Bild fotografiert (INTAS®, Göttingen; digitale Kamera mit Videoprinter P90, Mitsubishi (Ratingen)).

3.3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

3.3.5.1 Stammlösungen [AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, 1998]

A. Lysis-Puffer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Harnstoff	8 M	19,2 g
CHAPS oder Triton X-100	4% (m/v)	1,6 g
TRIS	40 mM	0,194 g
H ₂ O _{bidest.}		ad 40 mL

Die Lösung wurde in 1 mL-Aliquots bei –20 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 5 mg mL⁻¹ DTT zugegeben.

B. Rehydratationslösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Harnstoff	8 M	12 g
CHAPS oder Triton X-100	2% (m/v)	0,5 g
Bromphenolblau		Spuren
H ₂ O _{bidest.}		ad 25 mL

Die Lösung wurde in 2 mL-Aliquots bei –70 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 2,8 mg mL⁻¹ DTT und 10 µL mL⁻¹ Bio-Lyte Ampholytlösung pH 3-10 (Bio-Rad) zugegeben.

C. SDS-Equilibrationpuffer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
1,5 M TRIS-Cl pH 8,8	50 mM	6,7 mL
Harnstoff	6 M	72,07 g
Glycerol	30% (v/v)	60 mL
SDS	2% (w/v)	4,0 g
Bromphenolblau		Spuren
H ₂ O _{bidest.}		ad 200 mL

Die Lösung wurde in 40 mL-Aliquots bei -20 °C gelagert. Kurz vor Gebrauch der Lösung wurden 100 mg DTT / 10 mL für den ersten Equilibrierungsschritt bzw. 250 mg Iodacetamid / 10 mL für den zweiten Equilibrierungsschritt zugegeben.

D. Trenngelpuffer (4fach):

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
TRIS	1,5 M	181,5 g
H ₂ O _{bidest.}		750 mL
HCl	(zum Einstellen auf pH 8,8)	
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

E. SDS-Stammlösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
SDS	20 % (m/v)	10 g
H ₂ O _{bidest.}		ad 50 mL

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

F. SDS-Elektrophoresepuffer (10fach):

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
TRIS	250 mM	30,2 g
Glycin	1,92 M	144,2 g
SDS	1 % (m/v)	10 g
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert. Zum Gebrauch wurden 100 mL der Lösung mit H₂O_{bidest.} auf 1 L aufgefüllt.

G. Agarose-Fixierlösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
SDS-Elektrophoresepuffer	(siehe F.)	10 mL
Agarose	0,5 % (m/v)	0,5 g
Bromphenolblau		Spuren
H ₂ O _{bidest.}		ad 100 mL

Die Lösung wurde bis zum vollständigen Auflösen der Agarose in der Mikrowelle erhitzt.

3.3.5.2 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten

Für die Erstellung von zweidimensionalen Elektropherogrammen wurden, wenn nicht anders erwähnt, ausschließlich Kulturüberstände aus Kultivierungen mit stickstoffarmem Nährmedium (vgl. 3.2.2.2) ohne zusätzliche Cu²⁺-Supplementierung verwendet.

Für die IEF wurden ausschließlich *ReadyStrip*TMIPG-Streifen der Firma Bio-Rad verwendet.

Zunächst wurde die gewünschte gefällte Proteinmenge in Lysis-Puffer (250 µg Gesamtprotein pro 10 µL Lysis-Puffer) aufgenommen und 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach wurde 20 min bei 4 °C und 15000 × g zur Pelletierung der unlöslichen Bestandteile zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit Rehydratationslösung verdünnt. Dabei wurden für IPG-Streifen der Länge 7 cm höchstens 125 µL und für IPG-Streifen der Länge 17 cm höchstens 330 µL Gesamtvolumen (= Probe+ Rehydratationslösung) eingesetzt.

Anschließend wurde die so verdünnte Probe in eine Vertiefung des Kunststoffeinsatzes der PROTEAN[®] IEF-CellTM pipettiert und der IPG-Streifen luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten hineingelegt.

Um den IPG-Streifen vor Austrocknung zu schützen, wurde abschließend 1 mL Silikonöl auf den Streifen pipettiert.

Folgende Parameter wurden für die Fokussierung eingestellt:

	IPG pH 3-10 (17 cm)			IPG pH 3-6 (17 cm)		
Temperatur	20 °C			20 °C		
Stromstärke	50 µA / Streifen			50 µA / Streifen		
Rehydratisierung	12 h bei 50 V			12 h bei 50 V		
	Spannung	Gradient	Dauer	Spannung	Gradient	Dauer
Schritt 1	250 V	schnell	250 Vh	250 V	schnell	250 Vh
Schritt 2	1000 V	schnell	1000 Vh	1000 V	schnell	1000 Vh
Schritt 3	10000 V	linear	5 h	10000 V	linear	5 h
Schritt 4	10000 V	schnell	45000 Vh	10000 V	schnell	20000 Vh
Schritt 5	500 V	schnell	bis zu 12 h	500 V	schnell	bis zu 12 h

Die optimale Fokussierungsdauer wurde für jede Probe empirisch ermittelt. In der Regel betrug die durchschnittliche Gesamtfokussierungsdauer für den pH-Bereich 3-10 65000 Vh und für pH 3-6 32000 Vh. Die Fokussierungen wurden daher in Schritt 4 nach Erreichen der o.g. Vh-Zahl beendet; Schritt 5 diente lediglich zur Vermeidung von Diffusion.

Nach Abschluß der Fokussierung wurden die IPG-Streifen entweder sofort für die zweite Dimension verwendet oder auf der Trägerfolie liegend in einem Einmal-Kunststofftray (Bio-Rad) in Folie eingeschweißt bei –70 °C gelagert.

3.3.5.3 Zweite Dimension: SDS-Gelelektrophorese

Das homogen vernetzte SDS-Gel wurde ohne Sammelgel hergestellt.

Pipettierschema für ein 20 x 20 cm² großes Gel (Geldicke = 1 mm):

Vernetzungsgrad	C = 3 %
Totalacrylamidkonzentration	T = 12,5 %
Acrylamid/Bisacrylamid-SL	10 mL (40 %; 37,5 : 1; Merck)
Trenngelpuffer (4fach)	8,1 mL
SDS-Stammlösung	0,162 mL
H ₂ O _{bidest.}	14,2 mL
Zum Starten der Polymerisation:	
TEMED	20 µL
APS-SL	50 µL

Um den Gelstreifen auflegen zu können, wurde die Gießkassette nicht vollständig mit der Gellösung gefüllt, sondern nur bis 1-1,5 cm unterhalb des Rands. Unmittelbar nach dem Einfüllen der Gellösung wurde mit 1 mL wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet, um eine glatte Gelkante zu erhalten.

Kurz vor Gebrauch der Gele, d.h. frühestens 2-3 h nach dem Gießen, wurde das 2-Butanol mit Filterpapier vorsichtig abgenommen und die Geloberfläche mit SDS-Elektrophoresepuffer gewaschen.

Der IPG-Streifen wurde zweimal für mindestens 15 min bei Raumtemperatur in 10 mL SDS-Equilibrierungspuffer (ausreichend für zwei IPG-Streifen) geschüttelt. Die Lösung des ersten Equilibrierschrittes enthält 1 % (m/v) DTT, die des zweiten 135 mM Iodacetamid. Beide Reagenzien wurden erst kurz vor Gebrauch zugegeben.

Anschließend wurde der equilibrierte IPG-Streifen kurz in SDS-Elektrophoresepuffer getaucht, luftblasenfrei auf das SDS-Gel gelegt und mit einem geeigneten Spatel vorsichtig angedrückt.

Die Befestigung des IPG-Streifens erfolgte mit 1-2 mL heißer Agarose-Fixierlösung. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Elektrophorese gestartet. Die Trennung wurde bei einer maximalen Stromstärke von 25 mA pro Gel über 2000 Vh durchgeführt (mit Spannungsquelle MultiDrive XL, Pharmacia).

3.3.6 Färbemethoden für die Gelelektrophorese

3.3.6.1 Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat)

Verwendet wurde eine Methode nach RABILLOUD *et al.* (2001).

Stammlösungen:

Fixierer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Ethanol (96 %, vergällt mit Petrolether)	30 % (v/v)	313 mL
Essigsäure (Eisessig)	10 % (v/v)	100 mL
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

Färbelösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Ethanol (96 %, unvergällt)	20 % (v/v)	210 mL
Ruthenium-Chelat	100-200 nM	5-10 µL
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

Das Ruthenium-Chelat wurde erst kurz vor dem Färbeschritt zugegeben.

Die Gele wurden für mindestens 6 h in der Fixierlösung geschüttelt. Danach erfolgte viermaliges Waschen für jeweils 30 min in 20 % (v/v) Ethanol zur Beseitigung der überschüssigen Essigsäure.

Anschließend wurden die Gele unter Lichtausschluß über Nacht in der Färbelösung geschüttelt. Direkt vor der Fluoreszenzmessung wurden die Gele zweimal für 10 min in H₂O_{bidest.} equilibriert.

Die Aufnahme der Gelbilder erfolgte mit dem Fluoreszenzscanner Fuji FLA 3000, Fujifilm (Düsseldorf), unter Verwendung der BASReader-Software, Version 3.14. Die Auswertung erfolgte mit der Software Raytest AIDA; Image Analyzer Array Compare, Version 3.20.

3.3.6.2 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue

Es wurde eine modifizierte Variante der kolloidalen Coomassie-Färbung nach NEUHOFF *et al.* (1988, 1990) angewandt.

Stammlösungen:

Lösung A:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
ortho-Phosphorsäure (85%)	2% (m/v)	20 g
H ₂ O _{bidest.}		800 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	10% (m/v)	100 g
H ₂ O _{bidest.}		ad 980 mL

Lösung B:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Coomassie Brilliant Blue CBB - G 250	5% (m/v)	1 g
H ₂ O _{bidest.}		ad 20 mL

Lösung C:

	<u>Endkonzentration</u>
Lösung A	98% (v/v)
Lösung B	2% (v/v)

Lösung C wurde vor Benutzung über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt.

Fixierer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Methanol	40% (v/v)	400 mL
Essigsäure (Eisessig)	10% (v/v)	100 mL
H ₂ O _{bidest.}		ad 1000 mL

Arbeitsschritte:

Die Gele wurden für mindestens 1 h im Fixierer geschüttelt. Die Färbung erfolgte in einer Lösung aus 80 % (v/v) Lösung C und 20 % (v/v) Methanol für mindestens 3 h. Anschließend wurden die Gele mehrmals in H₂O_{dest.} entfärbt.

3.3.6.3 Silberfärbung

Zur Silberfärbung wurde eine modifizierte Methode nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1985) angewandt.

Lösungen (ausreichend für maximal 2 Gele):

A. Fixierer:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Methanol	50 % (v/v)	250 mL
Essigsäure (Eisessig)	10 % (v/v)	50 mL
H ₂ O _{bidest.}		ad 500 mL

B. Inkubationslösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Ethanol	30 % (v/v)	75 mL
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,2 % (m/v)	0,785 g
Natriumacetat x 3 H ₂ O	0,8 M	27,22 g
Glutardialdehyd (50 %)	6% (v/v)	2,5 mL
H ₂ O _{bidest.}		ad 250 mL

C. Silbernitratlösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Silbernitrat	0,1 % (m/v)	0,25 g
Formaldehyd (37 %)	0,01 % (v/v)	72 µL
H ₂ O _{bidest.}		ad 250 mL

D. Entwickler:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
Na ₂ CO ₃	2,5% (m/v)	6,25 g
Formaldehyd (37 %)	0,01% (v/v)	72 µL
H ₂ O _{bidest.}		ad 250 mL

E. Stopplösung:

	<u>Endkonzentration</u>	<u>Menge</u>
EDTA	0,05 M	9,4 g
H ₂ O _{bidest.}		ad 500 mL

Arbeitsschritte:

Inkubationslösung, Silbernitratlösung und Entwickler wurden erst kurz vor Gebrauch angesetzt.

Die Gele wurden zunächst mindestens 2 h im Fixierer geschwenkt, danach weitere 2 h in der Inkubationslösung. Anschließend wurde dreimal 20 min in H₂O_{bidest.} gewaschen. Es folgte eine Inkubation in der Silbernitratlösung für 30 min.

Überschüssiges Silbernitrat wurde durch kurzes Schwenken (ca. 60 s) in H₂O_{bidest.} entfernt. Die Gele wurden dann in eine saubere Schale mit Entwickler überführt. Es wurde so lange entwickelt, bis sich ein deutliches Proteinmuster gebildet hatte.

Die Entwicklung wurde durch Überführen in Stopplösung beendet.

3.4 Proteinanalytik

3.4.1 Massenspektrometrische Analyse

Mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat) gefärbte 2D-Gele wurden ohne weitere Fixierung einer Coomassie-Färbung unterzogen (vgl. 3.3.5.2).

Ausgewählte Proteinspots wurden anschließend unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell ausgeschnitten und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wurde für jeden Proteinspot eine neue Skalpellklinge verwendet.

Die Gelstücke wurden in einer Vakuumzentrifuge oder alternativ in einem Exsikkator mittels Membranpumpe getrocknet, bei -70°C gelagert und zur Analyse verschickt. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig. Hierzu wurden die Proteine im Gel mittels Trypsin in Peptidfragmente zerlegt und diese nach Standardprotokollen extrahiert und gereinigt. Zur Elektrospray-Massenspektrometrie diente ein Q ToF II-Massenspektrometer (Micromass) mit Nanospray-Ionenquelle und goldbeschichteten Kapillaren (Protona, Odense). Mehrfach geladene Molekülonen wurden vom Quadrupol-Analysator selektiv in die Kollisionszelle (Kollisionsenergie 25 bis 30 eV) zur kollisionsinduzierten Fragmentierung überführt. Die gebildeten Tochterionen wurden mittels orthogonalem Flugzeit-(*time of flight*)-Analysator getrennt und die aufgenommenen MS-MS-Spektren nach Verstärkung (Max. Ent. 3, Micromass) zur Sequenzbestimmung der tryptischen Peptide verwendet.

3.4.2 Testverfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Sorbitanestern

[nach ZORN *et al.*, 2003a]

Mineralsalzmedium:

	<u>Endkonzentration</u>
NH ₄ NO ₃	2 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	2 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1 g L ⁻¹
MgSO ₄	0,2 g L ⁻¹
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,14 g L ⁻¹
NaCl	0,2 g L ⁻¹
Spurenelementlösung (vgl. 3.2.2.1)	2 mL L ⁻¹
Einstellen auf pH 7,0	

Lösung a:

	<u>Menge</u>
Tris-HCl	8 mg
NaCl	25 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 mL

Lösung b:

	<u>Menge</u>
Tween 80 TM	1 g
CaCl ₂	20 mg
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 mL

Vorkulturen von *P. sapidus* wurden in Standardnährlösung (vgl. 3.2.2.1) für sieben Tage bei 150 rpm und 24 °C kultiviert. Das Mycel wurde durch Zentrifugation (10 min, 3000 × g, 4 °C) vom Medium getrennt und anschließend in Mineralsalzmedium resuspendiert.

Zur Bereitung der Hauptkulturen wurden jeweils 100 mL frisches Mineralsalzmedium mit 20 mL (entsprechen etwa 100 mg Trockenmasse) der homogenisierten Vorkulturen inokuliert. Nach Zusatz von 10 µL Paprika- bzw. Tagetes-Oleoresin wurde für 3 bis 6 Tage bei 24 °C und 150 rpm submers kultiviert.

Zur Herstellung der Tween 80TM-haltigen Testagarplatten wurden 60 mL einer Lösung a mit 1,2 g Agar-Agar aufgekocht und anschließend mit 60 mL Lösung b versetzt. Der pH-Wert

wurde mit 0,1 M NaOH auf 6,8 eingestellt. Nach dem Erkalten wurden mit einem Korkbohrer Löcher ($\varnothing = 5$ mm) in die Platten gestanzt, in welche die Enzymproben aufgegeben wurden. Nach Inkubation über Nacht wurden die Platten mit 0,1 M NaOH überschichtet und sofort visuell ausgewertet.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der es möglich ist, schnell und gezielt DNA-Fragmente zu amplifizieren. Durch den Einsatz entsprechender Primer können auch Schnittstellen und Nukleotidaustausche in das PCR-Produkt eingeführt werden [MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988]. Die Reaktion wurde in sterilen 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

- 2 μ l *Template*-DNA (100 ng)
- 1 μ l dNTP-Mix (QIAGEN)
- 3 μ l 3' PCR-Primer (10 pmol μ L⁻¹)
- 3 μ l 5' PCR-Primer (10 pmol μ L⁻¹)
- 5 μ l 10 $\times$ PCR-Puffer (QIAGEN)
- 0,3 μ l *HotStar* Taq-Polymerase (QIAGEN)
- ad 50 μ l H₂O_{bidest.} (steril)

Da ein *Thermocycler* mit Deckelheizung (Eppendorf) benutzt wurde, konnte auf den Einsatz von Mineralöl verzichtet werden. Für die Reaktion wurde folgendes Programmschema verwendet:

- 1) 15 min bei 95°C zur Aktivierung der *HotStar* Taq-Polymerase als einmaliger erster Schritt
- 2) 1 min bei 94°C zur Denaturierung der *Template*-DNA
- 3) 1 min zur Bindung der PCR-Primer an die *Template*-DNA (*Annealing*)
Die optimale *Annealing*-Temperatur wurde empirisch ermittelt und lag je nach Primer-Paar zwischen 48 und 60 °C.
- 4) 2 min 72°C Polymerasereaktion (*Elongation*)
- 5) Als letzter Schritt 10 min bei 72°C zur Vervollständigung unvollständiger Elongationsreaktionen

Während des Programmablaufs wurden die Schritte 2 bis 4 beliebig oft wiederholt (ca. 25 bis 35 Zyklen).

3.5.2 Temperaturprogramme für den Thermocycler

Als Alternative zum o.g. Programmschema für die PCR wurde ein Programm für eine *Touchdown*-PCR benutzt. Es handelt sich um eine Methode mit variabler *Annealing*-Temperatur zur Erhöhung der Spezifität der Primerbindung. Die *Annealing*-Temperatur des ersten Zyklus sollte 5-10 °C über der Schmelztemperatur der Primer liegen. In den folgenden Zyklen wird die *Annealing*-Temperatur um 1-2 °C/Zyklus bis zum Erreichen der Primerschmelztemperatur gesenkt [DON *et al.*, 1991; ROUX, 1995].

Tabelle 3.1: Temperaturprogramm für *Touchdown*-PCR mit *HotStar* Taq-Polymerase (QIAGEN)

Step	Temp. [°C]	Zeit [min]	Step	Temp. [°C]	Zeit [min]
1	95	15	21	54	0,5
2	94	1	22	72	0,5
3	60	0,5	23	94	1
4	72	0,5	24	53	0,5
5	94	1	25	72	0,5
6	59	0,5	26	94	1
7	72	0,5	27	52	0,5
8	94	1	28	72	0,5
9	58	0,5	29	94	1
10	72	0,5	30	51	0,5
11	94	1	31	72	0,5
12	57	0,5	32	94	1
13	72	0,5	33	50	0,5
14	94	1	34	72	0,5
15	56	0,5	35	GOTO 32 REP 25	
16	72	0,5	36	72	10
17	94	1	37	HOLD 4 °C	
18	55	0,5			
19	72	0,5			
20	94	1			

3.5.3 Propagation von λ -Phagen [nach SAMBROOK *et al.*, 1989]

Zur Isolierung von λ -DNA wurde zunächst eine Phagenpropagation durchgeführt. Dazu wurde eine einzelne Kolonie von *E. coli* XL1-Blue in 15 mL LB MM suspendiert und über Nacht bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (10 min, 3000 $\times$ g, 4 °C), das Pellet in 5 mL steriler 10 mM MgSO₄ suspendiert und mit

einem Aliquot die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) überprüft. Nach Versetzen mit einer geeigneten Menge λ -Phagen wurde zur Adsorption an die Zellen 15 min bei 37 °C inkubiert.

Das richtige Mengenverhältnis zwischen Phagen und *E.coli* ist zu beachten, damit eine große Menge an Phagen erhalten wird. Bei der *infection at low multiplicity* wird eine kleine Menge Bakterien mit Phagenpartikeln in eine große Menge Medium gegeben. Es wird davon ausgegangen, daß zunächst nur ein kleiner Teil der Bakterien infiziert wird, während sich die anderen Zellen ungestört teilen können. Nach mehreren Wachstumszyklen und Reinfektionen erhält man eine große Anzahl an Bakteriophagen. Im günstigsten Fall werden alle Bakterien infiziert und eine komplette Lyse ist zu beobachten. Als Richtwert sollten 5×10^7 pfu pro 10^{10} Bakterienzellen verwendet werden. Für *E. coli* XL1-Blue gilt: Eine $OD_{600} = 1$ entspricht 10^{10} Zellen pro Milliliter.

Die Lösung wurde zu 100 mL LB MM in einem 500 mL Erlenmeyerkolben gegeben und bei 37 °C und 200 rpm ca. 5 Stunden inkubiert, bis infolge der Lyse der Bakterienzellen eine deutliche Aufklärung der Lösung beobachtet wurde. Anschließend wurde mit 2 mL Chloroform versetzt, gut vermischt und bei 37 °C und 200 rpm 15 min inkubiert. Die Lösung wurde in sterile Gefäße überführt, zentrifugiert (15 min, $15000 \times g$, 4 °C) und danach vom Chloroform dekantiert.

Die weitere Vorgehensweise zur Isolierung von λ -DNA erfolgte nach Vorschrift mittels *Lambda Kit* (QIAGEN).

3.6 Sonstige Methoden

3.6.1 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach GUTFINGER (1981)

Es handelt sich um ein Verfahren zur photometrischen Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz. Die in der Probe enthaltenen Phenole werden im alkalischen Milieu mit Folin-Ciocalteu-Reagenz zu einem blauen Farbstoff umgesetzt.

100 μ L Probe wurden in einen 10 mL Messkolben überführt, mit 5 mL mit $H_2O_{bidest.}$ verdünnt und mit 0,5 mL Folin-Ciocalteu-Reagenz versetzt. Nach 3 min wurde 1 mL gesättigte

Na₂CO₃-Lösung zugegeben und mit H₂O_{bidest.} bis zur Eichmarke aufgefüllt. Nach 60 min wurde die Extinktion bei 725 nm spektrophotometrisch gegen einen Reagenzienblindwert gemessen. Eine Kalibriergerade wurde mit Gallussäure als Standard erstellt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Erdnußschalen als ligninhaltiges Substrat

Als ligninhaltiges Substrat wurde die Erdnußfruchtwand (Schale), getrennt von Samenschale und Samen, handelsüblicher gerösteter Erdnüsse (*Arachis hypogaea*) verwendet. Die Fruchtwand wurde mit einem Küchenmixer grob zerkleinert und anschließend mit einer Gewürzmühle fein vermahlen. Der ermittelte Ligningehalt lag zwischen 32 und 35 % [WEB, 2003].

4.2 Auswahl von ligninabbauenden Basidiomyceten

Zur Auswahl geeigneter ligninabbauender Basidiomyceten wurde ein Screening mit 46 Stämmen durchgeführt, in dem auf Anwesenheit und Aktivität von Peroxidasen, Laccasen, Polyphenoloxidasen und Tyrosinasen geprüft wurde (vgl. 3.2.5). Die Kultivierung der Organismen erfolgte dazu auf festem Nährmedium mit Erdnußschalen (vgl. 3.2.2.4).

Vier Reagenzien wurden im Abstand von sieben Tagen auf das Oberflächenmycel der Agarkulturen aufgetragen (Abb. 4.1):

- Zum Nachweis von Peroxidasen wurde eine H_2O_2 /Pyrogallol-Lösung verwendet. Bei Anwesenheit von Peroxidasen war eine gelbbraune Färbung zu beobachten.
- Für die Detektion von Polyphenoloxidasen wurde eine ethanolische Guajakharzlösung aufgetragen. Ein positiver Nachweis von Polyphenoloxidasen äußerte sich in einer Blaufärbung.
- Eine violette Färbung war bei Zugabe von ethanolischer α -Naphthol-Lösung zu beobachten, wenn Laccasen vorhanden waren.
- Bei Sekretion von Tyrosinasen trat nach Zugabe einer ethanolischen p-Kresol-Lösung Orangefärbung auf.

Die Enzymaktivitäten wurden anschließend anhand der auftretenden Farbintensitäten vier Aktivitätsbereichen zugeordnet:

keine Aktivität	(0),
schwache Aktivität	(1),
mittlere Aktivität	(2) und
starke Aktivität	(3).

Außerdem wurde Ort der Färbung verzeichnet, wenn eine eindeutige Zuordnung möglich war:

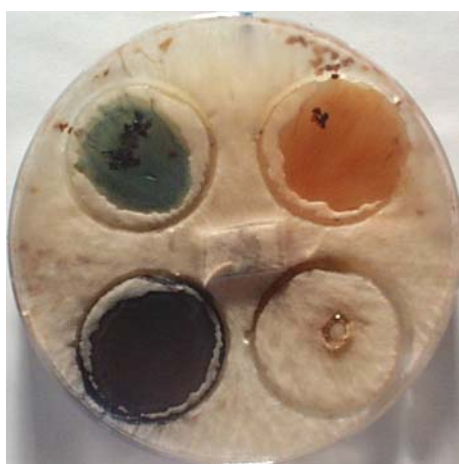
Färbung des Mycels	MY	
Färbung des umgebenden Mediums	X	(als „Hof“)
Färbung an den Erdnußschalen	ES	.



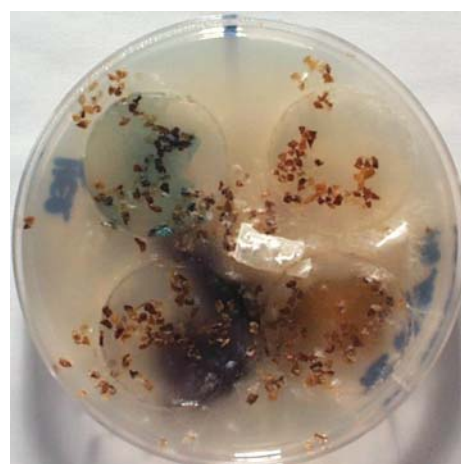
Lepista irina



Pleurotus sapidus



Cyathus striatus



Hericium erinaceus

Abb. 4.1: Farbreaktionen zum Nachweis lignolytischer Enzymaktivitäten an unterschiedlichen Kulturtagen. Auf jeder Oberflächenkultur entsprechen die angefärbten Segmente: Links oben: Polyphenol-oxidasen (Guajakharz, blau), links unten: Laccasen (α -Naphthol, violett), rechts oben: Tyrosinasen (p-Kresol, orange), rechts unten: Peroxidasen (Pyrogallol, gelbbraun).

Dabei wurden die Aktivitäten mit Kulturen verglichen, die im gleichen Zeitraum ohne Erdnußschalen inkubiert worden waren. Die vollständigen Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt (vgl. 7.1).

Mehr als die Hälfte der überprüften Spezies (24, entspricht 52 %) zeigten unter den gewählten Kulturbedingungen keine oder nur geringe Enzymaktivitäten. Sechs Basidiomyceten (13 %) zeigten keinerlei Enzymaktivität. Mittlere bis hohe Enzymaktivitäten wiesen alle Vertreter der Gattung *Cyathus* auf. Bis zum 14. Kulturtag waren bei *Cyathus earlei* (CBS 440.80) hohe Enzymaktivitäten sowohl mit als auch ohne Erdnußschalen nachweisbar. Im weiteren Kulturverlauf war die Aktivität jedoch nur noch schwach ausgeprägt. Ähnlich verhielt sich *Cyathus julietae* (CBS 373.80). *Cyathus helenae* (CBS 372.80) und *Cyathus limbatus* (CBS 335.81) zeigten keinerlei Tyrosinaseaktivität über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Organismen, die ausschließlich bei der Kultivierung auf Erdnußschalen Enzymaktivitäten aufwiesen oder wesentlich stärkere Enzymaktivität zeigten als ohne Induktion, waren *Bjerkandera adusta* (CBS 414.48), *Ganoderma applanatum* (CBS 250.61), *Lentinus lepideus* (CBS 450.79), *Marasmius alliaceus* (CAS 413) und *Tyromyces floriformis* (CBS 232.53). Der umgekehrte Fall, d.h. deutlich höhere Enzymaktivitäten im nicht induzierten Fall, zeigte sich bei den *Lentinula edodes*-Stämmen CBS 225.51 und CBS 389.89.

Außerdem war bei *Hypomyces odoratus* (CBS 764.68), *Ischnoderma benzoinum* (CBS 311.29) und *Marasmius scorodonius* (CBS 137.83) zu beobachten, daß sich bei nicht induzierter Kultivierung einige Enzymaktivitäten wesentlich langsamer entwickelten als bei Wachstum auf Erdnußschalen.

Überwiegend war die Aktivitätsfärbung am Pilzmycel lokalisiert. Bei *Cyathus helenae* (CBS 372.80) und *Hericium erinaceus* (CBS 260.74) war Polyphenoloxidaseaktivität vor allem an den Erdnußschalen zu finden. Eine Färbung des umgebenden Mediums bzw. eine Färbung als Vorhof zum angrenzenden Mycel war im Fall der Laccase besonders ausgeprägt bei *Cyathus pallidus* (CBS 376.80), *Cyathus striatus* (DSMZ 1652), *Lepista nuda* (CBS 300.58) und *Pleurotus sapidus* (DSMZ 8266), bei welchem Aktivität von Phenoloxidasen, Laccasen und Peroxidasen nach 28 Kulturtagen auch an den Erdnußschalen zu finden war. Tyrosinaseaktivität außerhalb des Mycels zeigte sich bei keinem der 46 untersuchten Organismen.

Tabelle 4.1 faßt diejenigen Basidiomyceten zusammen, die besonders hohe Enzymaktivitäten aufwiesen.

Tabelle 4.1: Enzymaktivitäten ausgewählter Basidiomyceten aus Oberflächenkultivierungen mit (induziert) und ohne Erdnußschalen (siehe dazu auch Anhang 7.1). Aktivitäten: 0=keine, 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Aktivität. Ort der Färbung (wenn eindeutige Zuordnung möglich): MY=Mycel, X=Färbungshof, ES=Erdnußschalen.

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
22	<i>Lepista irina</i> CBS 458.79								
	Polyphenoloxidase	1 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	2 MY	1 MY X	2 MY X	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY
	Peroxidase	1 MY	1 X	1 MY	3 MY	3 MY	2 MY	2 MY	3 MY
26	<i>Marasmius scorodoni</i> CBS 166.44								
	Polyphenoloxidase	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	3 MY	3 MY X	3 MY X	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Peroxidase	1 MY	1 MY	2 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
27	<i>Marasmius scorodoni</i> CBS 137.83								
	Polyphenoloxidase	2 MY	1 MY	3 MY	1 MY	3 MY	3 MY	3	3
	Tyrosinase	0	0	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3	3
	Laccase	3 MY X	1 MY	2 MY	1 MY X	3 MY	3 MY	3	3
	Peroxidase	1	1	1	2	3	3	3	3
30	<i>Meripilus giganteus</i> CBS 561.86								
	Polyphenoloxidase	3 MY	1 MY	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY
	Tyrosinase	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY
	Laccase	3 MY X	2 MY X	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY	1 MY
	Peroxidase	2 MY	1 MY	1 MY	3 MY	1 MY	3 MY	3 MY	1 MY
39	<i>Pleurotus sapidus</i> DSMZ 8266								
	Polyphenoloxidase	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY ES	3 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	3 MY X	2 MY X	3 MY X	1 MY	3 MY	3 MY	3 MY ES	3 MY
	Peroxidase	1 X	1 X	0 MY	1 X	1 MY	1 MY	2 MY ES	3 MY

Für weitere Untersuchungen wurden *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina* ausgewählt.

P. sapidus zeigte als einziger der in Tabelle 4.1 aufgeführten Organismen ausgeprägte Enzymaktivitäten sowohl außerhalb des Mycels als auch am Substrat. Zudem erwies sich *P. sapidus* als vergleichsweise schnell wachsender Basidiomycet.

4.3 Submerskultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina*

4.3.1 Statisch-dynamische Kultivierung

Um eine möglichst vollständige Anhaftung des Pilzmycels am Substrat zu gewährleisten, wurde nach Inokulation zunächst sieben Tage statisch inkubiert. Nach diesem Zeitraum war ein kompletter Bewuchs des Substrates zu beobachten, während ohne vorangestellte statische Kultivierungsphase Mycel und Substrat nach Zugabe des Mediums weitgehend getrennt voneinander vorlagen. Die Inkubation der Submerskultur unter Schütteln wird im folgenden als dynamische Kultivierung bezeichnet.

In den im folgenden dargestellten Graphen ist der Zeitpunkt, an dem die immobilisierte Kultur mit flüssigem Medium versetzt wurde, gleich Null gesetzt (vgl. Abbildungen 4.2 bis 4.15). Alle quantitativen Daten ergaben sich als Mittelwerte aus mindestens Doppelbestimmungen.

Referenzkultivierungen ohne Erdnußschalen wurden stets mit Glaswolle als inertem Träger durchgeführt, um die Substratbindung zu simulieren und vergleichbare Kulturbedingungen sicherzustellen.

Neben den Kulturparametern pH-Wert, Protein- und Glucosegehalt wurden stellvertretend für die extrazellulären Enzyme die Aktivitäten von Laccase (EC 1.10.3.2) und Glucoseoxidase (EC 1.1.3.4) bestimmt. Aufgrund der Anhaftung des Mycels am Substrat war eine Bestimmung der Biofeucht- oder Biotrockenmasse nicht durchführbar. Daher wurde als analytischer Parameter zur Beurteilung der Vitalität der Kulturen die Laccase-Aktivität herangezogen.

4.3.1.1 Submerskultivierung von *Pleurotus sapidus*

Die Laccase-Aktivität war bei der Kultivierung auf Erdnußschalen stets wesentlich höher als bei der Kontrolle. Bei induzierter Kultivierung war nach einer Kulturdauer von 48 h ein starker Abfall (ca. 50 %) der Laccase-Aktivität zu verzeichnen. Bei der Referenzkultur verlief

der Abfall über einen Zeitraum von vier Tagen. Anschließend war die Aktivität nahezu konstant (Abb. 4.2).

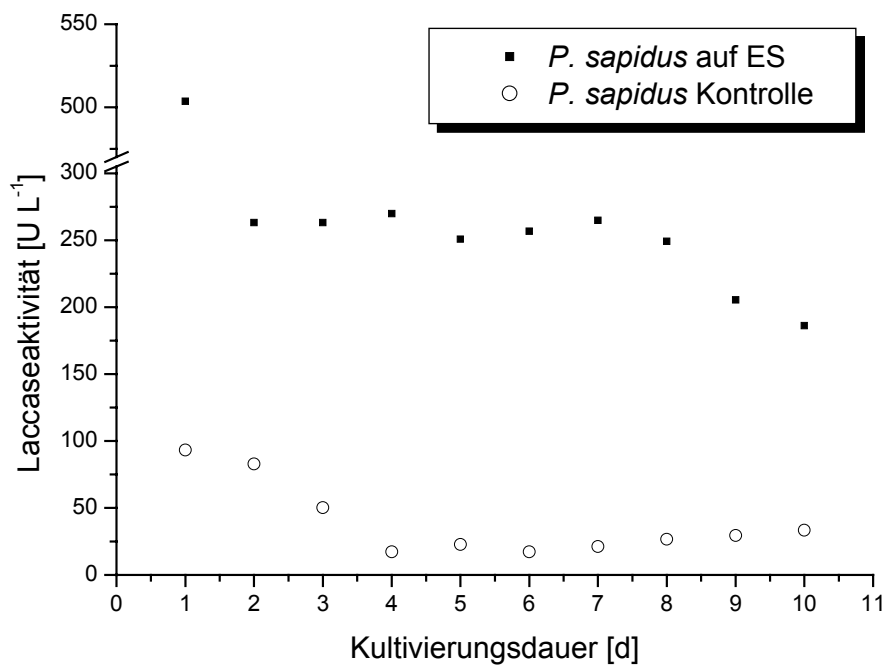


Abb. 4.2: Laccaseaktivität im Kulturmedium bei der Kultivierung von *P. sapidus* mit und ohne Erdnußschalen.

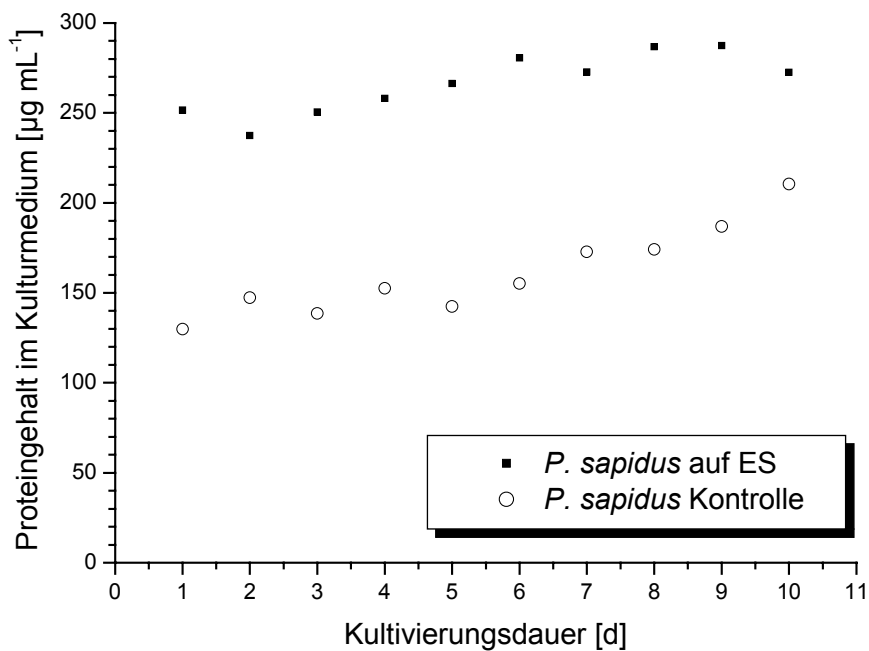


Abb. 4.3: Proteingehalt im Kulturmedium bei der Kultivierung von *P. sapidus* mit und ohne Erdnußschalen.

Der durchschnittliche Proteingehalt im Kulturmedium betrug bei Induktion ca. $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ und war damit im Mittel ungefähr $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ höher als bei der Kontrolle auf Glaswolle. Der Proteingehalt im Kulturüberstand war bei Kultivierung auf Erdnußschalen über den beobachteten Zeitraum hinweg nahezu konstant (Abb. 4.3). In stickstoffarmer Nährlösung (ohne Organismus) (vgl. 3.2.2.2), die über einen Zeitraum von sieben Tagen mit Erdnußschalen inkubiert wurde, war mit der Bestimmungsmethode nach LOWRY *et al.* (1951) kein Protein nachweisbar.

Die Aktivität der Glucoseoxidase (GOD) fiel bei induzierter Kultivierung von 230 U L^{-1} nach 24 h innerhalb eines weiteren Kulturtages um fast 95 % auf ca. 15 U L^{-1} ab. Danach verhielt sich die Glucoseoxidaseaktivität ähnlich wie bei der Kultivierung auf Glaswolle, die im gesamten beobachteten Zeitraum zwischen 15 und 30 U L^{-1} betrug (Abb. 4.4).

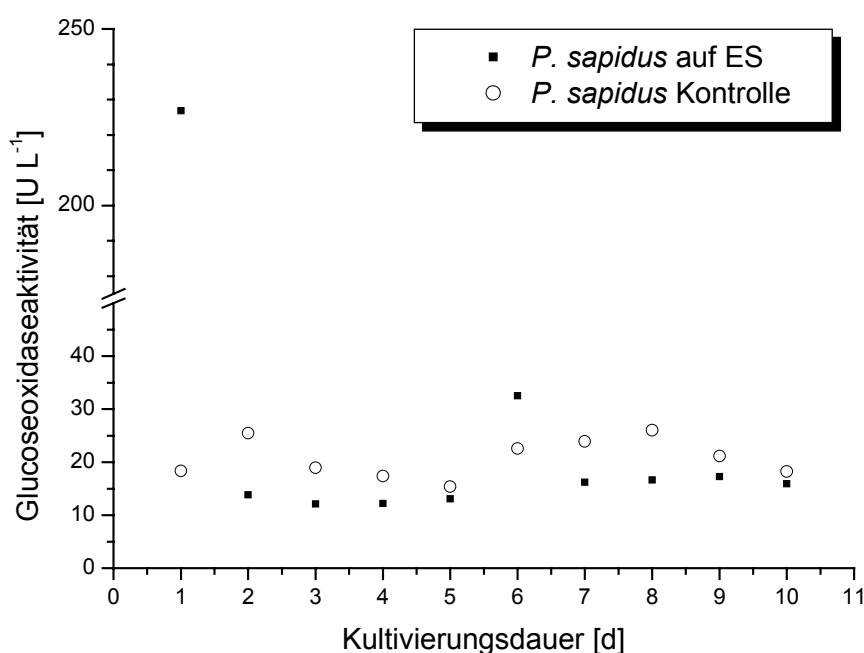


Abb. 4.4: Glucoseoxidaseaktivität im Kulturmedium bei der Kultivierung von *P. sapidus* mit und ohne Erdnußschalen.

Der pH-Wert der induzierten Kultur fiel innerhalb der ersten zwei Kulturtage von 5,5 auf 5,0 und erreichte nach sechs Kulturtagen einen nahezu konstanten Wert. Die Glucose im Kulturmedium war am sechsten Kulturtage nicht mehr nachweisbar (Abb. 4.5).

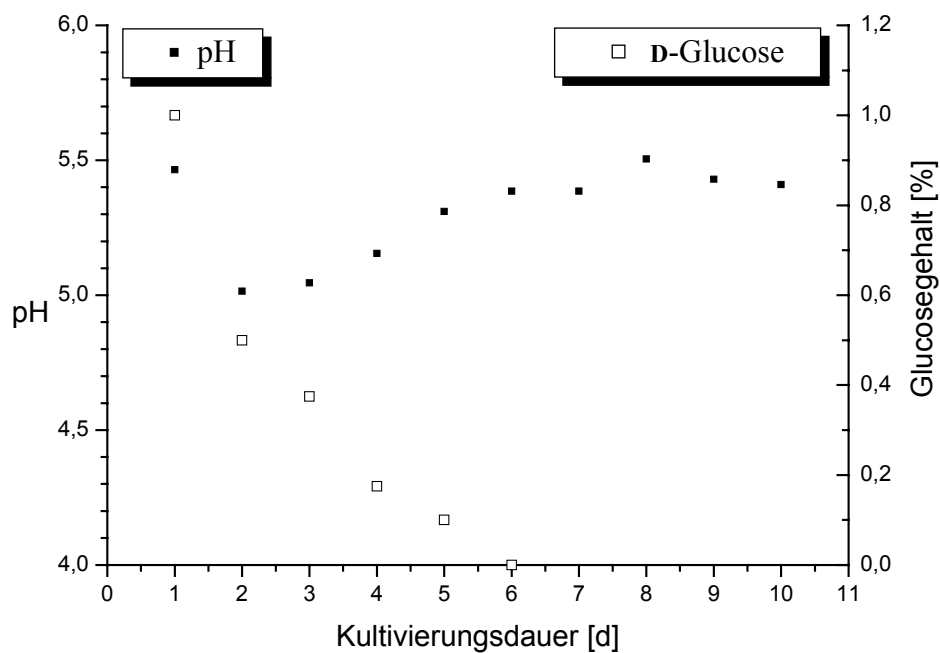


Abb. 4.5: Verlauf von pH-Wert und Glucosegehalt im Kulturmedium bei der Kultivierung von *P. sapidus* auf Erdnußschalen.

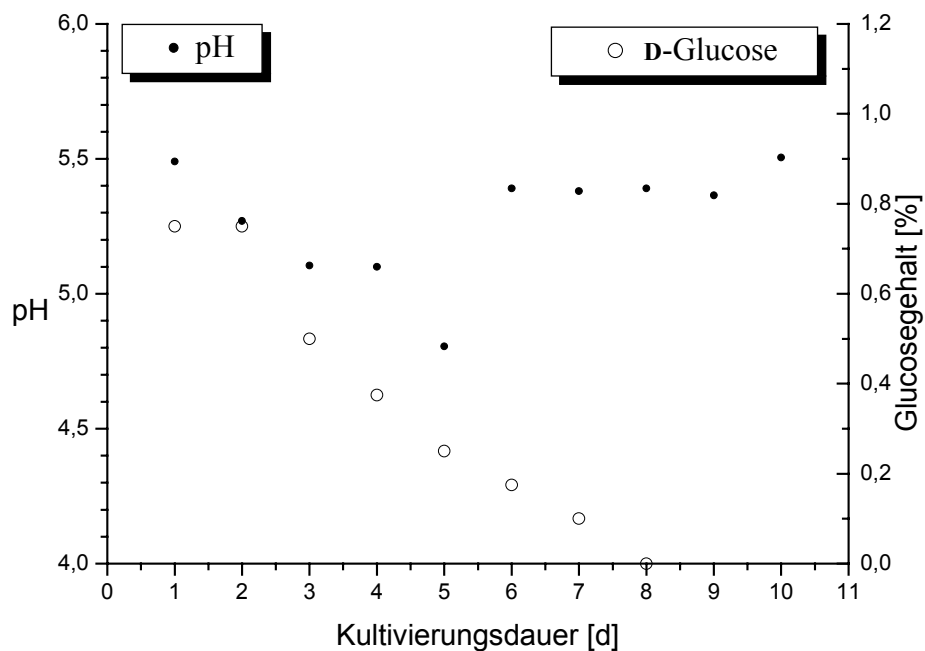


Abb. 4.6: Verlauf von pH-Wert und Glucosegehalt im Kulturmedium bei der Kultivierung von *P. sapidus* auf Glaswolle.

Der pH-Wert bei der Kultivierung auf Glaswolle erreichte nach fünf Kulturtagen ein Minimum von 4,8. Im weiteren Verlauf der Kultivierung stieg der pH-Wert auf einen nahezu konstanten Wert von 5,4. Nach acht Tagen war im Kulturmedium keine Glucose mehr nachweisbar (Abb. 4.6).

4.3.1.2 Submerskultivierung von *Lepista irina*

Die Laccaseaktivität bei der Kultivierung von *Lepista irina* war allgemein geringer als bei *P. sapidus* und überschritt 200 U L^{-1} nicht. Die Laccaseaktivität war bei Kultivierung auf Glaswolle wesentlich geringer als bei Induktion. Bei der induzierten Kultur trat ein Maximum der Laccaseaktivität bei 170 U L^{-1} am neunten Kulturtag auf. Die Aktivität der Referenzkultur dagegen blieb gering und überstieg 30 U L^{-1} nicht (Abb. 4.7).

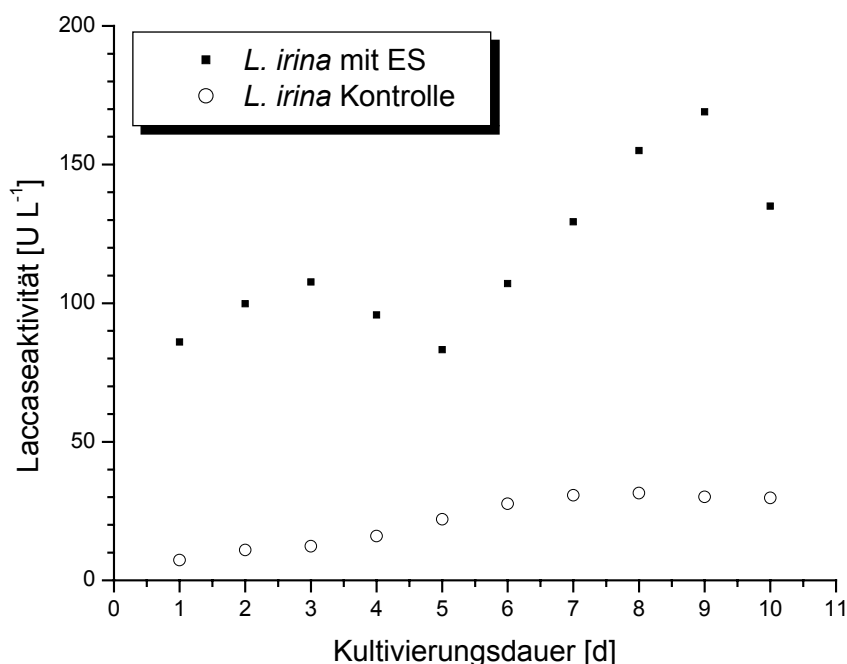


Abb. 4.7: Laccaseaktivität im Kulturmedium bei der Kultivierung von *L. irina* mit und ohne Erdnußschalen.

Der Proteingehalt im Überstand der induzierten Kulturen war ca. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ höher als bei der Referenzkultur auf Glaswolle. Ein Minimum war bei beiden Kultivierungen am zweiten und dritten Kulturtag zu verzeichnen (Abb. 4.8).

Die Glucoseoxidaseaktivität im Kulturmedium erreichte bei der Kultivierung auf Erdnußschalen am dritten Tag ein Maximum von 28 U L^{-1} . Ab dem fünften Kulturtag betrug die Aktivität nahezu konstant 16 U L^{-1} . Die Referenzkultur wies am siebten Kulturtag ein Maximum von 14 U L^{-1} auf. Im weiteren Kulturverlauf sank die GOD-Aktivität auf 12 U L^{-1} ab (Abb. 4.9).

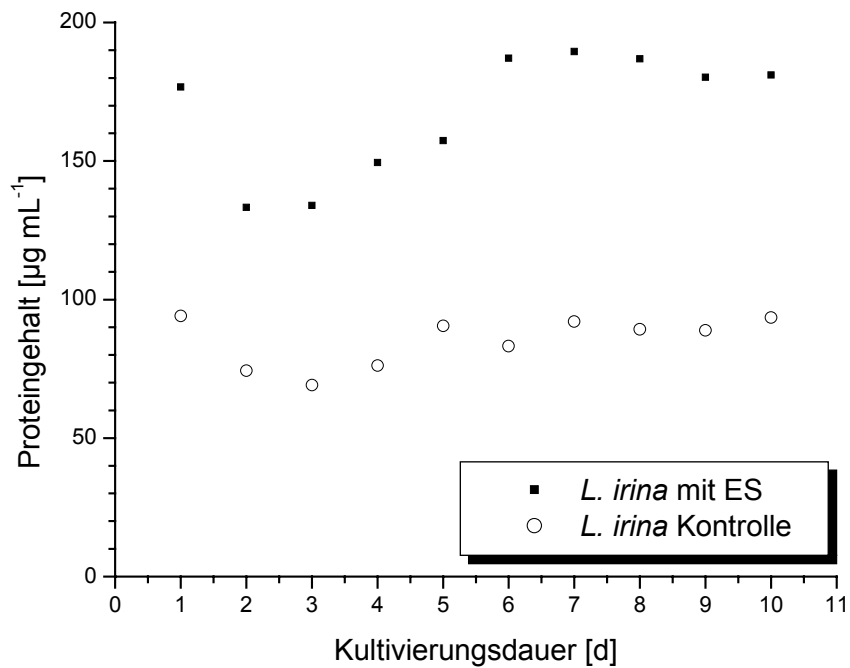


Abb. 4.8: Proteingehalt im Kulturmedium bei der Kultivierung von *L. irina* mit und ohne Erdnußschalen.

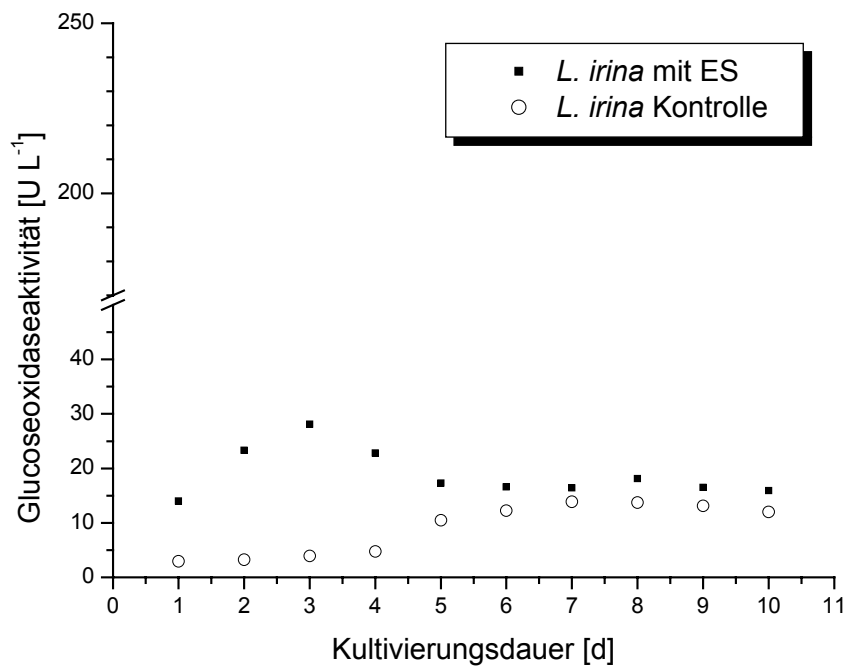


Abb. 4.9: Glucoseoxidaseaktivität im Kulturmedium bei der Kultivierung von *L. irina* mit und ohne Erdnußschalen.

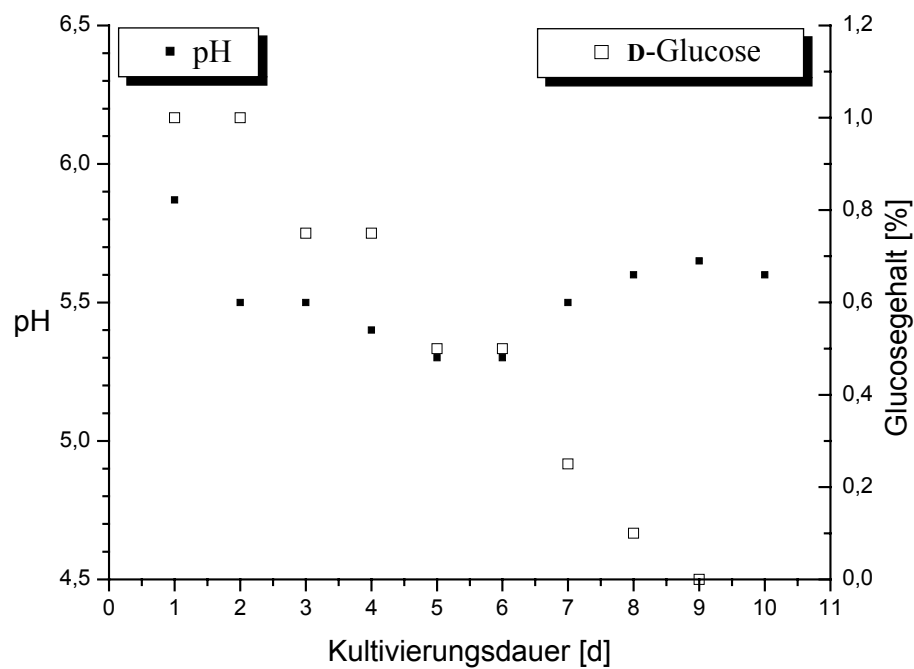


Abb. 4.10: pH-Wert und Glucosegehalt im Kulturmedium bei der Kultivierung von *L. irina* auf Erdnußschalen

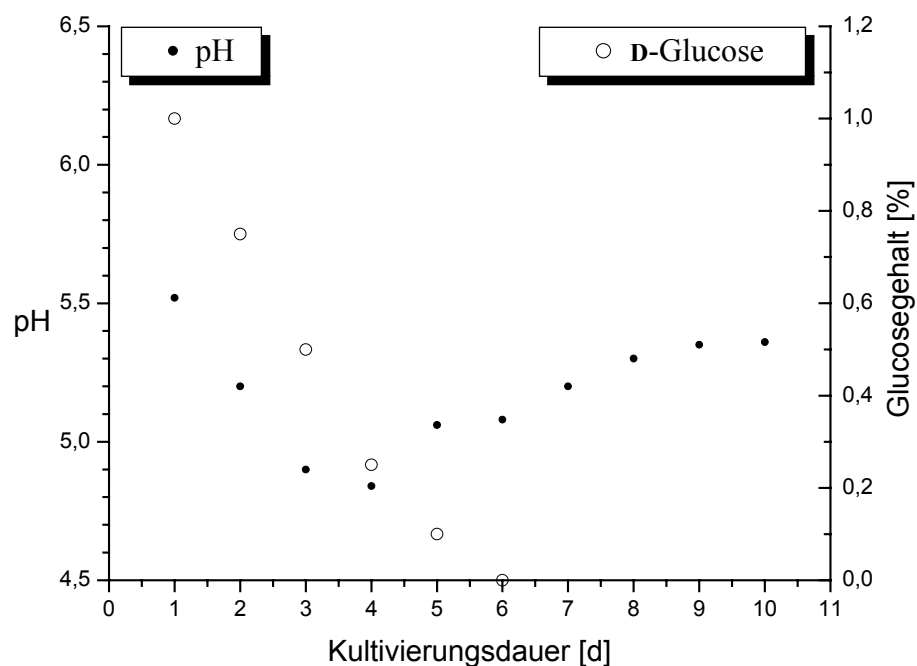


Abb. 4.11: pH-Wert und Glucosegehalt im Kulturmedium bei der Kultivierung von *L. irina* auf Glaswolle

Bei der Kultivierung von *L. irina* auf Erdnußschalen erreichte der pH-Wert im Kulturmedium ein Minimum von 5,3 am fünften Kulturtag. Im Gegensatz dazu trat bei der Referenzkultur ein Minimum von 4,8 am vierten Kulturtag auf. Der Glucosegehalt war bei der Kultivierung auf Erdnußschalen nach neun, bei Kultivierung auf Glaswolle bereits nach sechs Tagen nicht mehr nachweisbar (Abbildungen 4.10 und 4.11).

4.3.2 Kultivierung im *fed batch*-Verfahren

Ein *fed batch*-Verfahren ist eine Prozeßvariante, die eine Zwischenstellung zwischen einer geschlossenen Chargenkultur und einer kontinuierlichen Kultur einnimmt. Das hier angewandte Kultivierungsverfahren unterscheidet sich vom klassischen *fed batch*-Verfahren dadurch, daß das komplette Kulturmedium nach einer bestimmten Inkubationszeit entfernt und durch neues ersetzt wurde. Bei dem klassischen *fed batch*-Verfahren wird lediglich mit frischer Nährstofflösung versetzt [RÖMPP, 1995].

Zur Gewinnung von extrazellulären Proteinen wurde eine Kultivierungsmethode entwickelt, die das Entfernen des kompletten Kulturmediums unter Erhaltung des bereits vorhandenen Mycels und der Sterilität erlaubt.

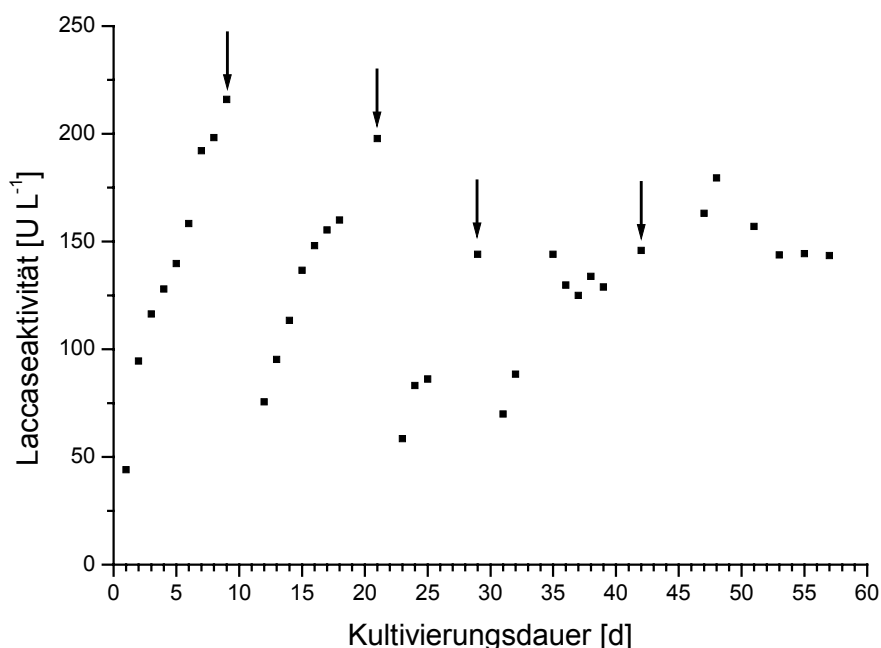


Abb. 4.12: Laccaseaktivität im Kulturmedium bei der *fed batch*-Kultivierung von *P. sapidus* mit Erdnußschalen; die Pfeile kennzeichnen die Aktivität kurz vor dem Wechsel des Mediums.

Für die Kultivierung im *fed batch*-Verfahren wurden unzerkleinerte Erdnußschalen verwendet, da diese eine einfachere Abtrennung des Kulturmediums als bei Einsatz gemahlener Schalen ermöglichten.

Bei der Kultivierung von *P. sapidus* nahm die Laccase-Aktivität nach jedem Wechsel des Kulturmediums stark zu. Jedoch war über den gesamten Kulturverlauf gesehen (57 d) eine Abnahme der durchschnittlichen Aktivität zu beobachten (Abb. 4.12). Limitierend war hier

außerdem das Kulturgefäß, welches aufgrund des beständigen Wachstums des Mycels schließlich nicht mehr ausreichend Platz für die benötigte Menge an Kulturmedium ließ.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der *fed batch*-Kultivierung von *L. irina* gemacht. Die Laccase-Aktivität nahm ebenfalls nach jedem Wechsel des Kulturmediums zunächst wieder zu, zum anderen war jedoch über die gesamte Kultivierungsdauer gesehen ebenso wie bei *P. sapidus* eine Abnahme der durchschnittlichen Aktivität zu beobachten (Abb. 4.13).

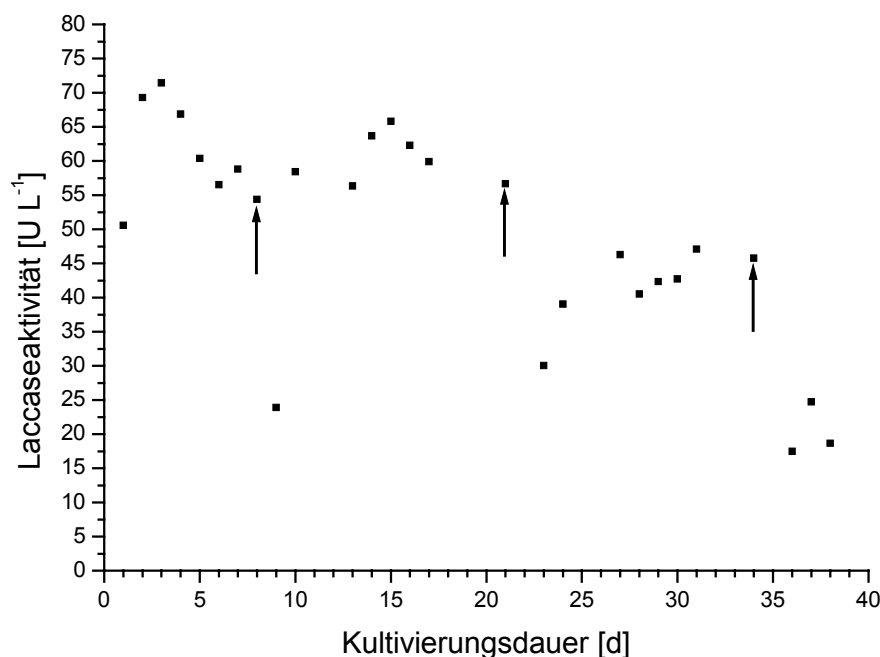


Abb. 4.13: Laccaseaktivität im Kulturmedium (*L. irina*, *fed batch*-Kultivierung); die Pfeile kennzeichnen die Aktivität kurz vor dem Wechsel des Kulturmediums.

Durch Supplementierung des Mediums mit 300 μM Cu^{2+} konnte eine Steigerung der Laccase-Aktivität erreicht werden. So wurden Aktivitätssteigerungen von über 500 U L^{-1} im fünften Zyklus (nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 57 d) erreicht (Abb. 4.14).

Unter Cu^{2+} -Supplementierung war der Proteingehalt von *P. sapidus* stets geringfügig höher als ohne, jedoch war in beiden Fällen ein ähnlicher Verlauf über den gesamten Kultivierungszeitraum zu verzeichnen (Abb. 4.15).

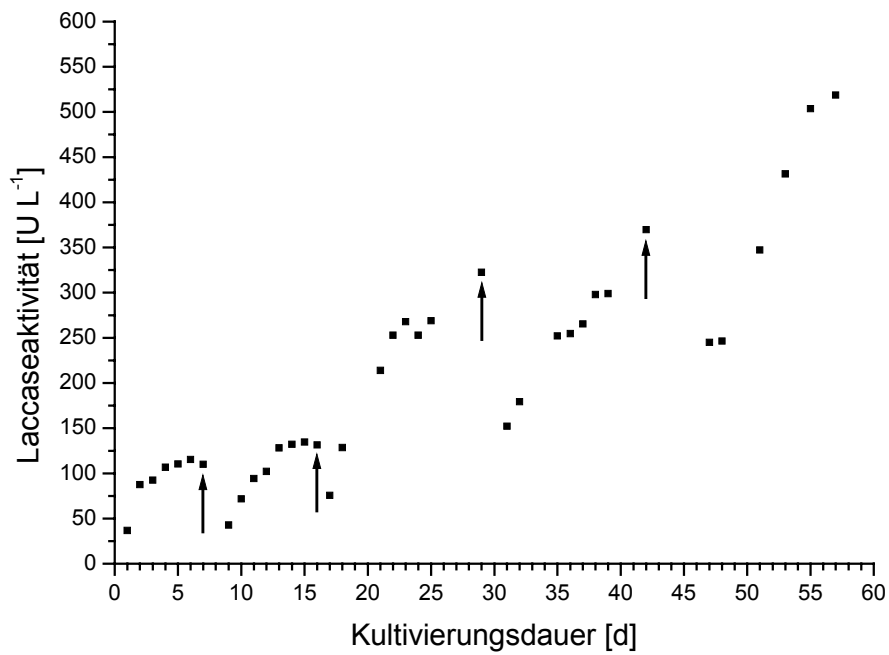


Abb. 4.14: Laccaseaktivität im Kulturmedium (*P. sapidus*, *fed batch*-Kultivierung, **Medium supplementiert mit 300 μ M Cu^{2+}**); die Pfeile kennzeichnen die Aktivität kurz vor dem Wechsel des Kulturmediums.

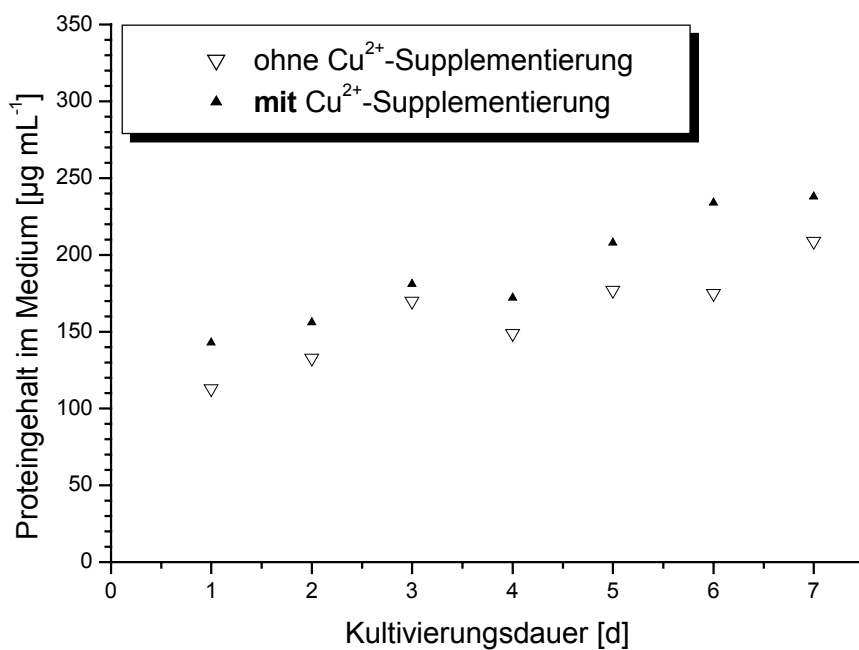


Abb. 4.15: Proteingehalt im Kulturmedium (*P. sapidus*, *fed batch*-Kultivierung) mit und ohne Cu^{2+} -Supplementierung

4.4 Sekretom-Analytik mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese

4.4.1 Probenvorbereitung

Um auf eine genügend große Menge extrazellulärer Proteine zurückgreifen zu können, wurden die Kulturmedien für eine elektrophoretische Trennung zunächst (wie unter 3.3.1) konzentriert.

Bei der Ultrafiltration wurde eine Volumenreduzierung um ca. 80 % erreicht. Eine nochmalige Reduktion um 80 % wurde durch Dialyse der bei der Ultrafiltration erhaltenen Retentate gegen 70 % (v/v) Glycerol erzielt.

Tabelle 4.2 zeigt beispielhaft die Proteinkonzentration der einzelnen Reinigungsstufen. Durch die Dialyse waren Proteinverluste von ca. 30 % in Bezug auf das Ultrafiltrationskonzentrat zu verzeichnen.

Tabelle 4.2: Konzentrierung der extrazellulären Proteine bei Aufreinigung von Kulturüberständen von *P. sapidus* auf Erdnußschalen (7. Kulturtag)

Probe	Volumen [mL]	Protein- konzentration [mg mL ⁻¹]	Gesamtprotein [mg]
Kulturmedium	100	0,27	27
Permeat der Ultrafiltration	85	0,19	16,2
Retentat der Ultrafiltration	15	0,67	10,1
Dialyse-Konzentrat	3	2,37	7,1

Für die Erstellung von zweidimensionalen Elektropherogrammen wurden, wenn nicht anders erwähnt, Kulturüberstände aus Kultivierungen mit stickstoffarmem Nährmedium (vgl. 3.2.2.2) ohne zusätzliche Cu²⁺-Supplementierung verwendet, um zu gewährleisten, daß ausschließlich die Induktion von Enzymen durch Erdnußschalen detektiert wird.

4.4.2 Methodenentwicklung zur Visualisierung der Proteinmuster

4.4.2.1 Präzipitation der Proteine

Die Proteinkonzentrate, die wie unter 3.3.1 angegeben gewonnen wurden, wiesen eine intensiv braune Färbung auf. Um noch in Lösung befindliche Salze, die bei der

isoelektrischen Fokussierung stören, möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Proteine ausgefällt.

Bei der Präzipitation mit Trichloressigsäure (vgl. 3.2.5) wurde ein braunes Proteinpellet erhalten. Außerdem wiesen alle zweidimensionalen Elektropherogramme induzierter Kultivierungen, für die TCA-gefällte Proteine eingesetzt worden waren, im sauren pI-Bereich starke Schlierenbildung über den gesamten Molekülgrößenbereich auf. Ein Beispiel ist in Abbildung 4.16 dargestellt. Bei Kultivierungen auf Glaswolle trat diese Schlierenbildung nicht auf (Abb. 4.17).

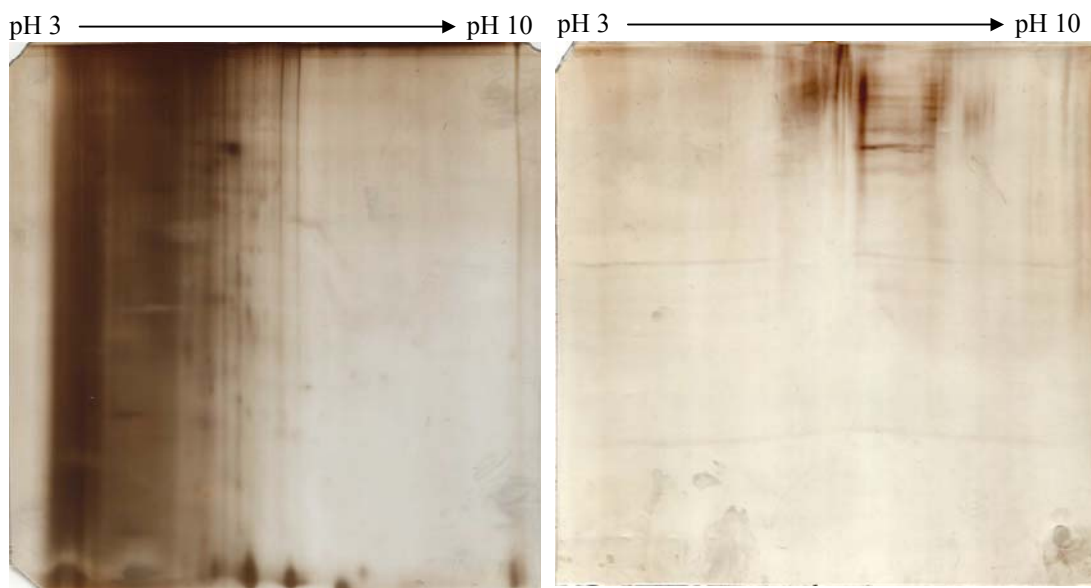


Abb. 4.16: Links: 2D-Elektropherogramm extrazellulärer Proteine von *L. irina* auf Erdnußschalen; Schlierenbildung durch Polyphenole im sauren pI-Bereich (IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3 bis 10; 7. Kulturtag, Silberfärbung.). Rechts: 2D-Elektropherogramm von Standardnährlösung mit Erdnußschalen (ohne Organismus; IPG-Streifen mit pH 3-10; Inkubationsdauer = 7 d; Silberfärbung)

Vergleichbare Beobachtungen wurden bei Kultivierungen von *P. sapidus* gemacht.

Schlierenbildung war am stärksten bei mit Silber gefärbten (vgl. 3.3.3.3) zweidimensionalen Gelen zu beobachten und in etwas schwächerer Form bei der Anwendung der kolloidalen Coomassie-Färbung (vgl. 3.3.3.2).

2D-Elektropherogramme von Standardnährlösung, die über einen Zeitraum von sieben Tagen mit Erdnußschalen inkubiert wurde, zeigten geringfügige Schlierenbildung im pI-Bereich größer 6. Es traten jedoch keine Proteinspots auf.



Abb. 4.17: 2D-Elektropherogramm extrazellulärer Proteine von *L. irina* auf Glaswolle; (IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3 bis 10; 7. Kulturtag, Silberfärbung.).

Die Phenolbestimmung im Proteinkonzentrat mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz (vgl. 3.6.1) zeigte eine Erhöhung des Phenolgehalts im Kulturmedium von *L. irina* bei der Kultivierung auf Erdnußschalen auf etwa das Doppelte im Vergleich zur Kultivierung auf Glaswolle (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Mittels Folin-Ciocalteu Reagenz bestimmte Phenolgehalte in Proteinkonzentraten aus *L. irina*-Kultivierungen (7. Kulturtag). Der Blindwert wurde mit nicht inokulierten Erdnußschalen erstellt (Inkubationsdauer = 7 d).

Probe	Phenolgehalt
	[μg Gallussäureäquivalente / mL]
Ultrafiltrationskonzentrat <i>L. irina</i> auf Glaswolle	28
Ultrafiltrationskonzentrat <i>L. irina</i> auf Erdnußschalen	44
Dialysekonzentrat <i>L. irina</i> auf Glaswolle	155
Dialysekonzentrat <i>L. irina</i> auf Erdnußschalen	264
Ultrafiltrationskonzentrat Blindwert	6
Dialysekonzentrat Blindwert	11

Durch Chloroform-Methanol-Fällung nach WESSEL & FLÜGGE (1984) wurde auch aus stark gefärbten Proteinkonzentraten präzipitiertes Protein erhalten, welches keine Färbung aufwies. Dadurch war es möglich, mit Silber gefärbte Gele ohne Schlierenbildung zu erstellen.

Die Fluoreszenzfärbung mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat) erwies sich als am wenigsten anfällig gegenüber Störungen durch das Substrat bzw. dessen Abbauprodukte. Daher wurden zur Minimierung von störenden Verbindungen die Proteine im folgenden zunächst mit Chloroform-Methanol präzipitiert und sämtliche zweidimensionalen Gele mit Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat) gefärbt (vgl. 3.3.3.1).

4.4.2.2 Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der Proteinmuster zu zeigen, wurden die Kulturmedien unabhängiger Kultivierungen von *P. sapidus* am gleichen Kulturtag aufgearbeitet. Dabei wurden Kultivierungen auf Erdnußschalen und auf Glaswolle untersucht. Die Abbildungen 4.18 und 4.19 zeigen, daß die erhaltenen Proteinmuster gut reproduzierbar waren.

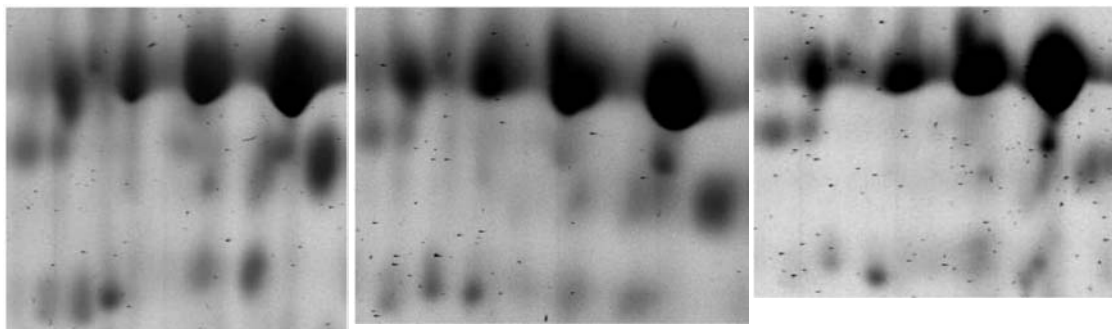


Abb. 4.18: Ausgewählte *Spot*bereiche unabhängiger Kultivierungen von *P. sapidus* auf Erdnußschalen (7. Kulturtag) zur Demonstration der Reproduzierbarkeit.

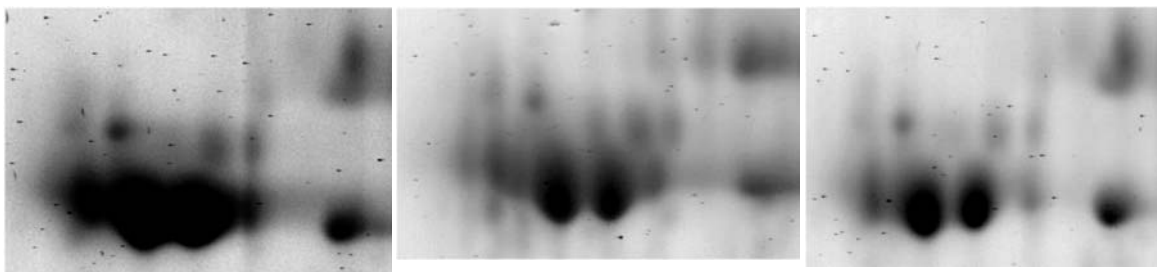


Abb. 4.19: Ausgewählte *Spot*bereiche unabhängiger Kultivierungen von *P. sapidus* auf Glaswolle (7. Kulturtag) zur Demonstration der Reproduzierbarkeit.

Von jeder Proteinprobe wurden drei unabhängige Elektropherogramme angefertigt.

4.4.3 pI-Bereich der Proteinexpression

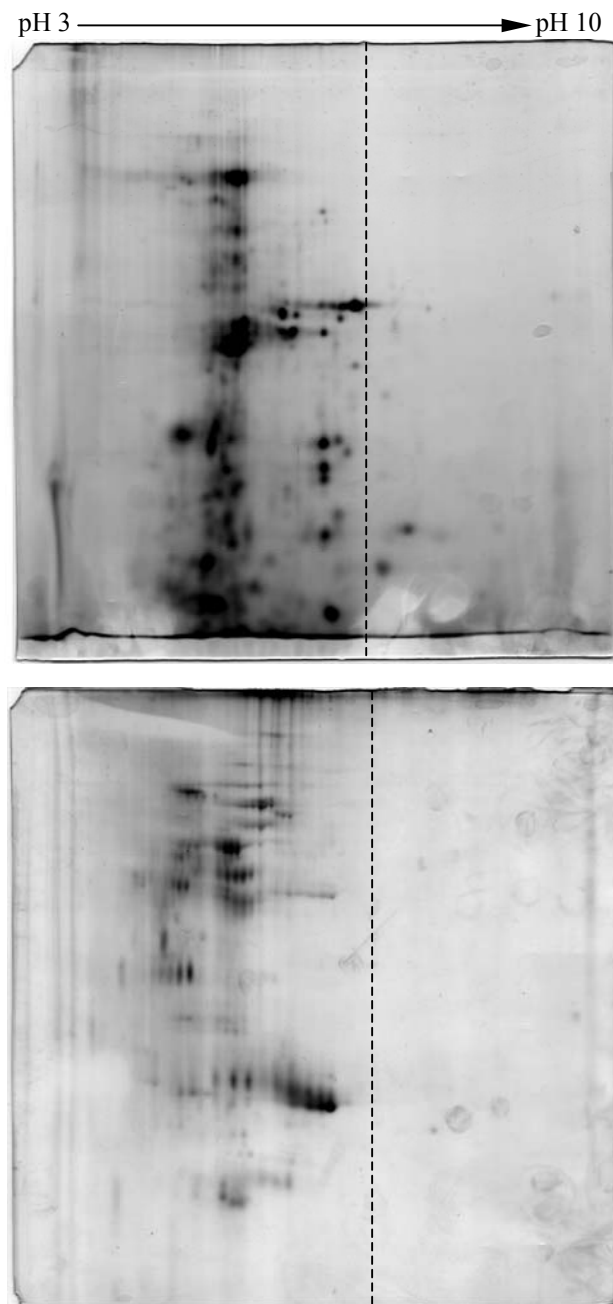


Abb. 4.20: 2D-Elektropherogramme extrazellulären Gesamtproteins von *P. sapidus* (oben) und *L. irina* (unten) auf Erdnußschalen (7. Kulturtag) unter Verwendung von IPG-Streifen mit dem pH-Bereich 3-10. Die gestrichelte Linie kennzeichnet pH 6.

Sowohl *P. sapidus* als auch *L. irina* sekretierten bei Kultivierung auf Erdnußschalen nahezu ausschließlich Proteine mit isoelektrischen Punkten im Bereich von 3 bis 6 (Abb. 4.20). Für alle folgenden Untersuchungen wurden daher zur Erzielung einer höheren Auflösung IPG-Streifen mit einem pH-Bereich von 3 bis 6 verwendet.

4.5 Expressionsmuster bei induzierter und nicht induzierter Kultivierung von *Lepista irina*

Sowohl bei Kultivierungen auf Erdnußschalen als auch bei Kultivierungen auf Glaswolle wurde der siebte Kulturtag zur detaillierten Analyse des extrazellulären Gesamtproteins von *Lepista irina* ausgewählt.

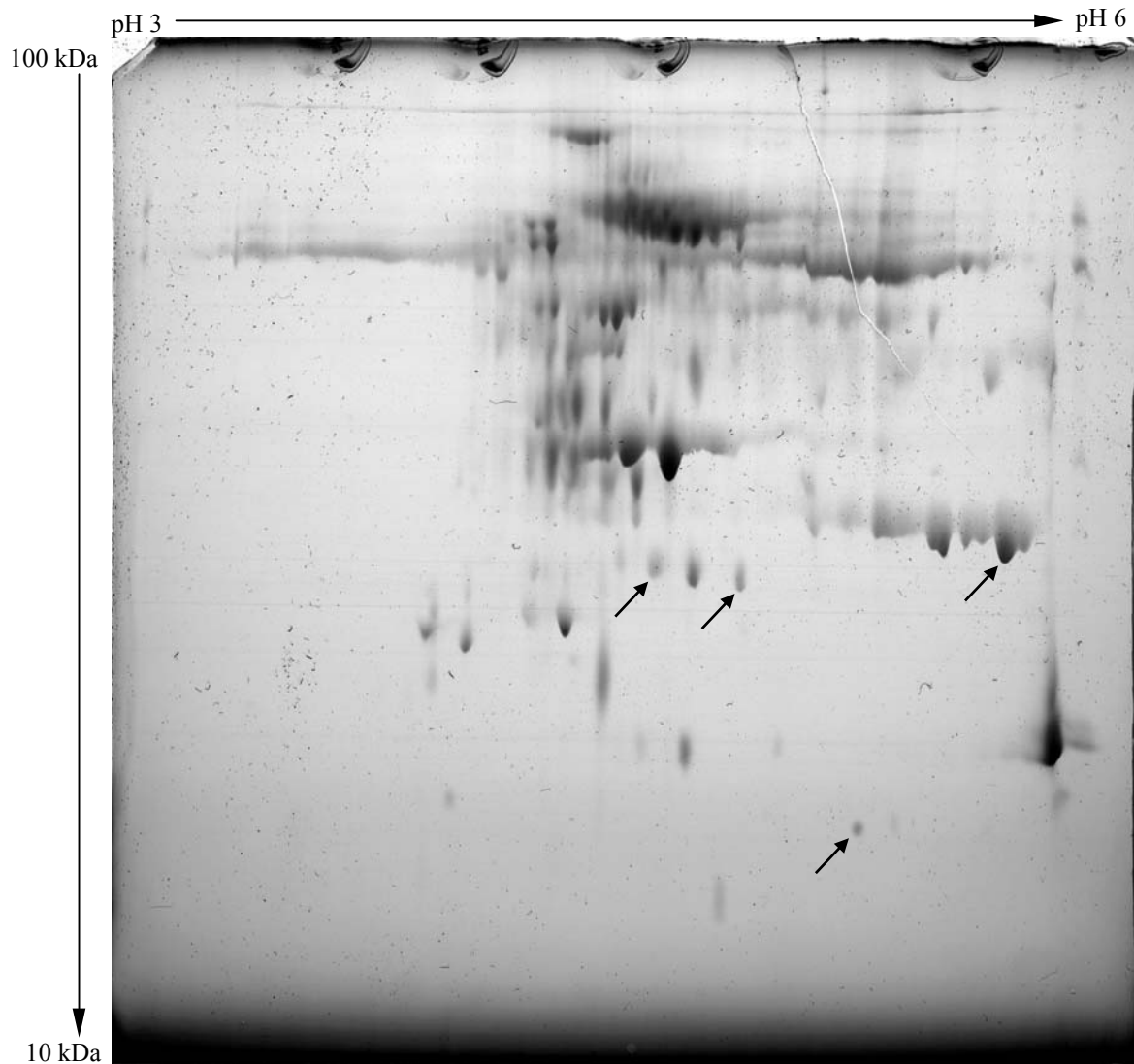


Abb. 4.21: 2D-Elektropherogramm von extrazellulärem Gesamtprotein von *L. irina* auf Erdnußschalen (7. Kulturtag). Die Pfeile kennzeichnen Proteinspots, die ausschließlich bei induzierter Kultivierung auftraten.

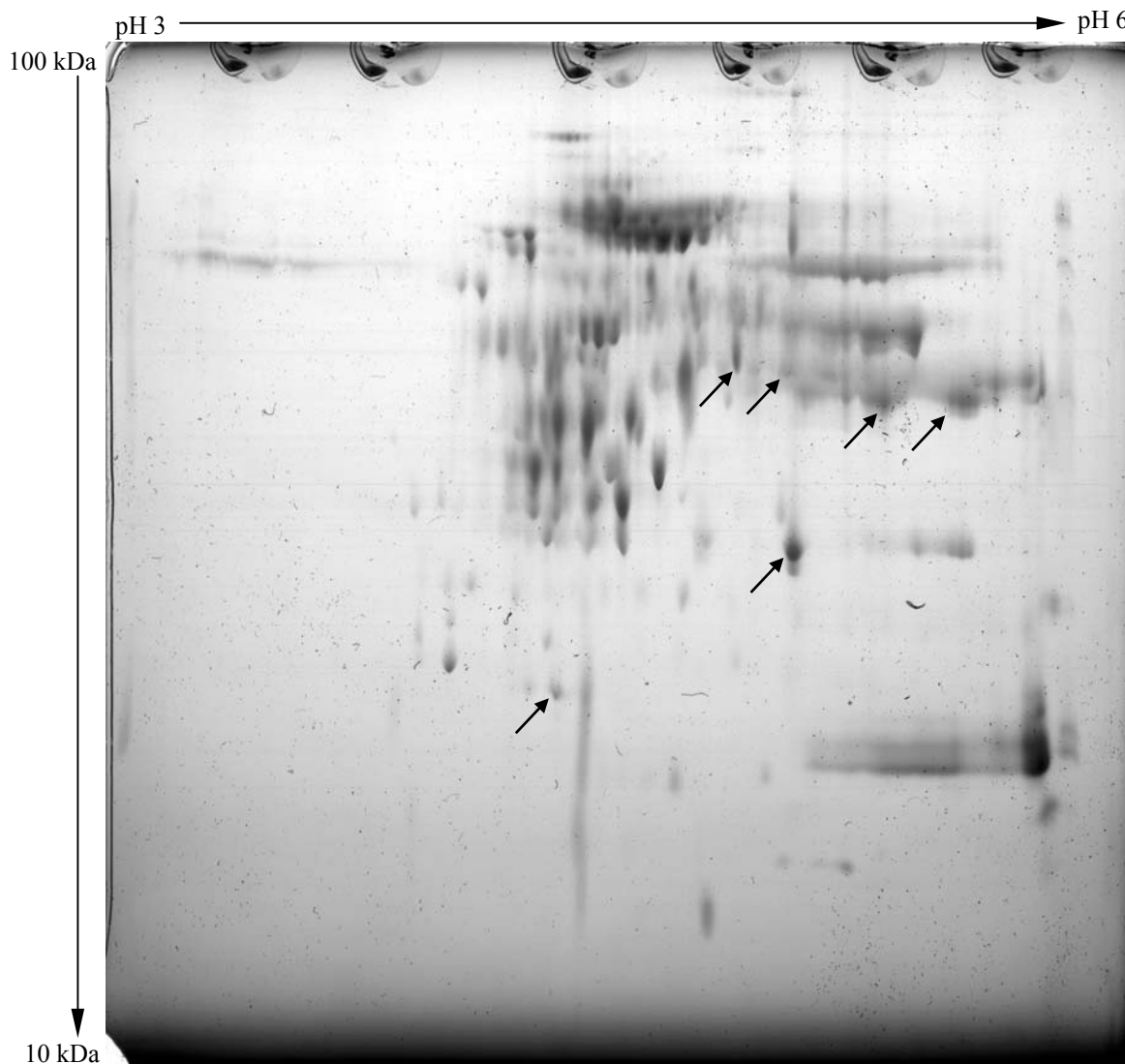


Abb. 4.22: 2D-Elektropherogramm von extrazellulärem Gesamtprotein von *L. irina* auf Glaswolle (7. Kulturtag). Die Pfeile kennzeichnen Proteinspots, die ausschließlich bei nicht induzierter Kultivierung auftraten.

Die überwiegende Anzahl der Proteine war im pI-Bereich 4,0 bis 5,0 zu finden. Das Molekulargewicht der meisten Proteine betrug ca. 30 bis 100 kDa. In den Abbildungen 4.21 und 4.22 sind diejenigen Proteinspots markiert, die ausschließlich entweder bei induzierter Kultivierung (auf Erdnußschalen) oder bei nicht induzierter Kultivierung (auf Glaswolle) auftraten. Bei beiden Kultivierungsvarianten waren die neuen Proteinspots über den pI-Bereich 4,0 bis 5,5 verteilt. Bei induzierter Kultivierung von *L. irina* traten neue *Spots* vorwiegend mit Molekulargewichten von ca. 30 kDa und kleiner auf.

Im Gegensatz zu den 2D-Elektropherogrammen von *P. sapidus*-Kultivierungen zeigten die Proteinspots von sekretiertem Gesamtprotein von *L. irina* ein ausgeprägtes *tailing*.

4.6 Kinetik der Proteinexpression bei *P. sapidus*

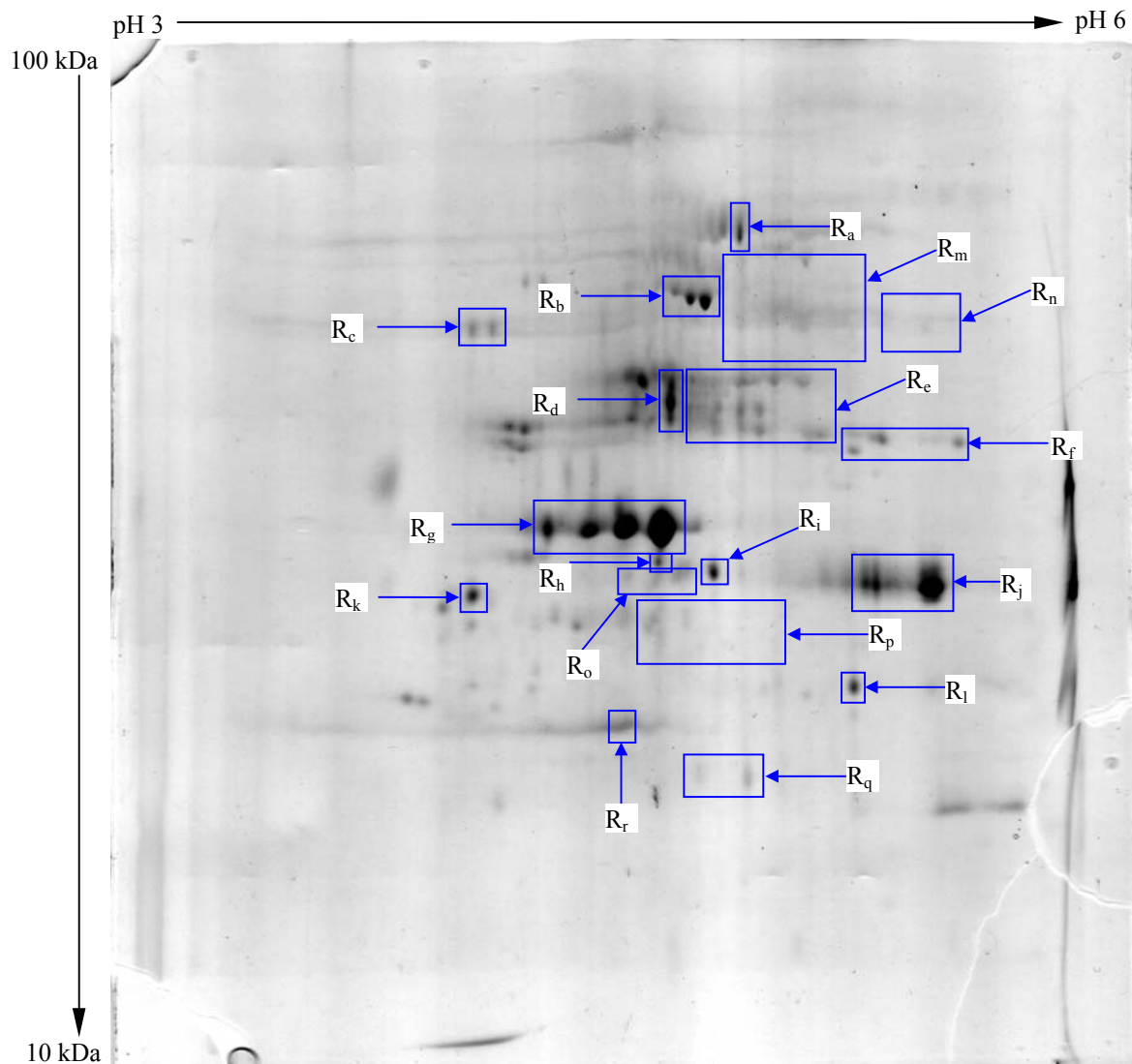


Abb. 4.23: 2D-Elektropherogramm als Referenzgel für die Expressionskinetik mit hervorgehobenen Bereichen R_a bis R_r (R = Referenzbereich), (*P. sapidus* auf Erdnußschalen, 7. Kulturtag). Die blau markierten Bereiche R_a bis R_r entsprechen den Bereichen K_a bis K_r in den Abbildungen 4.24 bis 4.27.

Für die Untersuchung der extrazellulären Proteine wurde die statisch-dynamische Kultivierungsweise angewendet. Um Aussagen darüber machen zu können, zu welchem Zeitpunkt der Kultivierung bestimmte Proteine in das Kulturmedium abgegeben werden, wurden *fed batch*-Kulturen von *P. sapidus* auf Erdnußschalen während der dynamischen Kultivierungsphase nach zwei, vier, sechs und acht Tagen aufgearbeitet (vgl. Abbildungen 4.24 bis 4.27). Dabei wurde wie unter 3.3.1 beschrieben vorgegangen.

Ein Vergleichselektropherogramm für die Kinetik der Proteinexpression wurde von Kulturtag 7 erstellt (Abb. 4.23), da zu diesem Zeitpunkt im Kulturmedium keine Glucose mehr nachweisbar war (Abb. 4.5).

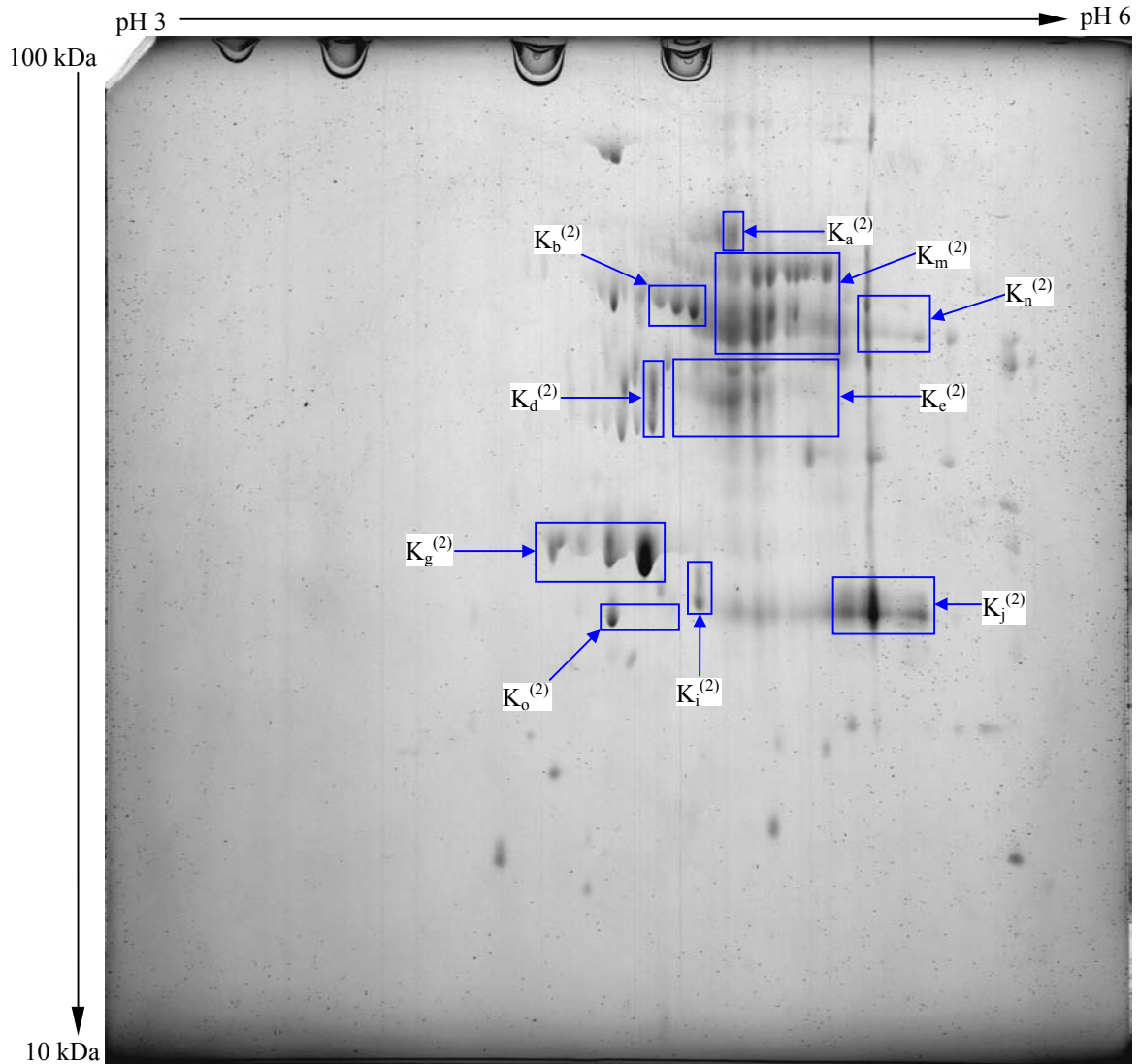


Abb. 4.24: 2D-Elektropherogramm extrazellulären Gesamtproteins von *P. sapidus* auf Erdnußschalen, 2. Kulturtag. Die blau markierten Bereiche K_a bis K_o entsprechen den Bereichen R_a bis R_o in Abb. 4.23. Die Zahl in Klammern bezeichnet den Kulturtag.

Die Spotbereiche K_a , K_b , K_d bis K_g , K_i und K_j traten über den gesamten Kultivierungszeitraum auf. K_h trat ab dem vierten, K_c , K_k und K_l traten ab dem sechsten Kulturtag auf.

Zahl und Intensität der *Spots* nahmen ab Kulturtag 6 deutlich zu (Abb. 4.26). Die Proteine der Bereiche K_b , K_d , K_g und K_j wiesen eine starke Intensitätssteigerung mit zunehmender Kulturdauer auf, während die übrigen Bereiche nahezu gleichbleibende Intensität aufzeigten.

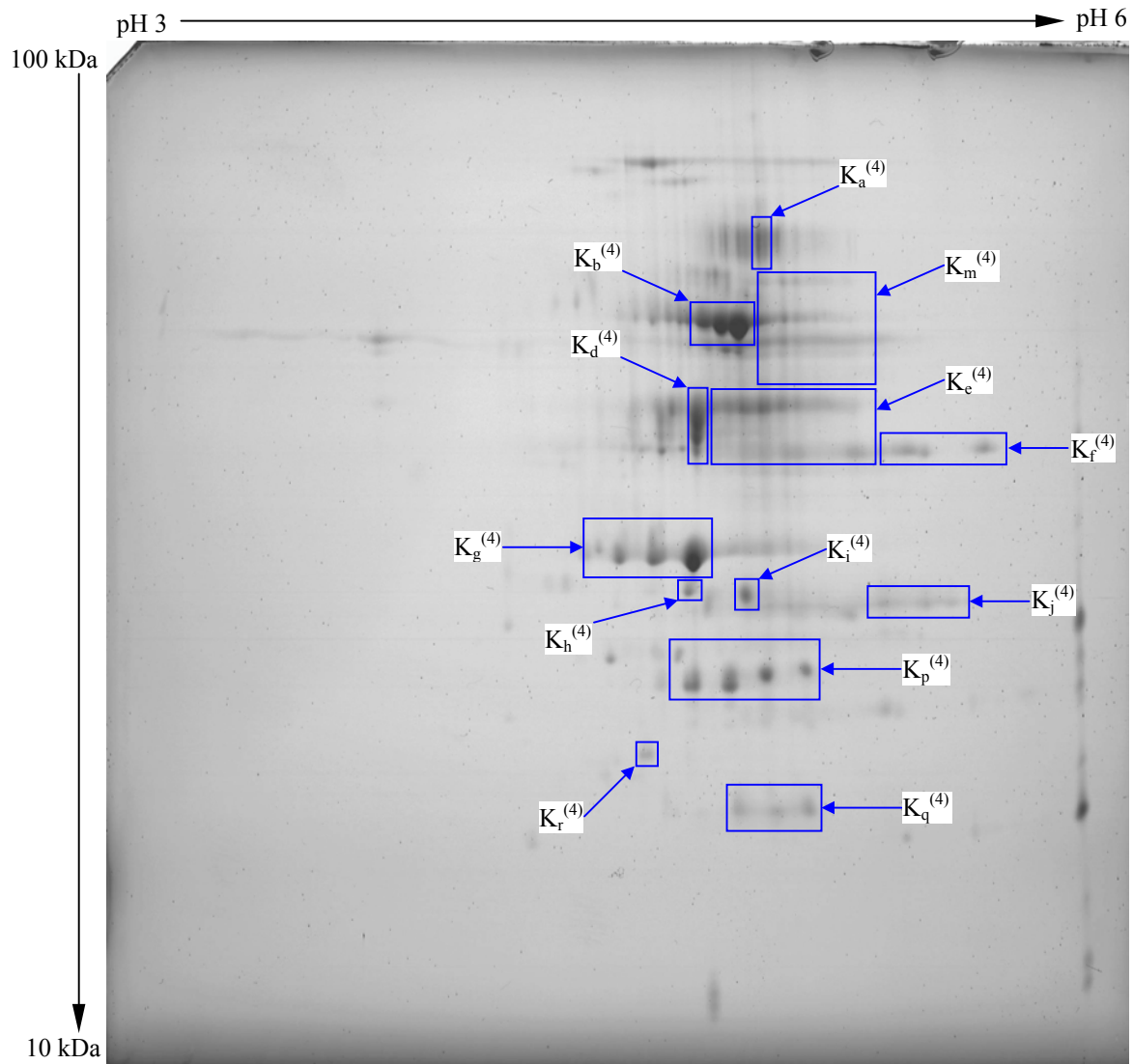


Abb. 4.25: 2D-Elektropherogramm extrazellulären Gesamtproteins von *P. sapidus* auf Erdnußschalen, 4. Kulturtag. Die blau markierten Bereiche $K_a^{(4)}$ bis $K_r^{(4)}$ entsprechen den Bereichen R_a bis R_r in Abb. 4.23. Die Zahl in Klammern bezeichnet den Kulturtag.

Der Bereich $K_m^{(2)}$ zeigte an Kulturtag 2 viele Proteinspots hoher Intensität, welche in dieser Form im weiteren Kultivierungsverlauf nicht wieder auftraten. Andere *Spots* aus diesem Bereich besaßen hohe Intensität an Kulturtag 6 und nur noch geringe Intensität an Kulturtag 8. Die Bereiche K_p , K_q und K_r traten vom vierten bis zum achten Kulturtag auf und erreichten an Tag 6 ein Maximum an Intensität. Die Bereiche K_n und K_o waren an allen Kulturtagen bis auf Tag 4 sichtbar. An Kulturtag 6 waren noch zwei weitere *Spots* in Bereich K_o zu finden; Bereich K_n zeigte keine klar erkennbaren *Spots* über den gesamten Kulturverlauf.

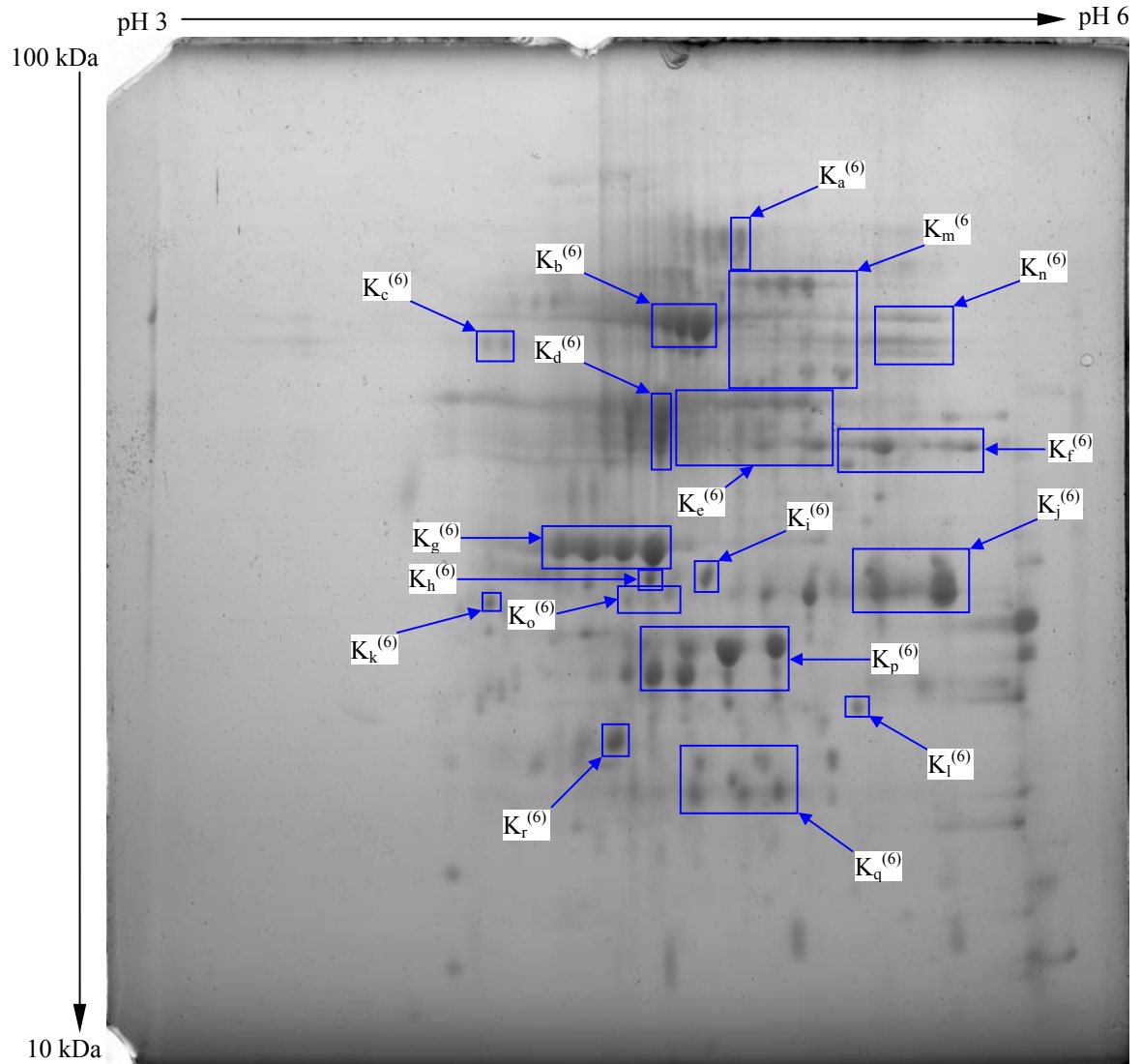


Abb. 4.26: 2D-Elektropherogramm extrazellulären Gesamtproteins von *P. sapidus* auf Erdnußschalen, 6. Kulturtag. Die blau markierten Bereiche K_a bis K_r entsprechen den Bereichen R_a bis R_r in Abb. 4.23. Die Zahl in Klammern bezeichnet den Kulturtag.

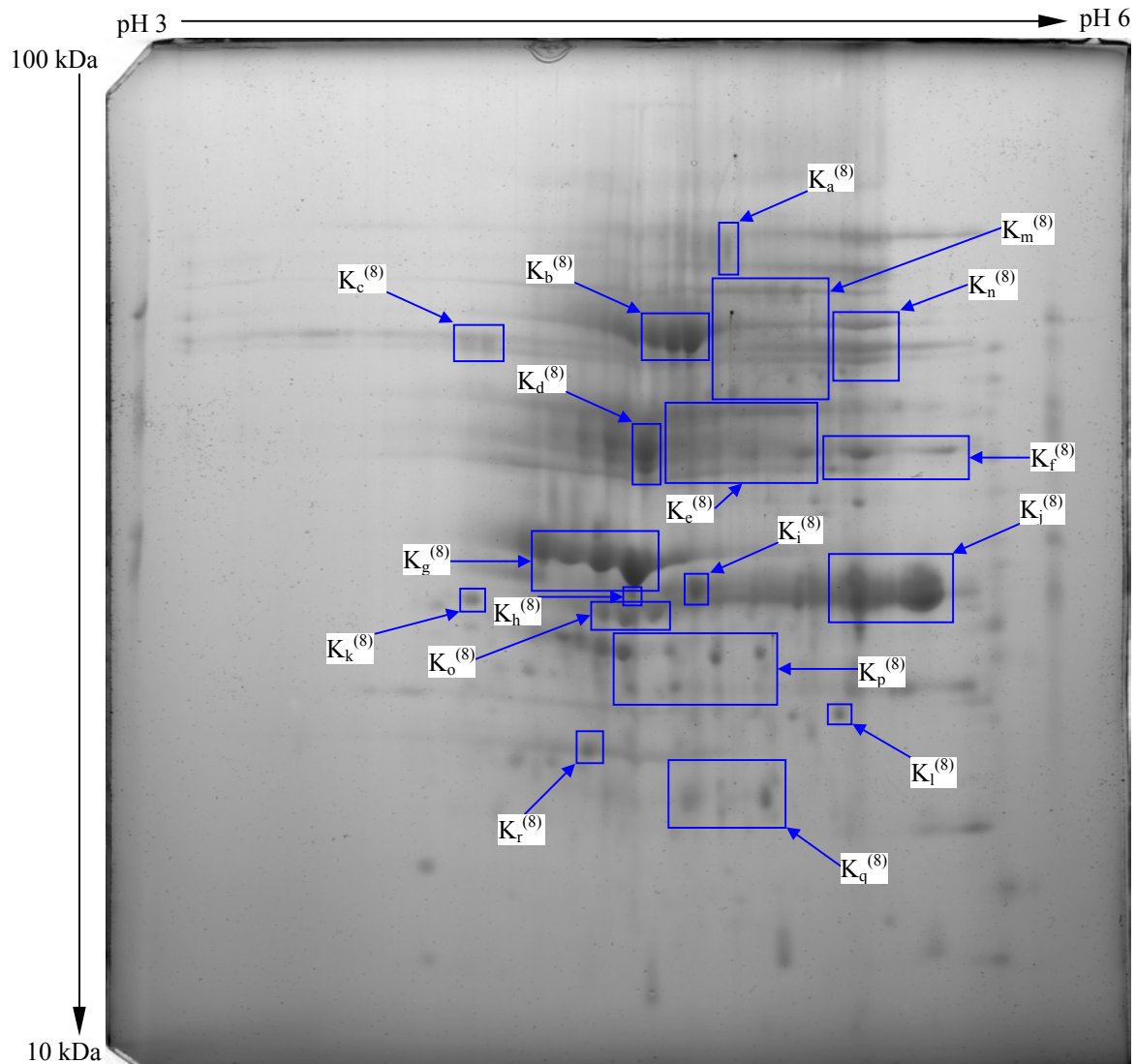


Abb. 4.27: 2D-Elektropherogramm extrazellulären Gesamtproteins von *P. sapidus* auf Erdnußschalen, 8. Kulturtag. Die blau markierten Bereiche K_a bis K_r entsprechen den Bereichen R_a bis R_r in Abb. 4.23. Die Zahl in Klammern bezeichnet den Kulturtag.

4.6.1 Expressionsmuster bei induzierter und nicht-induzierter Kultivierung von *Pleurotus sapidus*

Sowohl bei der Kultivierung auf Erdnußschalen als auch bei der Kultivierung auf Glaswolle wurde der siebte Kulturtag zur detaillierten Analyse des extrazellulären Gesamtproteins ausgewählt.

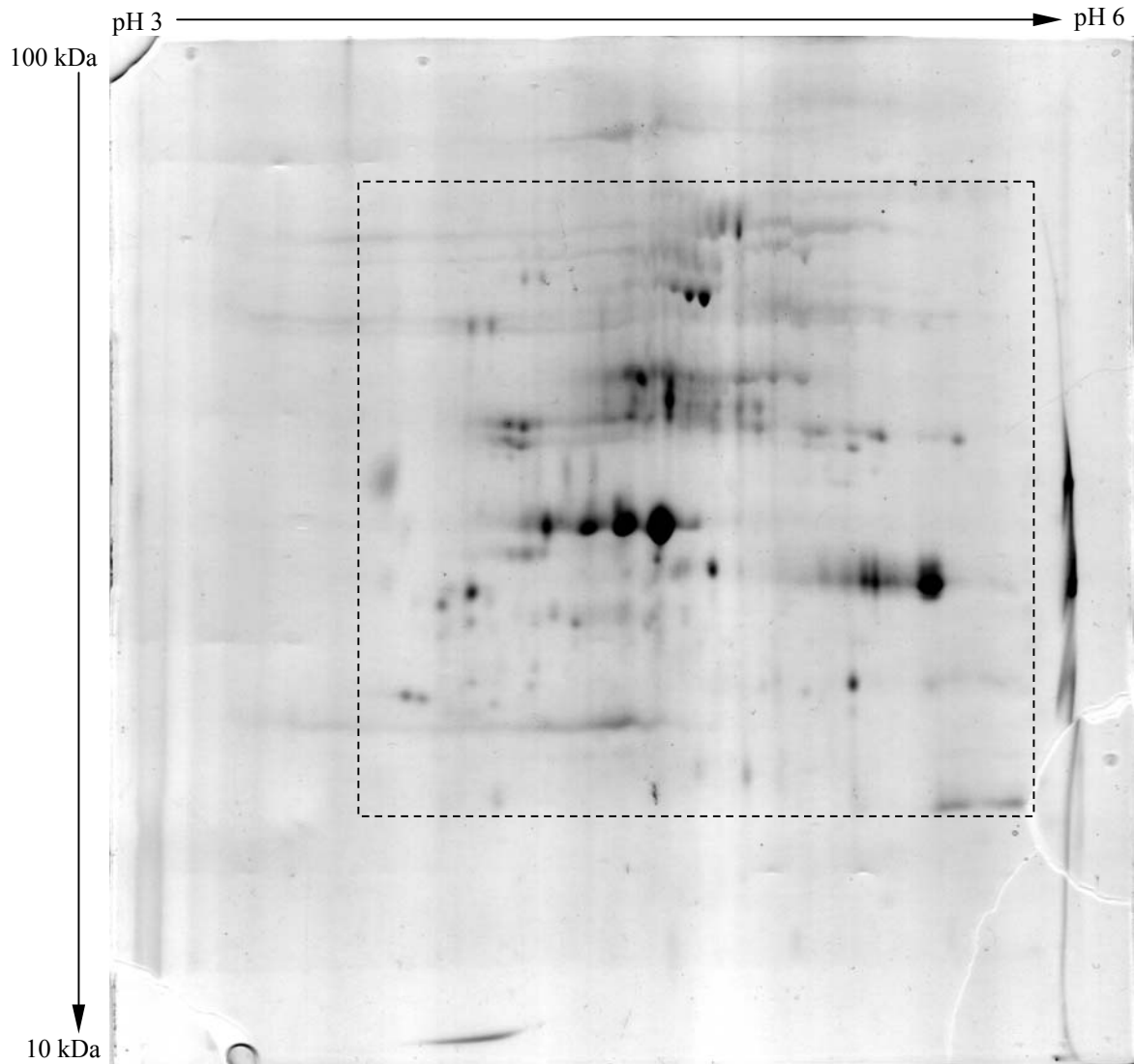


Abb. 4.28: 2D-Elektropherogramm extrazellulären Gesamtproteins von *P. sapidus* auf Erdnußschalen, 7. Kulturtage. Der eingerahmte Bereich ist in Abb. 4.30 vergrößert dargestellt.

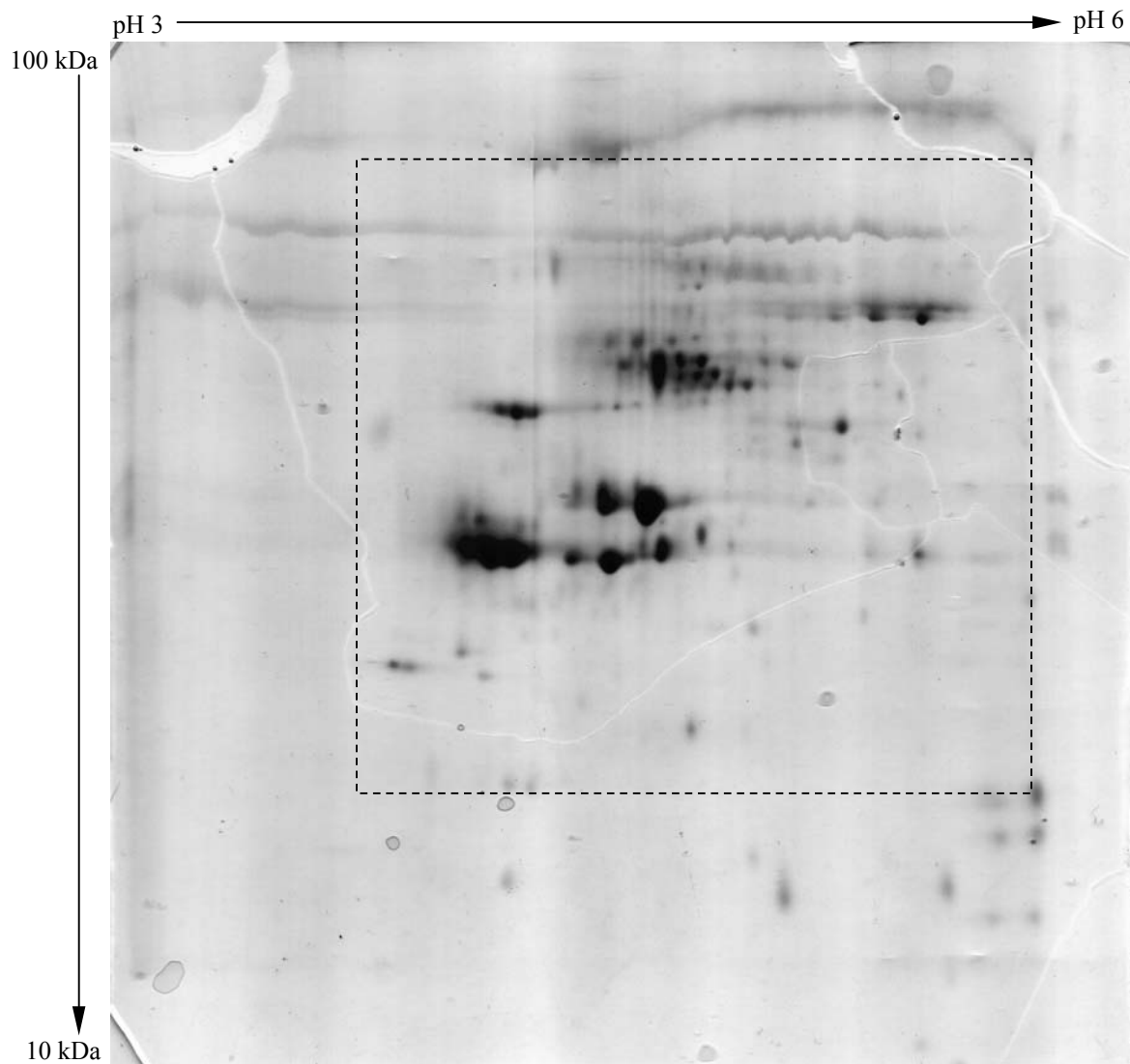


Abb. 4.29: 2D-Elektropherogramm extrazellulären Gesamtproteins von *P. sapidus* auf Glaswolke, 7. Kulturtag. Der eingerahmte Bereich ist in Abb. 4.30 vergrößert dargestellt.

Die überwiegende Anzahl der Proteine war im pI-Bereich 4,0 bis 5,0 zu finden und in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 30 bis 60 kDa lokalisiert.

In Abb. 4.30 sind diejenigen Proteinspots markiert, die ausschließlich entweder bei induzierter Kultivierung oder bei nicht induzierter Kultivierung auftraten. Bei induzierter Kultivierung von *P. sapidus* traten vorwiegend *Spots* mit geringer Intensität neu auf, die sich über einen pI-Bereich von ca. 3,9 bis 5,3 und über einen Molekulargewichtsbereich von ca. 20 bis 70 kDa verteilten. Die neu auftretenden *Spots* bei nicht induzierter Kultivierung waren wesentlich intensiver, traten jedoch nur in einem schmalen pI-Bereich von ca. 4,0 bis 4,6 auf.

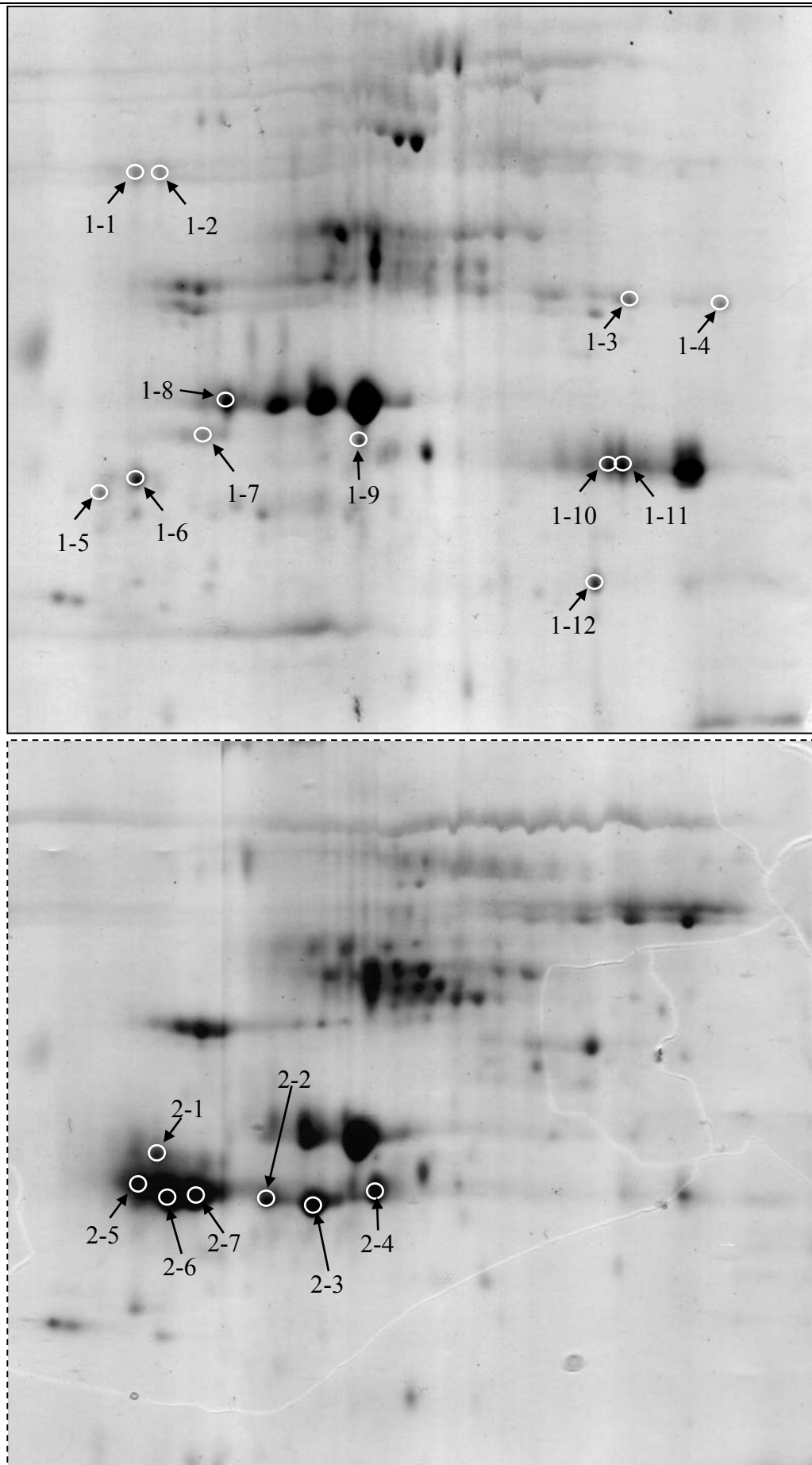


Abb. 4.30: Vergrößerte Bildausschnitte von Abb. 4.28 (oben; induziert) und Abb. 4.29 (unten, nicht induziert). Die Kreise kennzeichnen ausgewählte Proteinspots, die ausschließlich bei induzierter bzw. nicht induzierter Kultivierung auftraten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen wurden.

Die markierten *Spots* wurden, wie in Kapitel 3.4.1 angegeben, aufgearbeitet. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig. Hierzu wurden die Proteine mittels Trypsin im Gel geschnitten und die resultierenden Peptide nach Standardprotokollen extrahiert und gereinigt.

4.7 Proteinidentifizierung

Die hohe Reproduzierbarkeit der zweidimensionalen Elektrophorese unter standardisierten Bedingungen erlaubte es, definierte Proteinspots (Abb. 4.30) aus den Gelen auszuschneiden und diese nach enzymatischer Hydrolyse durch Trypsin mittels ESI-MS-MS partiell *de novo* zu sequenzieren. Es wurden die in den Abbildungen 4.30 bis 4.32 markierten Proteinspots analysiert.

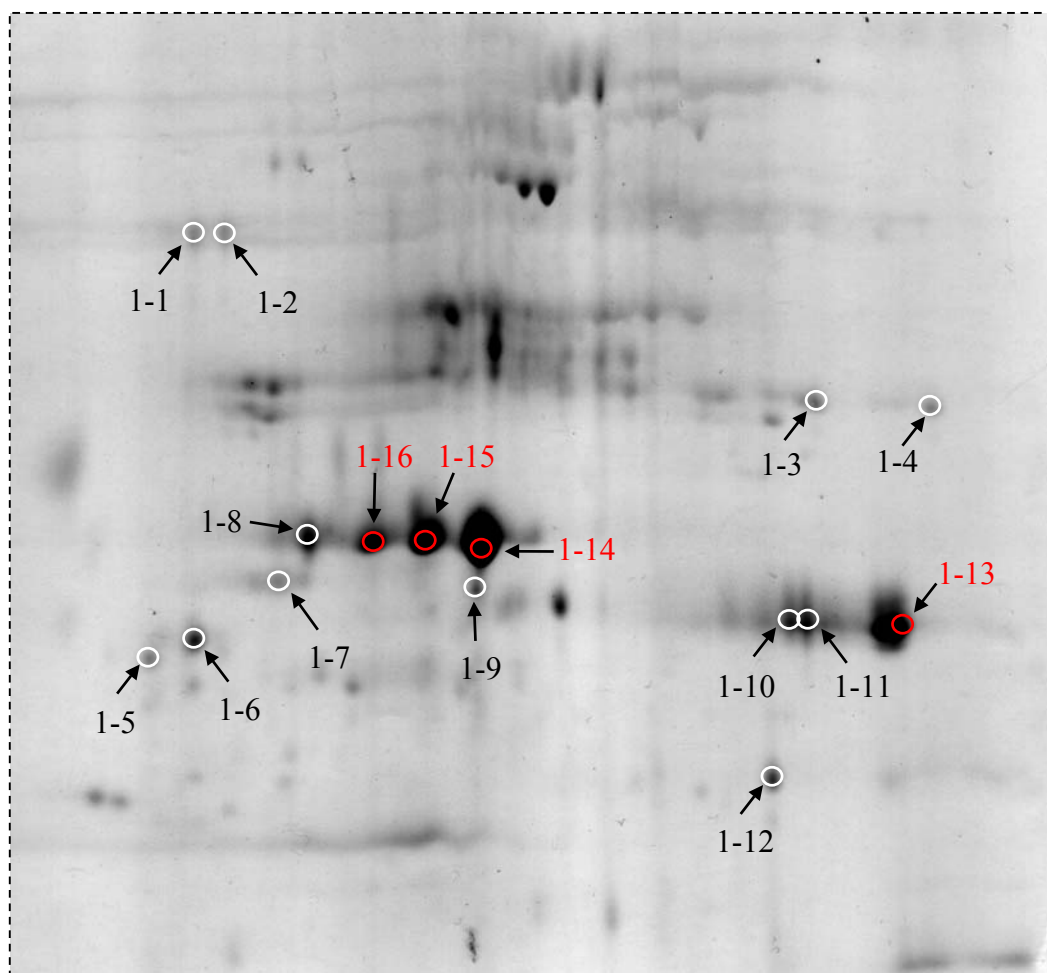


Abb. 4.31: Mittels ESI-MS/MS analysierte Proteinspots von *P. sapidus* auf Erdnußschalen (vergrößerter Gelausschnitt). Die rot markierten Spots 1-13 bis 1-16 wurden zusätzlich analysiert.

Um für die massenspektrometrische Sequenzierung ausreichende Proteinkonzentrationen zu gewährleisten, wurden jeweils gleiche absolute Proteinmengen der zweidimensionalen elektrophoretischen Trennung unterworfen. Dabei wurden entweder 300 µg Gesamtprotein

oder zur Analyse weniger intensiver Proteinspots 1 mg Gesamtprotein für die Trennung eingesetzt.

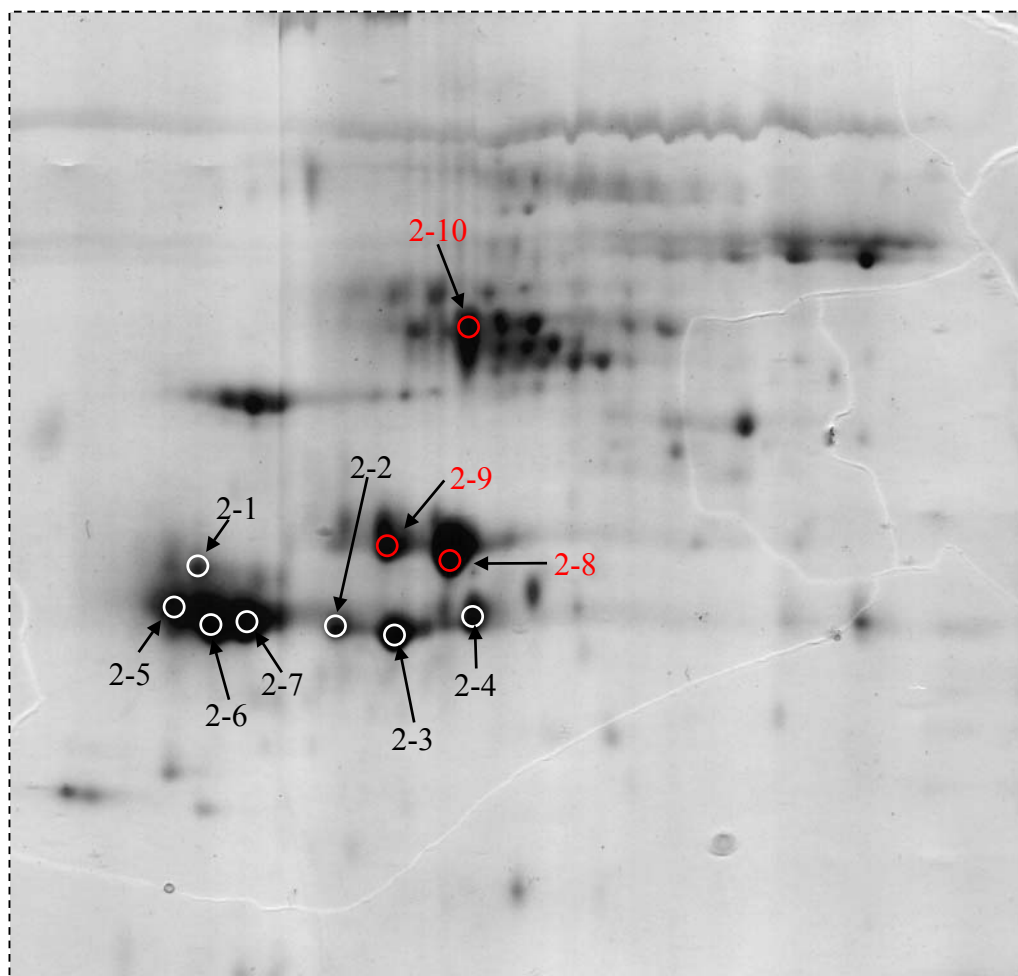


Abb. 4.32: Mittels ESI-MS/MS analysierte Proteinspots von *P. sapidus* auf Glaswolle (vergrößerter Gelausschnitt). Die rot markierten Spots 2-8 bis 2-10 wurden zusätzlich analysiert.

Eine Unterscheidung der isomeren Aminosäuren Leucin und Isoleucin war mittels ESI-MS-MS nicht möglich. Aus diesem Grund steht der Einbuchstaben-Code L jeweils stellvertretend für Leucin oder Isoleucin.

Homologievergleiche wurden mit dem Programm FASTA 3 durchgeführt [PEARSON & LIPMAN, 1988] (Tabelle 4.4). Angegeben ist jeweils ein charakteristisches Vergleichsprotein mit seiner Referenznummer (*accession number*). Ein Maß für die Ähnlichkeit der jeweiligen Peptidsequenz mit dem Vergleichsprotein stellt der "Erwartungswert" E dar. Werte kleiner 0,01 kennzeichnen hochsignifikante Homologien, während Werte kleiner 10 wahrscheinliche Verwandtschaften darstellen.

Tabelle 4.4: Mittels ESI-MS/MS ermittelte Aminosäuresequenzen (Einbuchstabencode) und Quasi-Molekülen MH^+ der bei der Kultivierung von *P. sapidus* auf Erdnußschalen bzw. Glaswolle sekretierten Proteine. Die Zuordnung der Proteine erfolgte wie in den Abbildungen 4.30/4.31/4.32 (mod. nach ZORN, 2003c).

Protein	Aminosäuresequenz	MH^+	Homologie zu	E
1-1	DLPFLQQL...R FGEPSTFLDPLALP...R	1600,0 2134,2	Methioninsynthase; Q55786	7,8
1-2	...LVGYAALDQSTVSR VPSWSTNLLDQYLR LSGCDPTVK FGEPSTFLDPLALPDTGSR DLPFLQQLGVNTVR TQYNQASGPNSPAR	975,5 2134,2 1600,0 1490,7	Enolase; Q49059 Hypothetisches Hefeprotein; Q06135	1,7 0,28
1-3	LVNDFTVQAPSGTSK	2023,0	Collagenase; O24788	2,2
1-4	LSNTDGWNLYR QVVYNNLHLDAR	1338,6 1445,1	Exopolygalacturonase; Q00293 Hypothetische Metallprotease; Q8YVK0	16 6,2
1-5	VSFWSLNFDLLK ...ATNTAGFDPTDATALLDHD... ...YVFNGDASNPASVHL...	1468,6 3558,8 2425,1	Thermostabile Carboxypeptidase; AAP08545	8,7
1-6 Glyko-protein	...ATNTAGFDPTDATALLD... WWLQADVNR FAGANSCTLWR ADMWSLNMDDLK	3558,7 1187,5 1281,4 1436,3		
1-7	DFFGFLSNLVK MFAGNLPNLR	1132,6		
1-8	AASPLGLLPEPFDTVTDILAR* ...LFSSGDSGV...R STCEWQS FVNNQAK ...AFPGVGP... ...DPATGLGTPDFAK	2196,7 1829,1 1683,0 1603,8	Manganperoxidase; Q12332 Manganperoxidase; O74179	$4,1 \times 10^{-5}$ $1,7 \times 10^{-4}$

Protein	Aminosäuresequenz	MH ⁺	Homologie zu	E
1-9	Analyse lieferte kein Ergebnis.			
1-10	GTDLADFATPADGQSGR	3173,7	Sekretierte Metallprotease; Q8NIE3	0,11
1-11	NNADFATPAD...R ...ADEALQPD...	2347,6	Sekretierte Metallprotease; Q8NIH1	1,8
1-12	Analyse lieferte kein Ergebnis.			
1-13	THPYSTSAT... TNAFYLVNWHGQNYK WWLQADVNRFAQNSCTLWR ...LMDALALQPCNPTLPTAR	1543,4 1854,5 2450,9 3520,7	Extrazelluläre Metallprotease; P46075	0,15
1-14 Glyko- protein	LGLAGYLEEFGNR QWDPATGLGTPDFAK ALPPASCATTVTPACK LFSSGDSGVGQTCR ALSVGGTSASCPTVAGLVALLNDVR	1438,5 1603,6 1757,7 1828,6 2428,2	Ähnlich 1.15, 1.16, 2.8 und 2.9 Dipeptidylaminopeptidase; Q95UC5	0,039
1-15 Glyko- protein	QWDPATGLGTPDFAK PPASCATTVTPACK AYPDLSAQANRFEVFNVR	1603,7 1757,9 2097,1	Tripeptidylpeptidase A; BAC56232 Cysteinproteinase; AAO23117	0,01 1,2
1-16 Glyko- protein	...TGFNDLVTGSNPGCGTDGFFAR ...GSTLLFSSGDSGV...GR ...ATNTAGFDPTDATALLDHD...	4271,2 2372,0	Aorsin (Serinprotease); Q8NK92 Tripeptidylpeptidase; O14773	0,067 0,28
2-1	ELPSPQLP...R TFSTGVGVDPVVQNYR	1584,8	Ähnlich 2.2	
2-2	...ELPSPQLWD... TWELPSPQLSVDGR; QFLTFTSTGVGVDPVVQNYR	2258,3 1584,7 2127,2		

Protein	Aminosäuresequenz	MH ⁺	Homologie zu	E
2-3	QALQLLQLDK ...ELPSPQLSVDGR NTLFETTSGNFGTDLLK NSLPLLSNLEFGHSSFLR PPVGQTSEDLAANLLDVHNQR	1169,5 1584,8 1857,9 2031,1 2486,4	Triacylglycerollipase; Q9KX30 Metallabhängige Hydrolase; Q8UCT8	14 15
2-4 Glyko- protein	...EEEAACCVLFPLD...		Ähnlich 2.6 Manganperoxidase; Q12332	2,1
2-5 Glyko- protein			Ähnlich 2.6	
2-6 Glyko- protein	LQSDHLLAR FALLGQDQSK LFPGTPNNQGEVQSPLQGELR HLVPEPFDSVDTLAR	1052,6 2281,4 2597,3	Polyvalente Peroxidase; Q8J1S4 Manganperoxidase; Q9UVY8 Polyvalente Peroxidase; Q8J1S4	0,33 3,7×10 ⁻⁴ 3,3×10 ⁻⁴
2-7 Glyko- protein	LFPGTPNNKGEVQSPLQGELR	2282,2	Ähnlich 2.6 Polyvalente Peroxidase; Q9UR19	1,6×10 ⁻⁴
2-8 Glyko- protein	QWDPATGLGTPDFAK AYPDLSAQLNNFEVFNVR	1603,7 2097,1	Ähnlich 1.14 Tripeptidylpeptidase A; BAC56232 (Peptid ebenfalls vorhanden in 1.14 und ähnlich in 1.15)	0,01
2-9 Glyko- protein	...LNQLLPASR	3106,4	ähnlich 2.8	
2-10	EPFLTQLQPFLNR	1945,0	potentielle Oxidoreduktase; Q8H4J8	4,9

*: Bei Peptid 1-8 erlaubten MALDI-MS-MS-Analysen im Hochenergiefragmentierungsmodus eine exakte Zuordnung der IL-Sequenz.

4.8 Konstruktion einer cDNA-Bibliothek von *P. sapidus*

Zur molekularbiologischen Charakterisierung der zu den ermittelten Aminosäuresequenzen gehörenden Proteine wurde eine cDNA-Bibliothek konstruiert (Vektor λ TriplEx2, *SMART cDNA Library Construction Kit*, Clontech). Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden Mycelpellets aus einer Kultivierung von *P. sapidus* auf Erdnußschalen von Kulturtag 7 steril entnommen. Nach Zellaufschluss (Mörsern der Mycelpellets unter flüssigem Stickstoff) erfolgte die Adsorption der Gesamt-RNA an eine modifizierte Kieselgelmembran (*RNeasy*, QIAGEN). Die Integrität und Größenverteilung der isolierten RNA wurde auf einem denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gel überprüft (Abb. 4.33). Deutlich zu erkennen sind zwei Banden, welche der 18S bzw. 26S ribosomalen RNA zuzuordnen sind.

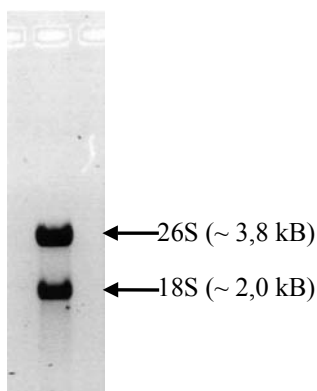


Abb. 4.33: Denaturierendes Formaldehyd-Agarose-Gel der Gesamt-RNA aus *P. sapidus*; die Anfärbung erfolgte mit Ethidiumbromid (inverse Darstellung).

Das Funktionsprinzip des verwendeten cDNA-Synthese-Protokolls faßt Abbildung 4.34 zusammen:

Durch eine reverse Transkriptase wird polyadenylierte mRNA zunächst unter Einsatz eines modifizierten Oligo(dT)-Primers zum cDNA-Erststrang umgeschrieben. Infolge der terminalen Transferaseaktivität des Enzyms werden einige zusätzliche Nukleotide (hauptsächlich Desoxycytidin) an das 3'-Ende des komplementären cDNA-Stranges angefügt. Ein zweites im Reaktionsansatz vorhandenes Oligonukleotid, welches eine Oligo(dG)-Sequenz am 3'-Ende besitzt, hybridisiert an diese Oligo(dC)-Sequenz und liefert dadurch eine verlängerte Matrize, die ebenfalls durch die reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wird (*template switching*).

Es resultiert eine einzelsträngige cDNA, die das komplette 5'-Ende der mRNA sowie die zum (dG)-Oligonukleotid komplementäre Sequenz enthält, welche bei der anschließenden *long distance* PCR-Amplifikation (Abb. 4.35) als universelle Primer-Bindungsstelle dient.

Dadurch ist gewährleistet, daß ausschließlich komplett transkribierte cDNA-Stränge amplifiziert werden.

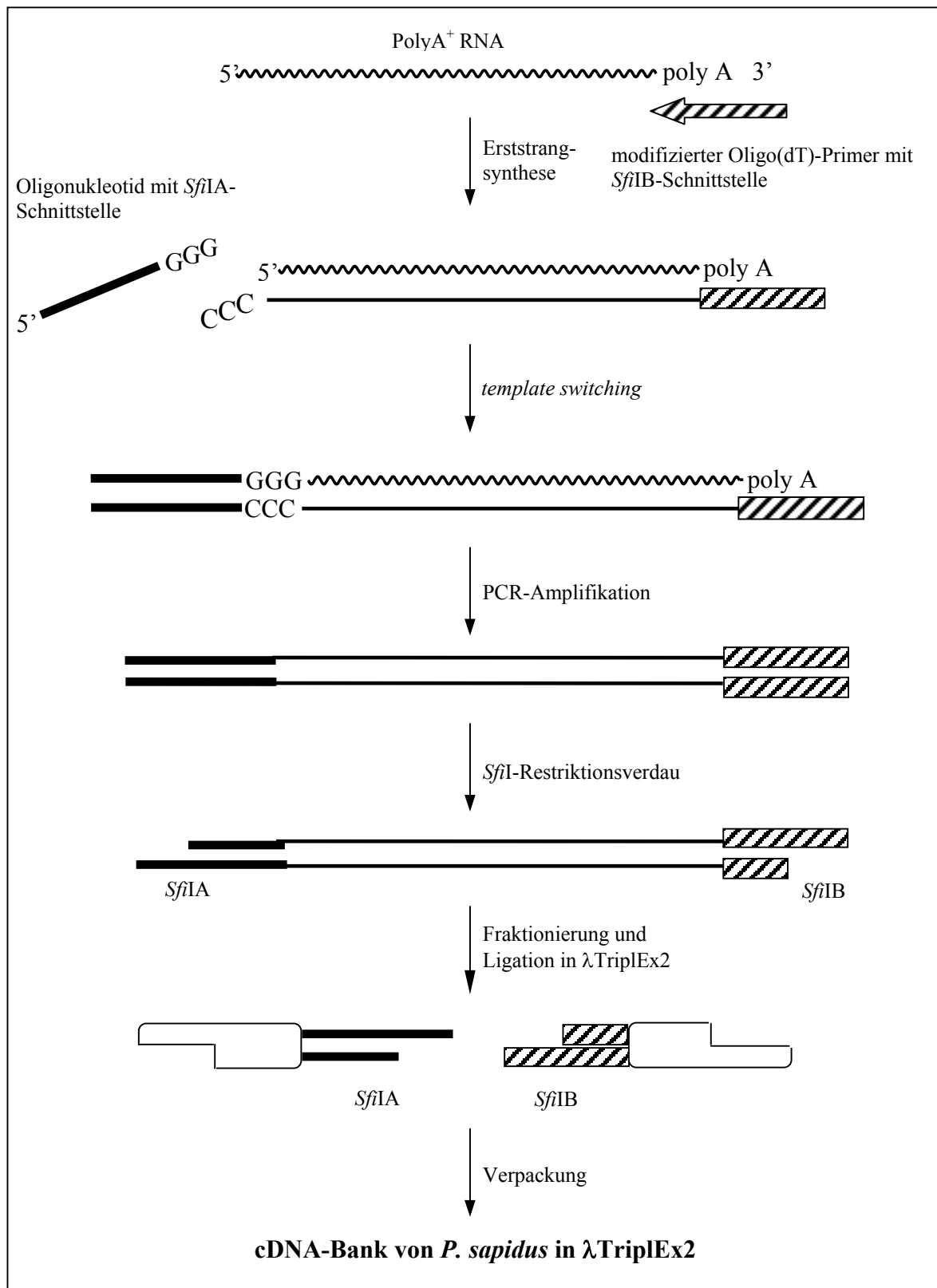


Abb. 4.34: Prinzip der Konstruktion einer cDNA-Bank von *P. sapidus* im Vektor λTriplEx2 (ZORN, 2003c; modifiziert nach: *SMART cDNA Library Construction Kit*, Clontech)

Bei unvollständig revers transkribierten mRNAs fehlt die terminale Oligo(dC)-Sequenz und damit auch die Hybridisierungsstelle für den 5'-PCR-Primer.

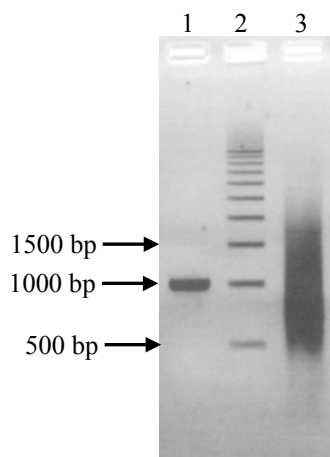


Abb. 4.35: DNA-Agarosegel-Elektropherogramm; Amplifikation der *P. sapidus*-cDNA durch *long distance* PCR (22 Zyklen). Spur 1: 100 ng 1000 bp-Größenstandard; Spur 2: 500 bp-Leiter; Spur 3: amplifizierte *P. sapidus*-cDNA (invertierte Darstellung).

Im Anschluß an die PCR wird die DNA-Polymerase durch Behandlung mit Proteinase K inaktiviert. Die amplifizierte DNA wird mit der Restriktionsendonuklease *Sfi* I (*Streptomyces fimbriatus*) asymmetrisch gespalten. Nach Größenfraktionierung der entstandenen Fragmente erfolgt die Ligation in den Phagen-Vektor λ TriplEx2, der ebenfalls die *Sfi* I-Schnittstellen enthält. Die Verpackung des Insertionsvektors in seine Proteinhülle wurde mit *Gigapack III Gold Packaging Extract* (Stratagene) durchgeführt.

Drei Ligrationsreaktionen mit 0,5 μ L, 1 μ L und 1,5 μ L restringierter und gereinigter cDNA wurden durchgeführt, verpackt und der Gehalt an unabhängigen Klonen überprüft. Die drei Ansätze wurden anschließend vereint und amplifiziert. Der Titer der verpackten *P. sapidus* cDNA-Bank betrug $1,7 \times 10^6$ pfu mL⁻¹ vor und $1,0 \times 10^{10}$ pfu mL⁻¹ nach der Amplifikation (Anteil der rekombinanten Phagen > 95 %).

4.8.1 Konstruktion von Primerpaaren für die PCR

FASTA-Datenbankrecherchen [PEARSON & LIPMAN, 1988] ergaben für die durch ESI-MS/MS ermittelten Aminosäuresequenzen signifikante Homologien zu zahlreichen Proteinen aus verschiedenen Basidiomyceten (Tabelle 4.4).

Zur Konstruktion von Primern für die PCR wurden ausschließlich Vergleichsproteine mit hochsignifikanten Homologien, d.h. mit Erwartungswerten $\leq 0,01$, herangezogen. Unter Berücksichtigung der *codon usage* von *Pleurotus ostreatus* (Abb. 4.36) wurden die ermittelten Peptidsequenzen in die entsprechenden Basentriplets rückübersetzt und mit den

cDNA-Sequenzen der homologen Proteine verglichen. Mit dem Programm Primer 3 [ROZEN & SKALETSKY, 2000] wurden paarweise Oligonukleotide konstruiert, die an die homologe Sequenzregion der cDNA des Vergleichsproteins binden.

Tabelle 4.5: Mit Primer 3 erstellte PCR-Primer; degenerierte Nucleotidpositionen sind in Klammern angegeben, I = Desoxyinosin. Die Protein-Nr. entspricht der Bezeichnung der Aminosäuresequenzen in Tab. 4.4.

Bezeichnung	Nucleotidsequenz (5'→3')	Protein-Nr.
<i>λ forward</i>	CGC GCC ATT GTG TTG GTA	-
<i>λ reverse</i>	TGC ATA AGC TTG CTC GAG TCT	-
<i>2.6-3 forward</i>	AC CAG GGT GAA GTT (G/C)A(A/G) TCG	2-6
<i>2.6-3 reverse</i>	AGA GGC GA(C/T) T(G/C)A ACT TCA CC	2-6
<i>1.8-3 forward</i>	TCA CCC (A/C/T)TI GGA TTG (A/C/T)TI CC	1-8
<i>MnP1-8 forward 1</i>	CG GAA CCA TTC GAT ACC ATT	1-8
<i>MnP1-8 reverse 1</i>	T AAC GAA GGA TTG CCA CTC G	1-8
<i>TripepA forward 1</i>	TTC TC(G/C) TC(G/C) GGC GAC TC(G/C) GGC	1-15
<i>TripepA reverse 1</i>	GAA GCC GTC (A/C/G)GT GCC GCA GCC	1-15

Zur Überprüfung der cDNA-Bibliothek diente die Primerkombination „*λ forward/λ reverse*“, mit der unspezifisch alle in die multiple Klonierungsstelle des *λTriplEx2*-Vektors klonierten cDNAs amplifiziert wurden [ZORN, 2003c]. Der beobachtete diffuse Bandenbereich zeigte die durchschnittliche Größenverteilung der cDNA-Moleküle aus *P. sapidus* (Spur 1 in Abb. 4.37). Außerdem wurden für eine genauere Überprüfung Oligonukleotide erstellt, die an eine Konsensussequenz eines Laccasegens binden (Tabelle 4.6). Dazu wurde ein *multiple sequence alignment* verschiedener cDNA-Sequenzen mit CLUSTAL W durchgeführt [HIGGINS *et al.*, 1994] (vgl. Anhang 7.2).

<i>Pleurotus ostreatus</i> [gbpln]: 44 CDS's (12931 codons)											
fields: [triplet] [amino acid] [fraction] [frequency: per thousand] ([number])											
UUU	F	0.17	7.3	(	94)	UCU	S	0.17	12.7	(	164)
UUC	F	0.83	36.0	(	466)	UCC	S	0.22	16.8	(	217)
UUA	L	0.04	3.2	(	42)	UCA	S	0.08	6.4	(	83)
UUG	L	0.20	16.5	(	214)	UCG	S	0.25	19.3	(	250)
CUU	L	0.23	19.3	(	250)	CCU	P	0.31	21.0	(	271)
CUC	L	0.33	27.8	(	360)	CCC	P	0.32	21.3	(	276)
CUA	L	0.03	2.9	(	37)	CCA	P	0.24	16.4	(	212)
CUG	L	0.17	14.4	(	186)	CCG	P	0.13	8.4	(	109)
AUU	I	0.35	21.6	(	279)	ACU	T	0.28	19.4	(	251)
AUC	I	0.60	37.2	(	481)	ACC	T	0.36	25.4	(	328)
AUA	I	0.06	3.6	(	46)	ACA	T	0.13	9.0	(	116)
AUG	M	1.00	16.9	(	218)	ACG	T	0.23	16.5	(	213)
GUU	V	0.28	19.8	(	256)	GCU	A	0.32	30.0	(	388)
GUC	V	0.46	31.9	(	413)	GCC	A	0.34	31.9	(	412)
GUA	V	0.08	5.9	(	76)	GCA	A	0.15	13.9	(	180)
GUG	V	0.18	12.5	(	162)	GCG	A	0.19	18.3	(	236)
UAU	Y	0.40	8.6	(	111)	CAU	H	0.47	11.6	(	150)
UAC	Y	0.60	13.1	(	169)	CAC	H	0.53	13.2	(	171)
UAA	*	0.66	2.2	(	29)	CAA	Q	0.51	17.9	(	232)
UAG	*	0.11	0.4	(	5)	CAG	Q	0.49	17.4	(	225)
UGU	C	0.25	5.9	(	76)	CGU	R	0.23	8.3	(	107)
UGC	C	0.75	17.7	(	229)	CGC	R	0.34	12.5	(	161)
UGA	*	0.23	0.8	(	10)	CGA	R	0.12	4.4	(	57)
UGG	W	1.00	10.3	(	133)	CGG	R	0.08	3.0	(	39)
AAU	N	0.30	15.2	(	196)	AAU	N	0.30	15.2	(	196)
AAC	N	0.70	36.0	(	465)	AAC	N	0.70	36.0	(	465)
AAA	K	0.30	9.4	(	122)	AAA	K	0.30	9.4	(	122)
AAG	K	0.70	21.7	(	281)	AAG	K	0.70	21.7	(	281)
GAU	D	0.40	24.4	(	316)	GAU	D	0.40	24.4	(	316)
GAC	D	0.60	36.0	(	465)	GAC	D	0.60	36.0	(	465)
GAA	E	0.46	17.6	(	228)	GAA	E	0.46	17.6	(	228)
GAG	E	0.54	20.6	(	266)	GAG	E	0.54	20.6	(	266)
AGU	S	0.12	8.9	(	115)	AGU	S	0.12	8.9	(	115)
AGC	S	0.16	12.4	(	160)	AGC	S	0.16	12.4	(	160)
AGA	R	0.10	3.6	(	46)	AGA	R	0.10	3.6	(	46)
AGG	R	0.13	4.9	(	63)	AGG	R	0.13	4.9	(	63)
GGU	G	0.26	20.4	(	264)	GGU	G	0.26	20.4	(	264)
GGC	G	0.38	29.6	(	383)	GGC	G	0.38	29.6	(	383)
GGA	G	0.21	16.5	(	214)	GGA	G	0.21	16.5	(	214)
GGG	G	0.15	12.1	(	157)	GGG	G	0.15	12.1	(	157)
Coding GC 54.37% 1st letter GC 56.14% 2nd letter GC 45.78% 3rd letter GC 61.19%											
Genetic code 1: Standard											

Abb. 4.36: *codon usage* von *P. ostreatus* (nach <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=Pleurotus+ostreatus+%5Bgbpln%5D&aa=1&style=N> (11.02.2004)).

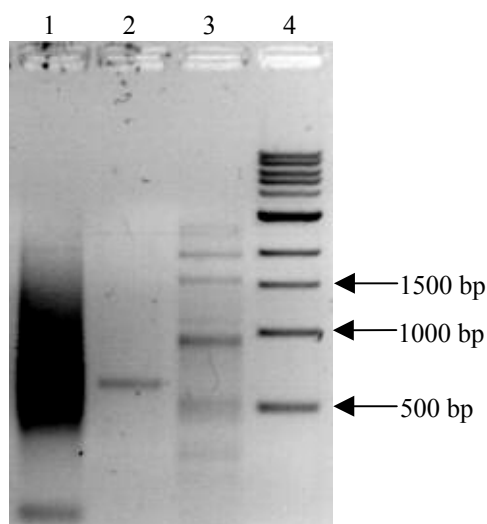


Abb. 4.37: DNA-Agarosegel-Elektropherogramm; Spur 1: PCR-Produkt aus cDNA-Bibliothek von *P. sapidus* mit Primer-Paar λ forward/ λ reverse; Spur 4: Größenstandard (500 bp-Leiter) (invertierte Darstellung).

Tabelle 4.6: Mit Primer 3 erstellte PCR-Primer, die an eine Konsensussequenz eines Laccasegens binden; degenerierte Nucleotidpositionen sind in Klammern angegeben, I = Desoxyinosin. Der Bezug der Oligonukleotide erfolgte über Roth (Karlsruhe).

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')
Lac forward	CA(CT) TGG CA(CT) GG(ACT) (CT)TC TTC
Lac reverse	GC(GT) CG(AG) A(CT)C CAG TAG TTG

Amplifizierte PCR-Fragmente wurden mittels *MinElute Gel Extraction Kit* (QIAGEN) aus dem Agarosegel extrahiert und in den linearisierten Vektor des *TOPO TA Cloning[®] Kit* ligiert. Erhaltene Klone wurden direkt in PCR-Ansätze gegeben und die insertierten DNA-

Bereiche mit Primern, die spezifisch an Bereiche des Vektors binden, amplifiziert (vgl. Tabelle 4.7 u. Abb. 4.39).

Das Prinzip des *TOPO TA Cloning[®] Kits* (Invitrogen) verdeutlicht Abbildung 4.38. Taq-Polymerasen besitzen eine von der Matrize unabhängige terminale Transferaseaktivität, wodurch ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende von PCR-Produkten angehängt wird. Der zum *TOPO TA Cloning[®] Kit* gehörende linearisierte Vektor besitzt ein überhängendes 3'-Desoxythymidine (T). Diese *sticky ends* sorgen dafür, daß PCR-Produkte effizient in den Vektor ligiert werden können.

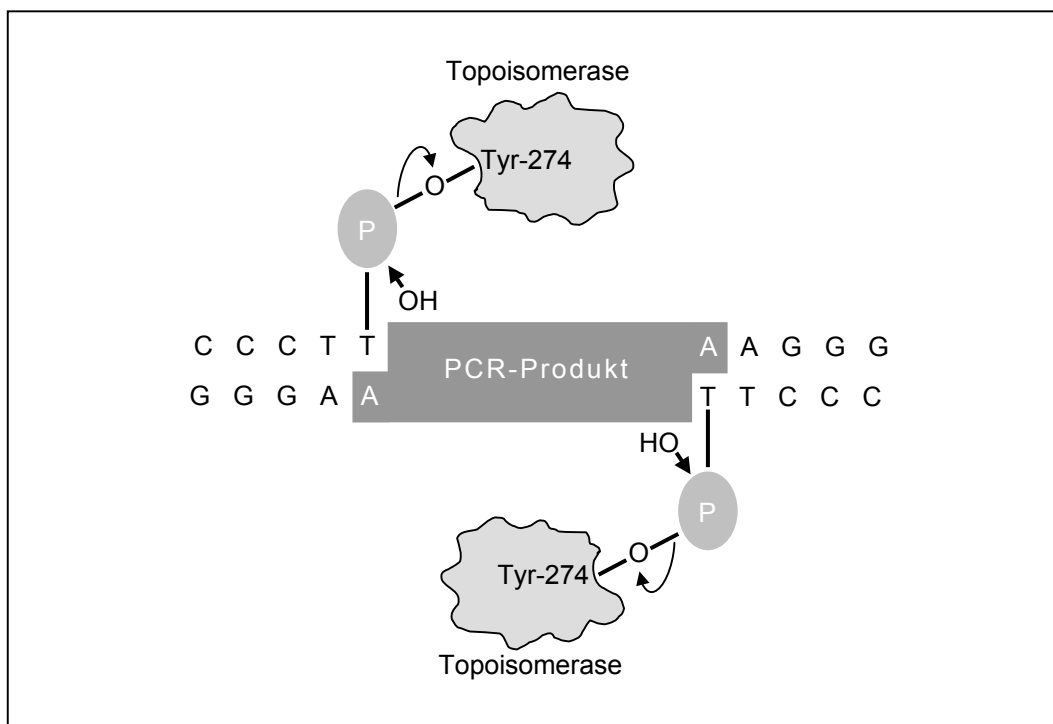


Abb. 4.38: Funktionsprinzip des TOPO TA Cloning[®] Kits (modifiziert nach *TOPO TA Cloning[®] Instruction Manual*, Invitrogen)

Die Topoisomerase I des *Vaccinia*-Virus bindet an spezifischen Stellen doppelsträngiger DNA und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat des einen Stranges nach 5'-CCCTT [SHUMAN, 1991]. Die bei der Spaltung freigesetzte Energie bleibt durch die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des gespaltenen Strangs und einem Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I erhalten.

Im folgenden kann oben genannte Bindung zwischen DNA und Enzym durch einen Angriff der 5'-Hydroxygruppe des gespaltenen Stranges nach Insertion des PCR-Produkts wieder gelöst werden, so daß die Rückreaktion eintritt und die Topoisomerase freigesetzt wird [SHUMAN, 1994].

Tabelle 4.7: PCR-Primer, die spezifisch an die Sequenz des Vektors aus dem *TOPO TA Cloning Kit* binden. Der Bezug der Oligonukleotide erfolgte über Roth (Karlsruhe).

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')
M13 <i>forward</i>	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13 <i>reverse</i>	CAG GAA ACA GCT ATG AC

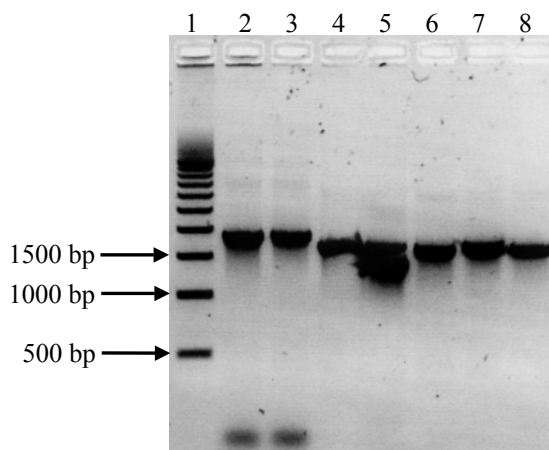


Abb. 4.39: Agarosegel-Elektropherogramm von amplifizierten PCR-Fragmenten aus einem einzelnen *TOPO TA*-Klon (Vektor-Insert: PCR-Amplifikat (λ -DNA (*P. sapidus* cDNA-Bibliothek) mit *lac forward*/ λ *reverse*). Spur 1: Größenstandard (500 bp-Leiter); Spur 2 & 3: Amplifikate mit M13 *forward*/ M13 *reverse*; Spur 4-8: Amplifikate mit *lac forward*/ M13 *reverse*.

Die PCR-Amplifikate (Abb. 4.39; Spur 4-8) wurden sequenziert und ein Homologievergleich der erhaltenen Basensequenz mittels FASTA 3 durchgeführt (vgl. Abb. 4.40 und Tabelle 4.8). Dabei ergaben sich hochsignifikante Homologien zu Laccasen verschiedener Basidiomyceten (Tabelle 4.8).

```
CGACTCCATTGCTCACTCCTCATCCAGCGCGTACTGCTACACCTACA
ACGATGTTTCCAGGCGCACGGATTCTTGCTACGCTTACCTTAGCTCT
TCACCTTTTACATGGGACTCATGCTGCCATCGGGCCCATTGACGACA
TGTACATCGTCAACGAAGACGTCTCTCCTGACGGCTTCACTCGTTTCG
GCGGGTTGTGCTCGCTCTGTGCCCCGCCACAGGTCCGGCGCCTGC
GACGGTATCGAATACTGGCGTCTCGTCCCAGGAAACAGGGCGAAA
ACCTTCAGCTGAACGGTGGCAATTAAGT
```

Abb. 4.40: Für eine Laccase codierende Teilsequenz einer cDNA von *P. sapidus*.

Tabelle 4.8: Mittels FASTA 3 ermittelte Homologien zu einer Laccase-cDNA-Sequenz aus *P. sapidus* (Abb. 4.40).

Referenznr.	Bezeichnung	E
AJ507324	<i>Pleurotus sajor-caju</i> Laccase mRNA (lac1-Gen) [TANG <i>et al.</i> , 2003]	$5,4 \times 10^{-57}$
AY450404	<i>Pleurotus ostreatus</i> Laccase mRNA [ZHANG & MA, 2003]	$1,7 \times 10^{-53}$
AB020026	<i>Pleurotus ostreatus</i> Bilirubinoxidase mRNA [MASUDA-NISHIMURA, 1999]	$1,7 \times 10^{-53}$

4.9 Charakterisierung einer neuen Lipase aus *P. sapidus*

Zur Charakterisierung einer Lipase aus *P. sapidus* wurde ein qualitativer Enzymtest nach NUERO *et al.* (1994) modifiziert [ZORN *et al.*, 2003b]. Der Test basiert auf der Freisetzung von Fettsäuren aus dem Emulgator Tween 80TM in einem Agarosegel in Gegenwart von Ca²⁺-Ionen. Bei vorhandener Lipaseaktivität fielen nach Inkubation über Nacht und anschließender Überschichtung des Agarosegels mit 0,1 M Natronlauge Calcium-Fettsäuresalze als Trübungshof um den Auftragsort der Probe aus. Wurde die Enzymprobe vorher durch Hitze inaktiviert, bildete sich unter gleichen Bedingungen kein Präzipitat aus.

Die Enzyme aus dem Kulturüberstand (3. Kulturtag) wurden zunächst mittels Ultrafiltration konzentriert. Danach erfolgte eine erste Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (IEC). Die aktiven Fraktionen wurden anschließend mittels Größenausschlußchromatographie (GPC) fraktioniert, wobei das Molekulargewicht der Lipase unter nativen Bedingungen zu 101 kDa bestimmt wurde [ZORN *et al.*, 2003b].

Zur Ermittlung des pI wurden die aktiven Fraktionen des GPC-Eluates vereinigt, konzentriert und in mehreren Spuren auf ein IEF-Gel mit immobilisiertem pH-Gradienten aufgetragen. Nach der Fokussierung wurde das Gel geteilt und eine Hälfte mit einem Tween 80TM-haltigen Testagar überschichtet, die zweite einer Silberfärbung zugeführt. Anhand des Vergleiches mit mitfokussierten Referenzproteinen wurde die im Testagar beobachtete Aktivitätsbande einem isoelektrischen Punkt von 5,7 zugeordnet (Abb. 4.41).

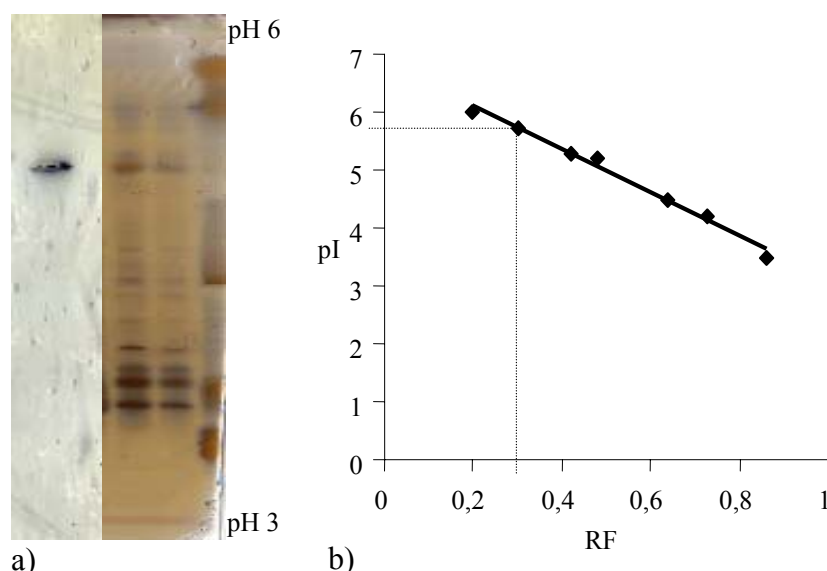


Abb. 4.41: a) IEF-Gel mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3-6); Aktivitätsfärbung (links) und Silberfärbung (rechts); b) Kalibrierfunktion zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes der Lipase [ZORN *et al.*, 2003b]

Zur Bestimmung der Aminosäuresequenz wurde eine zweite Enzymcharge wie oben beschrieben gereinigt, die zweite Gelhälfte jedoch mittels kolloidaler Coomassiefärbung gefärbt.

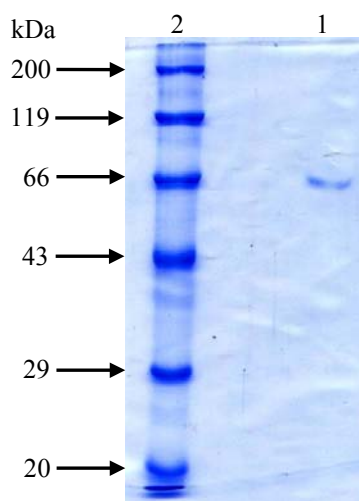


Abb. 4.42: SDS-PA-Gel der isolierten Lipase aus *P. sapidus* (Spur 1) und Molekulargewichtsmarker (Spur 2).

Die aktive Bande wurde aus dem IEF-Gel ausgeschnitten und nach denaturierender Probenvorbereitung direkt in die Auftragskammer eines SDS-Polyacrylamid-Gels überführt. Das Molekulargewicht des Enzyms wurde anhand von Referenzproteinen zu ~55 kDa bestimmt (Abb. 4.42). Unter Berücksichtigung des unter nativen Bedingungen ermittelten Molekulargewichtes von 101 kDa könnte es sich bei der aktiven Form des Enzyms um ein Dimer aus zwei gleich großen Untereinheiten handeln.

Das isolierte Enzym wurde aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Aminosäuresequenzdaten wurden durch ESI-MS/MS *de novo*-Sequenzierung der tryptischen Fragmente generiert.

FASTA-Datenbankrecherchen [PEARSON & LIPMAN, 1988] ergaben für zwei der Fragmente signifikante Homologien zu einer Lipase aus *Geotrichum candidum* (SWALL: Q00884).

5 DISKUSSION

Lignin ist nach Cellulose das weltweit am meisten verbreitete Biopolymer. Die geschätzte Jahresbiosynthese beträgt ca. 2×10^{10} Tonnen [STRASBURGER *et al.*, 2002]. Lignin findet sich in höheren Pflanzen einschließlich Farnen, nicht jedoch in Moosen, Leberblümchen und Pflanzen, die taxonomisch niedriger angesiedelt sind [ADLER, 1977; FENGEL & WEGENER, 1984; DILL & KRAEPELIN, 1988; RICHTER, 1988]. Der Ligningehalt von Holz beträgt in der Regel 25-39 %, in den Mittellamellen kann dessen Anteil sogar bis auf 70 % steigen [ADLER, 1977; RICHTER, 1988]. Durch Erhöhung der Druck- und Zugfestigkeit der Zellwand ermöglichen Lignineinlagerungen einen aufrechten Wuchs. Im Gegensatz zu Cellulose liegt Lignin nie isoliert vor, sondern stets vergesellschaftet mit Cellulose oder Hemicellulose als sogenannte Lignocellulose [ADLER, 1977; DILL & KRAEPELIN, 1988]. Dabei wird das Lignin in die interfibrillären Räume der Zellwand eingelagert.

Beim Lignin handelt es sich um eine Gruppe strukturverwandter Polymere. Das Lignin der Coniferen entsteht überwiegend durch Polymerisation des Coniferylalkohols (4-Hydroxy-3-methoxyzimtalkohol), das der Laubhölzer ist ein Polymer aus Coniferyl- und Sinapylalkohol (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtalkohol). Das Lignin der Gräser enthält noch zusätzlich p-Cumarylalkohol (p-Hydroxyzimtalkohol) [ADLER, 1977; RICHTER, 1988]. Die Polymerisation der Monomere wird durch Peroxidasen katalysiert, die Verknüpfung der entstehenden Radikale ist spontan. Bei allen Strukturvorschlägen (vgl. Kap. 1) ist daher zu beachten, daß es sich nur um Modellstrukturen handeln kann, die eine statistische Verteilung der Monomere darstellen [RICHTER, 1988].

Ligninfreie Cellulose wird von einer Vielzahl von Mikroorganismen verwertet. Bei verholzten Pflanzen ist der Zugriff auf die Cellulose durch das in die Zellwand eingebaute Lignin stark eingeschränkt. Dennoch ist eine ganze Reihe von Mikroorganismen in der Lage, Lignin oder Lignocellulose abzubauen. Zu den potentesten ligninabbauenden Mikroorganismen gehören die Basidiomyceten. Während die sogenannten Weißfäulepilze Lignin meist besser abbauen als Cellulose, greifen Braunfäulepilze bevorzugt Cellulose an [RYPACEK, 1966; KIRK & FARRELL, 1987; ODIER & ARTAUD, 1992; HÄRTIG & LORBEER, 1993; HIGUCHI, 1993;].

Für die Papierindustrie stellt Lignin einen unerwünschten Begleitstoff dar. Da Lignin stark chromophor ist und bereits geringste Ligninkonzentrationen zu einer Braunfärbung von Papier führen muß es bei der Herstellung von Zellstoffen möglichst vollständig entfernt

werden. Dazu wird Holz zunächst meist chemisch aufgeschlossen. Ein wesentlicher Bestandteil der Zellstoffherstellung ist eine mehrstufige Bleiche, bei der heute anstelle von Chlor mit O₂, H₂O₂ oder Ozon oxidiert wird [WICH, 2001]. Hier haben biotechnologische Verfahren mit lignolytischen Enzymen Vorteile in bezug auf Umweltfreundlichkeit und Wirtschaftlichkeit [BALAKSHIN *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 2003].

Lignin beschränkt zudem die Verwertbarkeit des Futters für Wiederkäuer, da sie nicht über die enzymatische Ausstattung verfügen, es zu verdauen [FUKUSHIMA & HATFIELD, 2001].

5.1 Auswahl eines ligninhaltigen Substrats

WEB (2003) untersuchte Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*), Zimt (*Cinnamomum ssp.*), Sesam (*Sesamum indicum*) und Erdnußschalen (*Arachis hypogaea*) auf ihren Ligningehalt und verfolgte den Ligninabbau durch Basidiomyceten mittels mikroskopischer Analyse.

Erdnußschalen stellen eine kostengünstige Substratquelle dar, weil sie in der verarbeitenden Industrie in großen Mengen anfallen. So wurden im Jahr 2002 mehr als 60.000 Tonnen Erdnüsse zu Knabberartikeln verarbeitet [BDSI, 2003]. Die Schalen der „Erbsnuß“, die nicht zu den Nüssen, sondern zu den Hülsenfrüchten (Leguminosen) wie z.B. Erbsen gehört, dienen in der Regel als Brennmaterial, für die Papierherstellung und für die Herstellung von Dämmplatten [STÄHLIN, 1957].

Lediglich die Erdnußfruchtwand (Schale), getrennt von Samenschale und Samen, diene als Substrat. Bei der Charakterisierung von Erdnußschalen bezüglich ihrer Eigenschaften als potentielle Faseradditive wurden ein Ligningehalt von 34,6 % und ein Cellulosegehalt von 39,4 % nachgewiesen [CHILDS & ABAJIAN, 1976]. Nach KERR *et al.* (1986) kann der Ligningehalt je nach Varietät und Erntezeitpunkt zwischen 23 und 32 % schwanken. Im Vergleich zu Rosmarin, Sesam und Zimt wiesen gemahlene Erdnußschalen mit 34,8 % den höchsten Ligningehalt auf [WEB, 2003; nach einer Bestimmungsmethode von LIN & DENCE, 1992].

Die Erdnußschalen wurden gemahlen, um eine möglichst gute Substratbindung zu ermöglichen und optimale Bedingungen für einen intensiven Abbau zu gewährleisten.

5.2 Auswahl von ligninabbauenden Basidiomyceten

Insgesamt 46 Spezies wurden auf einem Nähragar kultiviert, der mit gemahlenden Erdnußschalen als ligninreiches Substrat versetzt worden war. Die Expression und Aktivität vier verschiedener lignolytischer Redox-Systeme wurde im Verlauf der Kultivierung über einen Zeitraum von 28 Tagen durch einfache Farbreaktionen überprüft: (I) Polyphenoloxidasen, (II) Laccasen, (III) Tyrosinasen und (IV) Peroxidasen.

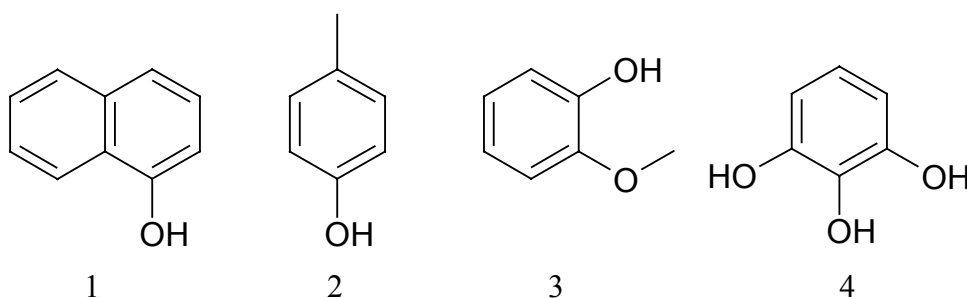


Abb. 5.1: 1: α -Naphthol (1-Hydroxynaphthalin); 2: p-Kresol (4-Methylphenol); 3: Guajakol (2-Methoxyphenol); 4: Pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzen).

Peroxidasen wurden mit einer H_2O_2 /Pyrogallol-Lösung nachgewiesen (Abb. 5.1), wobei Purpurogallin entsteht (Abb. 5.2) [POLIS & SHMUKLER, 1953]. Zu den Peroxidasen gehören die gut untersuchten lignolytischen Enzyme Ligninperoxidase (LiP) und Manganperoxidase (MnP). Ligninperoxidasen katalysieren in Anwesenheit von H_2O_2 Ein-Elektron-Oxidationen von aromatischen Verbindungen und generieren so kationische Radikale. Sie katalysieren daher die Oxidation von Benzylalkoholen, die Spaltung von C-C- und C-O-Bindungen, die Öffnung von aromatischen Ringsystemen und außerdem die Polymerisation von Phenolen [HIGUCHI, 1986; ANDER *et al.*, 1990; ODIER & ARTAUD, 1992].

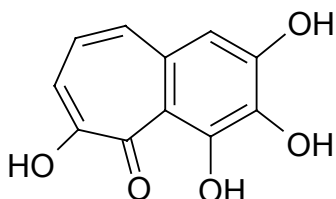


Abb. 5.2: Purpurogallin (2,3,4,6-Tertahydroxy-5H-benzocyclohepten-5-on)

Manganperoxidase ist die am häufigsten in Weißfäulepilzen vorkommende Peroxidase. Manganperoxidasen sind ebenso wie Ligninperoxidasen Häm-Proteine und liegen wie die meisten extrazellulären Enzyme glycosyliert vor. 10 bis 40 Prozent ihrer Molekülmasse sind auf Zuckerreste zurückzuführen [GLUMHOFF *et al.*, 1990]. Manganperoxidasen katalysieren die Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{3+} [GLENN *et al.*, 1986]; ihre scheinbar mangelnde Spezifität wird durch die Reaktionen des starken Oxidationsmittels Mn^{3+} verursacht. In der Regel liegen

die Mn^{3+} -Ionen im Chelatkomplex mit verschiedenen organischen Säuren wie z.B. Oxalat, Malonat, Malat oder Lactat vor [WARIISHI *et al.*, 1992]. Weißfäulepilze produzieren unter natürlichen Bedingungen vor allem Oxal- und Äpfelsäure und sekretieren diese in ihre unmittelbare Umgebung [KUWAHARA *et al.*, 1984; KERSTEN *et al.*, 1990; GALKIN *et al.*, 1998; HOFRICHTER *et al.*, 1999]. Als Redox-Mediatoren oxidieren chelatisierte Mn^{3+} -Ionen eine Vielzahl organischer Verbindungen. Besonders die im Vergleich zu einem Enzym geringe Größe der Mn^{3+} -Spezies ist beim Ligninabbau von Vorteil. Manganperoxidasen sind aber auch in der Lage, die Bildung von H_2O_2 zu katalysieren, wobei z.B. Glutathion als Reduktionsmittel und Sauerstoff als Oxidationsmittel fungieren [HUYNH *et al.*, 1986].

Polyphenoloxidasen wurden mit ethanolischer Guajakharzlösung nachgewiesen. Guajakharz enthält vor allem Guajol und Guajakol (Abb. 5.1). Ether-Extraktion von Guajakharz ergibt „Guajakonsäure“, die bei Oxidation in Furoguajacinblau (Abb. 5.3) übergeht [AUTERHOFF & KUEHL, 1966; KRATOCHVIL *et al.*, 1971]. Zu den Polyphenoloxidasen gehören sowohl Laccasen als auch Tyrosinasen.

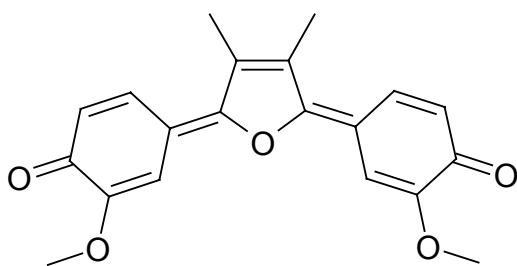


Abb. 5.3: Furoguajacinblau

Tyrosinasen wurden mit ethanolischer p-Kresol-Lösung nachgewiesen (Abb. 5.1) [CHODAT, 1912]. Tyrosinasen sind bifunktionelle, kupferhaltige o-Phenoloxidasen, welche die Oxidation von Monophenolen (Tyrosin, Phenol, p-Kresol), einiger o-Diphenole und Pyrogallol katalysieren [ANDER *et al.*, 1990].

Laccasen wurden mit ethanolischer α -Naphthol-Lösung nachgewiesen (Abb. 5.1) [LYR, 1958]. Laccasen (Benzendiol:Sauerstoff Oxidoreduktasen) sind glycosylierte Polyphenoloxidasen, die pro Molekül vier Kupferionen enthalten. Sie gehören zu der Gruppe von „blauen“ Oxidasen, bei denen die vier Kupferionen auf drei unterschiedliche Bindungsstellen verteilt sind. Die Typ 1-Bindungsstelle ist für die intensiv blaue Farbe der Enzyme verantwortlich, die wahrscheinlich durch eine Ligand-Metall *charge transfer*-Absorption zwischen einem Schwefelatom aus Cystein und Cu^{II} hervorgerufen wird. Die Typ 2-Bindungsstelle absorbiert im kurzwelligeren sichtbaren Bereich, und die Typ 3-

Bindungsstelle umfaßt zwei Cu-Zentren mit einer Absorption bei 330 nm. Es wird davon ausgegangen, daß sämtliche Kupferionen am katalytischen Mechanismus beteiligt sind [REINHAMMAR & MALSTROM, 1981; PALMIERI *et al.*, 1997; SOLOMON *et al.*, 1997]. Laccasen katalysieren Ein-Elektron-Oxidationen einer Vielzahl von organischen und anorganischen Substraten einschließlich Mono-, Di- und Polyphenolen, Methoxyphenolen, aromatischen Aminen und Ascorbat, während Sauerstoff in einer Vier-Elektronen-Übertragung zu Wasser reduziert wird [THURSTON, 1994; EGGERT *et al.*, 1996]. Beim Ligninabbau sind Laccasen für die C_α-Spaltung von phenolischen Arylpropanstrukturen und anderer ligninverwandter Komponenten verantwortlich. [ANDER *et al.*, 1990; KERSTEN *et al.*, 1990; MILSTEIN *et al.*, 1993]. Zusätzlich wird angenommen, daß Laccasen an der Synthese von Dihydroxynaphthalin-Melaninen, dunkel gefärbten Polymeren, die als Pigmente den Organismus vor Lichtstreß schützen, beteiligt sind [HENSON *et al.*, 1999] oder bei der Pilzmorphogenese die Bildung von extrazellulären Pigmenten katalysieren [ZHAO & KWAN, 1999]. Viele Pilze produzieren Laccase in Form von mehreren Isoenzymen [MUNOZ *et al.*, 1997]. Zwei Laccase-Gene wurden z.B. bei *Trametes villosa*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus eryngii* und auch bei *P. ostreatus* identifiziert [PERRY *et al.*, 1993; GIARDINA *et al.*, 1996; YAYER *et al.*, 1996; MUNOZ *et al.*, 1997]. Laccasen finden Anwendung vor allem in der Papierindustrie zur Bleichung von Pulpen, bei der Entfernung von phenolischen Verbindungen in Most und Wein oder zur Zersetzung von Toxinen [BRENNER & BIANCHI, 1994; GIANFREDA *et al.*, 1999; BAMINGER *et al.*, 2001]. Laccasen lassen sich gut immobilisieren und ermöglichen in Verbindung mit einer Sauerstoffelektrode die Bestimmung von Polyphenolen auch in nichtwäßrigen Systemen [NEUJAHN & KJELLE'N, 1979; WANG *et al.*, 1993].

Für eine halbquantitative Abschätzung der Expression lignolytischer Enzyme wurden jeweils vier Testreagenzien (siehe Kap. 3.2.5) im Abstand von sieben Tagen auf das Mycel der Oberflächenkulturen aufgetragen. Parallel wurden Kulturen ohne Zusatz von Erdnußschalen geführt.

Beim Test auf die verschiedenen lignolytischen Redox-Systeme zeigten mehr als 10 % der überprüften Spezies keine der gesuchten Enzymaktivitäten. Weitere 18 Basidiomyceten zeigten nur geringe Aktivitäten.

Dies zeigt, daß für mehr als die Hälfte der untersuchten Organismen Erdnußschalen in Verbindung mit dem glucose- und stickstoffarmen Nährmedium wahrscheinlich ungeeignet sind, lignolytische Enzymaktivitäten zu induzieren. Eine Stickstofflimitierung im Kulturmedium kann für eine erhöhte Produktion von extrazellulären Enzymen verantwortlich sein

[SPADARO *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1994; WU *et al.*, 2001]. Einige Basidiomyceten sind jedoch in der Lage, auch in nährstoffreichen Vollmedien große Mengen an lignolytischen Enzymen in ihre Umgebung zu sekretieren [VASDEV & KUHAD, 1994]. Der Einfluß der Induktion durch verschiedene Substrate und Nährmedienbestandteile variiert jedoch zwischen den einzelnen Spezies [HIGHLEY & MICALES, 1990].

Die Aktivitätsfärbungen gaben auch Aufschluß darüber, an welchem Ort die entsprechenden Enzyme vornehmlich agieren. Bei den untersuchten Organismen wurde die auftretende Färbung in den meisten Fällen direkt am Pilzmycel detektiert. Bei *Cyathus helenae* und *Hericium erinaceus* war die Polyphenoloxidaseaktivität vor allem am Substrat lokalisiert, während eine Färbung des direkt an das Mycel grenzenden Mediums im Fall der Laccase bei *Cyathus pallidus*, *Cyathus striatus*, *Lepista nuda* und *P. sapidus* besonders ausgeprägt war.

Besonders hohe Enzymaktivitäten sowohl mit als auch ohne Erdnußschalen zeigte neben den eßbaren Basidiomyceten *P. sapidus*, *M. scorodonius* und *L. irina* auch der als Weißfäulepilz bekannte Riesenporling (*Meripilus giganteus*) (vgl. Tabelle 4.1).

Während Polyphenoloxidase- und Tyrosinaseaktivität ausschließlich direkt im Bereich des Pilzmycels detektiert wurden, waren Laccase- und Peroxidaseaktivität bis zum 14. Kulturtag auch im umgebenden Medium nachweisbar. Intensive Farbreaktionen unmittelbar an den Fragmenten der Erdnußschalen wurden bei *P. sapidus* beobachtet, weshalb dieser Pilz zur detaillierteren Untersuchung der Bildung extrazellulärer Enzyme und deren Induzierbarkeit durch Erdnußschalen als lignocellulosereiches Substrat ausgewählt wurde.

5.3 Kultivierung von *Pleurotus sapidus* und *Lepista irina*

Um eine Induktion der lignolytischen Aktivität zu erreichen, wurden Stammkulturen von *P. sapidus* und *L. irina* in Oberflächenkulturen mit gemahlenen Erdnußschalen und Lignin inkubiert (Abb. 5.4).

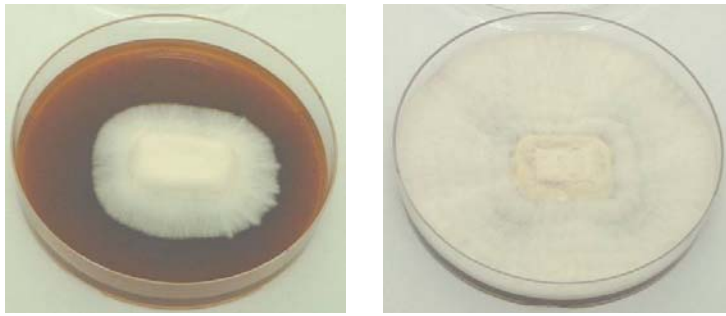


Abb. 5.4: Stammkulturen von *L. irina* (links) und *P. sapidus* (rechts) auf festem Medium mit gemahlenen Erdnußschalen und Lignin (nach einer Inkubationszeit von 7 d) (vgl. 3.2.2.3)

Zur Gewinnung und Charakterisierung extrazellulärer Proteine und Enzyme wurde ein Submerskulturverfahren gewählt, da dieses besonders für ein kontrolliertes Wachstum von Basidiomyceten geeignet ist [ABRAHAM, 1994]. Für eine optimale Anhaftung des Mycels am Substrat wurde nach dem Beimpfen der Erdnußschalen mit Pilzmycel aus einer Vorkultur zunächst für sieben Tage statisch inkubiert, bevor das flüssige Kulturmedium zugesetzt wurde („statisch-dynamische Kultivierung“) (Abb. 5.5).



Abb. 5.5: Submerskultivierung von *P. sapidus* auf Erdnußschalen

Pilze, insbesondere Basidiomyceten, wachsen natürlicherweise auf festen, unbeweglichen Substraten. Diese Tatsache hat großen Einfluß auf die physiologischen Eigenschaften, speziell auf die Enzymproduktion. Kulturen von *P. sapidus* auf Erdnußschalen zeigten im Vergleich zum übrigen Kulturverlauf extrem hohe Laccaseaktivität direkt nach erstmaliger Zugabe von flüssigem Kulturmedium (Abb. 4.2). KALUSKAR *et al.* (1999) haben gezeigt, daß eine auf einem Polyurethanschwamm immobilisierte Kultur von *Agaricus bisporus*, auch bekannt als Zuchtchampignon, eine wesentlich höhere Laccaseproduktion vorwies als eine herkömmliche Submerskultur. Zu ähnlichen Ergebnissen in bezug auf die Produktion von Manganperoxidase kamen ZIEGENHAGEN & HOFRICHTER (2000) bei der Kultivierung des Basidiomyceten

Clitocybula duseinii, immobilisiert auf einem Schwamm aus Cellulose-Mischfaser. HA *et al.* (2001) dagegen zeigten, daß mit auf einem Rundschüttler inkubierten Submerskulturen von *P. ostreatus* gegenüber einer rein statischen Kultivierung höhere lignolytische Enzymaktivitäten erzielt wurden.

Neben den Kulturparametern pH-Wert, Protein- und Glucosegehalt wurde die Laccaseaktivität als Indikator für die Vitalität des Organismus und die Expression lignolytischer Enzyme im Kulturüberstand ermittelt. Submerskultivierungen von *P. sapidus* und *L. irina* zeigten in bezug auf den Verlauf des pH-Wertes ähnliche und typische Verläufe. Durch Produktion organischer Säuren wie z.B. Oxalat, Malonat, Malat oder Lactat sinkt der pH-Wert zunächst ab [WARIISHI *et al.*, 1992] (vgl. Abbildungen 4.5/5.6/4.10/4.11). Infolge zunehmender Autolyse des Organismus ist im weiteren Kulturverlauf ein Anstieg des pH-Wertes zu verzeichnen.

Bei der Submerskultivierung von *P. sapidus* auf Erdnußschalen war eine deutliche Induktion der Laccaseaktivität zu beobachten (Abb. 4.2). Für den starken Abfall der Laccaseaktivität innerhalb der ersten beiden Kulturtage können folgende Faktoren verantwortlich sein:

- Die Induktion der Laccaseproduktion ist besonders hoch bei statischer Inkubation.
- Die Halbwertszeit der Laccase im Kulturüberstand ist sehr kurz, z.B. wegen des Verlustes der enzymatischen Aktivität durch sekretierte Peptidasen.
- Produkthemmung.

Im weiteren Kulturverlauf war infolge der Induktion die Aktivität mehr als fünfmal so hoch, der höhere Proteingehalt im Medium belegte eine erhöhte Sekretion im Vergleich zur nicht induzierten Kultur (Abbildungen 4.2 & 4.3). Auch die Glucoseoxidase muß aufgrund der anfänglich hohen Aktivität von mehr als 200 U L^{-1} einer Induktion unterliegen (Abb. 4.4). Hier war nach Zugabe des Mediums der gleiche Effekt zu beobachten wie bei der Laccaseaktivität. Im weiteren Verlauf der Kultivierung blieb die GOD-Aktivität jedoch auf dem Niveau der nicht induzierten Kultur. Bei Kultivierung auf Erdnußschalen wurde die Glucose wesentlich schneller verbraucht als bei der Kontrollkultur (vgl. Abbildungen 4.5 & 4.6). Dies ist darauf zurückzuführen, daß die hohe Aktivität zu Beginn der Kultivierung für einen höheren Verbrauch von Glucose sorgte. Die GOD-Aktivität blieb auch nach Verbrauch der Glucose im Kulturmedium auf nahezu gleichbleibendem Niveau. Um den lignolytischen Prozeß aufrechtzuerhalten, ist wahrscheinlich ein Mindestmaß an GOD-Aktivität im Medium notwendig. Die Produktion extrazellulärer Glucoseoxidasen ist vor allem von *Aspergillus*

niger-Stämmen und mehreren Vertretern der Gattung *Penicillium* bekannt [FIEDUREK & ILCZUK, 1992; FIEDUREK *et al.*, 1994; KUPLETSKAYA & KURAKOV, 1999; SHISHKO *et al.*, 1999]. Zur Sekretion von Glucoseoxidasen bei Weißfäulepilzen ist jedoch bisher wenig bekannt [GOMEZ-ALARCON *et al.*, 1989].

Bei der Submerskultivierung von *L. irina* blieb die Laccaseaktivität weit unter der von *P. sapidus*. 200 U L⁻¹ wurden nicht überschritten, dennoch konnte ein deutlicher Induktionseffekt durch das Substrat beobachtet werden. Die Laccaseaktivität war bei Kultivierung auf Erdnußschalen durchschnittlich viermal höher (ähnlich wie bei *P. sapidus*) (Abb. 4.7). Bei Kultivierungen von *L. irina* war die Induktion der Laccase- und Glucoseoxidaseaktivität nicht so stark ausgeprägt wie bei *P. sapidus*. Sowohl Laccase als auch GOD erreichten Maxima ihrer Aktivitäten erst im weiteren Kulturverlauf. Die Laccaseaktivität erreichte bei *L. irina* am neunten Kulturtag ein Maximum, während am zehnten Kulturtag eine wesentlich geringere Aktivität zu beobachten war. Zu diesem Zeitpunkt stand dem Organismus Glucose als leicht verfügbare Kohlenstoffquelle nicht mehr zur Verfügung (vgl. Abbildungen 4.7 & 4.10). Die Aktivität der Glucoseoxidase wies bei Kultivierung auf Erdnußschalen ein Maximum am dritten Kulturtag auf (Abb. 4.9). Ebenso war ein zweites, kleineres Maximum der Laccaseaktivität am dritten Kulturtag zu verzeichnen, während der Proteingehalt im Medium zu diesem Zeitpunkt minimal war (vgl. Abbildungen 4.7 & 4.8). Das kann bedeuten, daß zu diesem Zeitpunkt Laccase und Glucoseoxidase vorrangig in das umgebende Medium für eine Nutzbarmachung des Substrats sekretiert wurden. Die Kultur ohne Erdnußschalen verbrauchte die vorhandene Glucose wesentlich schneller, was ein Indiz für die Nutzung des ligninhaltigen Substrats als Kohlenstoff- und Energiequelle bei induzierter Kulturführung ist (Abb. 4.11). Die Induktion von GOD wird bei *L. irina* höchstwahrscheinlich durch Faktoren gesteuert, die aus dem lignolytischen Prozeß herrühren. Der Proteingehalt im Medium verlief bei induzierter und nicht induzierter Kultivierung nahezu parallel. Bei Induktion wurden bis zu doppelt so hohe Proteinmengen ermittelt, was auf die erhöhte Sekretion lignolytischer Enzyme zurückgeführt werden kann.

Ein strukturell verwandtes Enzym zur Glucoseoxidase ist die Cellobiosedehydrogenase (CDH; E.C. 1.1.99.18), die als extrazelluläres Flavocytochrom am Abbau von Lignocellulose teilnimmt und dabei die Oxidation von Cellobiose zu Cellobiono-1,5-lacton katalysiert [DUMONCEAUX *et al.*, 2001; HALLBERG *et al.*, 2003]. Monosaccharide sind für die CDH weniger gut als Substrat geeignet [HENRIKSSON *et al.*, 1998], jedoch ist es möglich, daß bei

der Bestimmung der Glucoseoxidaseaktivität mögliche vorhandene CDH-Aktivität in der Summe mitbestimmt wurde.

In einem modifizierten *fed batch*-Verfahren wurde der Kulturüberstand unter sterilen Bedingungen periodisch vom immobilisierten Pilzmycel getrennt und durch frisches Medium ersetzt. Zwar nahm die Laccaseaktivität nach jedem Wechsel des Kulturmediums wieder stark zu, es war jedoch auch über die gesamte Kultivierungsdauer eine Abnahme der durchschnittlichen Aktivität sowohl bei *P. sapidus* als auch bei *L. irina* zu beobachten (vgl. Abbildungen 4.12 und 4.13). Als limitierend ist hier das Kulturgefäß anzusehen, welches einerseits aufgrund des beständigen Mycelwachstums nicht genügend Platz für die benötigte Menge an Kulturmedium läßt. Andererseits kann bei fortgeschrittenem Wachstum auch die mangelnde Durchmischung während des Schüttelns für unzureichende Sauerstoffzufuhr sorgen und so eine erfolgreiche Enzymproduktion unterbinden. Durch Supplementierung des Mediums mit Cu^{2+} wurden Steigerungen der Laccaseaktivität auf mehr als 500 U L^{-1} nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 57 d erreicht (Abb. 4.14). Eine deutliche Induktion der Laccaseaktivität wie bei Kultivierung auf gemahlenen Erdnußschalen war bei der *fed batch*-Kultivierung, bei der nur unzerkleinerte Erdnußschalen eingesetzt wurden, nicht zu beobachten (vgl. Abbildungen 4.2 & 4.14). Das ist darauf zurückzuführen, daß durch die Vermahlung das Substrat für den Organismus wesentlich leichter zugänglich ist. Unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten konnte die Biotransformation der Erdnußschalen im *fed batch*-Verfahren dadurch um einen Arbeitsschritt verkürzt werden. Ein effektiver Abbau wurde durch Steigerung der Laccaseaktivität mittels Cu^{2+} -Supplementierung dennoch gewährleistet.

Für *Trametes pubescens* wurde kürzlich gezeigt, daß durch Supplementierung des Kulturmediums mit Cu^{2+} die Laccaseproduktion stimuliert und verstärkt wird [GALHAUP & HALTRICH, 2001]. Ebenso wurde für *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora* und *Pleurotus ostreatus* ermittelt, daß durch Cu^{2+} eine Regulation der Laccaseexpression bereits auf Ebene der Transkription stattfindet [COLLINS & DOBSON, 1997; KARAHANIAN *et al.*, 1998; GIARDINA *et al.*, 1999; PALMIERI *et al.*, 2000]. Bei *P. ostreatus* wurde nach Supplementierung des Kulturmediums mit CuSO_4 sowohl eine Aktivitätssteigerung sämtlicher Laccase-Isoenzyme als auch das Auftreten eines neuen Laccase-Isoenzyms beobachtet, dessen katalytische Eigenschaften vergleichbar sind mit bereits aus *P. ostreatus* bekannten Laccase-Isoenzymen. Die strukturellen Eigenschaften des neuen Laccase-Isoenzyms zeigten jedoch große Unterschiede [GIARDINA *et al.*, 1999; PALMIERI *et al.*, 2000].

5.4 Analytik mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese

Für die Erstellung der zweidimensionalen Elektropherogramme wurden die Kulturmedien mittels Ultrafiltration konzentriert. Mehr als ein Drittel der im Medium befindlichen Proteine wies dabei eine Größe von > 10 kDa auf (Tabelle 4.2). Auf die Untersuchung kleinerer Proteine wurde verzichtet, weil bekannte lignolytische Enzyme in der Regel ein Molekulargewicht zwischen 40 kDa und 100 kDa besitzen [PALMIERI *et al.*, 1993; RAGHUKUMAR *et al.*, 1999; IIMURA *et al.*, 2002].

Um zu gewährleisten, daß ausschließlich die Induktion von Enzymen durch Erdnußschalen detektiert wird, wurde bei der Kultivierung auf die zusätzliche Supplementierung des stickstoffarmen Nährmediums (vgl. 3.2.2.2) mit Cu^{2+} verzichtet.

Die Proteinkonzentrate, die aus Kultivierungen mit Erdnußschalen gewonnen wurden, waren stets intensiv braun gefärbt, was bei Referenzkulturen ausblieb. Um Salze, die bei der isoelektrischen Fokussierung stören, möglichst vollständig zu entfernen, wurden die Proteine präzipitiert. Bei Fällungsversuchen mit Trichloressigsäure blieb die braune Färbung erhalten. Daraus erstellte Elektropherogramme zeigten bei Visualisierung der Proteine mittels Silberfärbung im sauren pI-Bereich über den gesamten Molekülgrößenbereich ausgeprägte Schlierenbildung (Abb. 4.16). Dieses Phänomen ist bereits von der gelelektrophoretischen Trennung von Proteinen aus Tabakblättern bekannt. Dort interagieren Pigmente und phenolische Komponenten bei der Aufarbeitung mit den Pflanzenproteinen und verursachen Streifenbildung und Artefakte [HARI, 1981]. Eine Inkubation von Erdnußschalen mit Standardnährlösung über sieben Tage zeigte bei einer zweidimensionalen elektrophoretischen Trennung der im Medium befindlichen Proteine nur geringfügige Schlierenbildung (Abb. 4.16). Es ist anzunehmen, daß es sich bei Kultivierung von *P. sapidus* und *L. irina* auf Erdnußschalen um Aggregate der durch die Organismen sekretierten Proteine mit Phenolen handelt, die durch den lignolytischen Prozeß freigesetzt wurden. Interaktionen zwischen Proteinen und Phenolen, Aggregation und Präzipitation sind vor allem bei der Produktion von Bier und Fruchtsäften bekannt [CHAPON, 1996; SIEBERT *et al.*, 1996; BOYE, 1999; RENARD *et al.*, 2001].

Bei Färbung mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue trat die Schlierenbildung gegenüber einem mit Silber gefärbten Gel etwas vermindert auf. Die Reaktion des Coomassie-Farbstoffs mit phenolischen Verbindungen aus Pflanzenmaterial ist ebenfalls in der Literatur

beschrieben [MATTOO *et al.*, 1987]. Die Vermutung, daß es sich bei der braunen Färbung um polymere Phenole handelt, wurde durch eine Überprüfung des Phenolgehaltes in Ultrafiltrationskonzentraten mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz bestätigt. Der Phenolgehalt war bei induzierter Kultivierung ungefähr doppelt so hoch wie bei Kultivierung ohne Erdnußschalen (vgl. Tabelle 4.3). Die Polyphenole, die wahrscheinlich aufgrund ihrer Aggregation mit Proteinen auch die Poren der Ultrafiltrationsmodule nicht passieren konnten, entspringen vermutlich dem Abbau des Ligninpolymers durch den Pilz.

Bei Fällung mit Chloroform-Methanol nach WESSEL & FLÜGGE (1984) wurde ein farbloses Proteinpellet erhalten. Elektropherogramme, die mit diesen Proteinproben erstellt wurden, waren frei von Schlierenbildung. Es ist anzunehmen, daß durch die Zugabe von Chloroform die Phenole aufgrund ihrer besseren Löslichkeit in der wässrigen Methanolphase verbleiben und „freie“ Proteine in der Interphase zurücklassen.

Zusätzlich zur Sensitivität einer Färbemethode sind auf dem Gebiet der *Proteomics* besonders Linearität, d.h. proportional zur Proteinmenge ansteigende Farbstoffmenge, und Homogenität, d.h. auch verschiedene Proteine werden mit gleicher Intensität gefärbt, gefragt. In bezug darauf ist die Silberfärbung, die noch immer die empfindlichste nicht-radioaktive Nachweismethode darstellt, weit vom Ideal entfernt [RABILLOUD & CHARMONT, 1999]. Die Silberfärbung ist nicht quantifizierbar, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität gefärbt werden [POEHLING & NEUHOFF, 1981]. Außerdem fordern an die Färbung anschließende Analysenmethoden wie MALDI-TOF oder MS/MS möglichst geringe Interferenzen. Die auch auf diesem Gebiet aufgetretenen Probleme nach erfolgter Silberfärbung sind von GEVAERT & VANDEKERCKHOVE (2000) beschrieben worden. Abgesehen von der Silberfärbung wird die kolloidale Coomassie-Färbung am häufigsten genutzt. Während diese Färbetechnik bessere Linearität und Homogenität bei weniger Störeinflüssen in Verbindung mit massenspektrometrischen Analysenmethoden aufweist, ist sie gegenüber der Silberfärbung um ein bis zwei Größenordnungen empfindlicher. So muß entweder auf hohe Proteinbeladung der Gele unter dem Risiko von Präzipitationen ausgewichen werden, oder die Analyse beschränkt sich auf die vornehmlich vorhandenen Proteine. Eine weitere Methode zur Detektion von Proteinen beruht auf der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die für die Detektion von Proteinen durch *Proteomics* wieder an Bedeutung erlangt haben [NEUHOFF *et al.*, 1988]. Metallchelate mit Bathophenanthrolin-disulfonat als Fluorophor binden intensiv an Proteine [GRAHAM *et al.*, 1978]. Das Ruthenium-Chelat (Abb. 5.6) wurde von BANNWARTH (1989) zuerst für den Nachweis von DNA

beschrieben, RABILLOUD & CHARMONT (2000) benutzten Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat) ($\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$) erstmals für die zweidimensionale Gelelektrophorese.

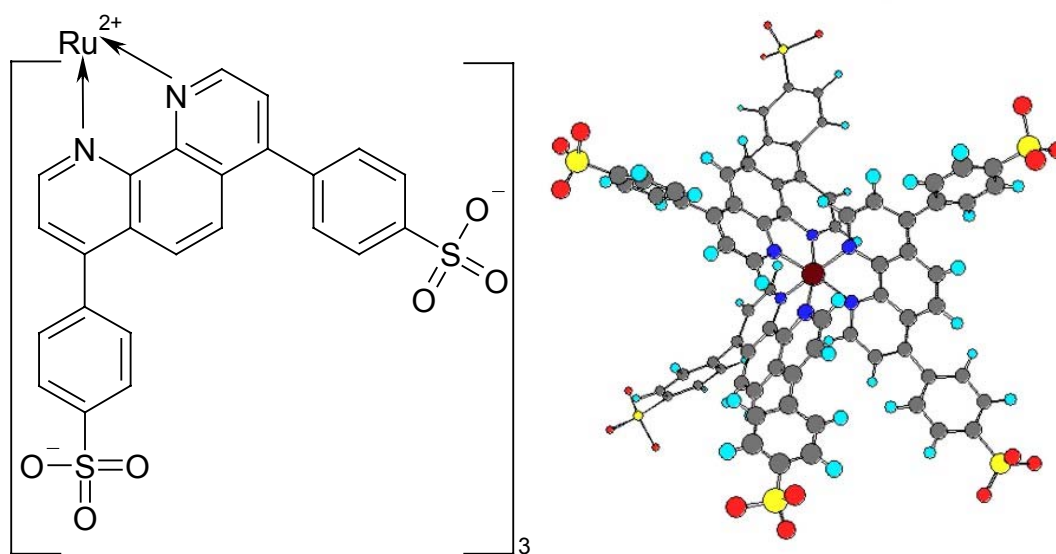


Abb. 5.6: Strukturformel (links) und Modell (rechts) von Ruthenium-(II)-tris-(bathophenanthrolin-disulfonat) [ZAHN, 2003]

Da mit Silber gefärbte Proteine für eine weitere massenspektrometrische Analyse ungeeignet sind, wurde eine Kombination aus zwei Färbemethoden entwickelt, welche nah an die Empfindlichkeit einer Silberfärbung heranreicht und zusätzlich Störungsfreiheit für die anschließende massenspektrometrische Analyse bietet. Im Anschluß an die Fluoreszenzfärbung mit $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$ wurde eine weitere Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau durchgeführt, welche das Ausschneiden der *Spots* erleichtert. Sämtliche bei Färbung mit $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$ detektierte Proteinspots waren auch nach kolloidaler Coomassie-Färbung gut nachweisbar. Vermutlich bieten noch vorhandene Metallchelate geeignete Bindungsstellen für den Coomassie-Farbstoff und erniedrigen so die Nachweisgrenze. Mit der $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$ -Fluoreszenzfärbung lassen sich Proteinspots bis zu 10 ng nachweisen, während der Grenzwert für Silberfärbung 5-10 ng und für kolloidales Coomassie Blau etwas weniger als 100 ng beträgt [NEUHOFF *et al.*, 1988; SHEVCHENKO *et al.*, 1996; RABILLOUD *et al.*, 2001]. $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$ -Färbungen erwiesen sich außerdem als am wenigsten anfällig für Phenole im Kulturmedium. Daher wurden zur Beseitigung von störenden Verbindungen die Proteine zunächst mit Chloroform-Methanol präzipitiert und sämtliche zweidimensionalen Gele zuerst mit $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{BPS})$ und für die Analyse der Proteine anschließend mit kolloidalem Coomassie-Blau gefärbt.

Die aus der Fluoreszenzfärbung erhaltenen Elektropherogramme wurden verglichen und zunächst die in Abbildung 4.30 hervorgehobenen Proteinspots für eine massenspektrometrische Analyse ausgewählt. Dabei handelte es sich um Proteine, die entweder ausschließlich bei Induktion mit Erdnußschalen bzw. ausschließlich ohne Induktion sekretiert wurden. Die in den Abbildungen 4.31 und 4.32 zusätzlich markierten Proteinspots, bei denen es sich zum Teil auch um Proteine handelte, die bei beiden Kultivierungsmethoden auftraten (Tabelle 4.4), wurden ebenfalls einer massenspektrometrischen Analyse zugeführt.

Bei der Analyse mittels ESI-MS/MS wurden durch die Kombination der oben genannten Färbemethoden keine Störungen beobachtet.

Der bei der hochauflösenden zweidimensionalen Gelelektrophorese häufig kritisierte Mangel an Reproduzierbarkeit konnte durch konstante Bedingungen bei Kultivierung und Aufarbeitung und die Ermittlung von geeigneten Elektrophoresebedingungen beseitigt werden. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden unabhängige Kultivierungen von *P. sapidus* am gleichen Kulturtag aufgearbeitet. Dabei wurden Kultivierungen sowohl auf Erdnußschalen als auch auf Glaswolle untersucht. Die Abbildungen 4.18 und 4.19 belegen anhand von ausgewählten Bereichen, daß die Muster der Proteinspots gut reproduzierbar waren. Die Abbildungen zeigen geringfügige Unterschiede in der Größe der einzelnen Gelbereiche. Das ist auf das Verhalten der Gelmatrix beim Fixieren und Färben der Proteine zurückzuführen. Beim Kontakt der Gele mit stark lösungsmittelhaltigen Medien, wie es z.B. beim Fixieren der Fall ist, war eine Kontraktion der gesamten Gelmatrix zu beobachten. Durch anschließende Behandlung mit vorwiegend wäßrigen Medien trat Quellen der Gele ein (vgl. 3.3.6), wobei nicht wieder die exakte Gelgröße erreicht wurde. Dadurch kommen geringfügige Verzerrungen im Gel und im Muster der Proteinspots zustande. Daher wurden von jeder Proteinprobe drei unabhängige Elektropherogramme angefertigt.

5.5 Kinetik der Proteinexpression bei *Pleurotus sapidus*

Um Aussagen darüber machen zu können, zu welchem Zeitpunkt der Kultivierung bestimmte Proteine in das Kulturmedium abgegeben werden, wurden Kulturen von *P. sapidus* auf Erdnußschalen während der dynamischen Kultivierungsphase nach zwei, vier, sechs und acht Tagen aufgearbeitet.

Sämtliche Elektropherogramme der Kinetik wurden auf ein Vergleichselektropherogramm vom siebten Kulturtag bezogen. Zu diesem Zeitpunkt befand sich die Kultur - bezogen auf die Laccaseaktivität - etwa in der Mitte der logarithmischen Phase (Abb. 4.11).

Auffällig war, daß innerhalb der ersten vier Kulturtage verhältnismäßig wenig Proteinspots auftraten. Während die meisten *Spot*bereiche über den gesamten Kulturverlauf zu beobachten waren, kamen einige Proteine erst im Laufe der Kultivierung hinzu, andere waren dagegen z.B. nur am zweiten und dann wieder am achten Kulturtag zu detektieren (Abbildungen 4.24 bis 4.27).

Die Anzahl von *Spots* auf einem 2D-Gel hängt auch von posttranslationalen Modifikationen ab. Zu beobachten sind in der Regel Ketten von *Spots*, die von einem einzigen Prekursorprotein herrühren [GOOLEY & PACKER, 1997]. Eine gewisse Anzahl von *Spots* kann jedoch auch aus dem Prozeß der Probenpräparation bis zum fertigen 2D-Gel stammen. Weit verbreitet ist Deamidierung, d.h. die Umwandlung von Asparagin- und Glutaminresten in Aspartat bzw. Glutamat [SARIOUGLU *et al.*, 2000]. Ebenso häufig ist die Alkylierung von Proteinen durch freies, nicht polymerisiertes Acrylamid [BORDINI *et al.*, 1999a], durch N-substituierte Acrylamide [BORDINI *et al.*, 1999b], durch Quervernetzer [GALVANI *et al.*, 2000] und durch monomere Immobiline [BORDINI *et al.*, 2000a & 2000b]. Freie Monomere sind in SDS-PA-Gelen immer zu finden, da übliche Protokolle keine Reinigungsschritte enthalten. Da Harnstoff, der in hoher Konzentration im Lysis-Puffer zur Denaturierung und Solubilisierung der Probe vorhanden ist, im Gleichgewicht mit Ammoniumcyanat steht, können bei Temperaturen > 35 °C Carbamylierungen auftreten. HERBERT *et al.* (2003) zeigten jedoch, daß diese Reaktion entweder erst bei wesentlich höheren Temperaturen (100 °C) oder nach frühestens 48 h bei Raumtemperatur Artefaktbanden erzeugt. Im elektrischen Feld, d.h. bei der IEF, die in der Regel mehrere Stunden in Anspruch nimmt, kommt es nicht zu Carbamylierungen, weil entstehende Cyanationen durch Wanderung zur Anode möglichen Reaktionen entzogen werden [HERBERT *et al.*, 2003].

Eine weitere Quelle für „artifizielle“ *Spots* kann die Reduktion und Alkylierung sein, die nach Standardprotokollen zwischen erster und zweiter Dimension durchgeführt wird. HERBERT *et al.* (2001) berichten, daß freie –SH-Gruppen, entstanden durch Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT (vgl. Lysis-Puffer 3.2.5.1) vor der IEF, während der Wanderung des Proteins zum pI neue Disulfidbrücken mit anderen Proteinen und dadurch große Aggregate vor allem im alkalischen pH-Bereich bilden. Die Untersuchungen zeigten, daß ohne geeignete Reduktion und Alkylierung der Disulfidbrücken anstelle von zwei *Spots* mehr als 40 auf einem 2D-

Elektropherogramm nachweisbar sind. HERBERT *et al.* (2001) schlagen als Gegenmaßnahme vor, Reduktion und Alkylierung bereits vor der IEF durchzuführen. YAN *et al.* (1999) dagegen erhöhten die Menge an Iodacetamid auf 125 mM und die Inkubationszeit für die Alkylierung (vgl. 3.2.5.3) auf mindestens 15 min. GALVANI *et al.* (2001a) zeigten, daß bei der Alkylierung mit Iodacetamid innerhalb von zwei Minuten ein Alkylierungsgrad von ca. 70 % erreicht wird, eine vollständige Alkylierung jedoch bis zu 6 h in Anspruch nehmen kann.

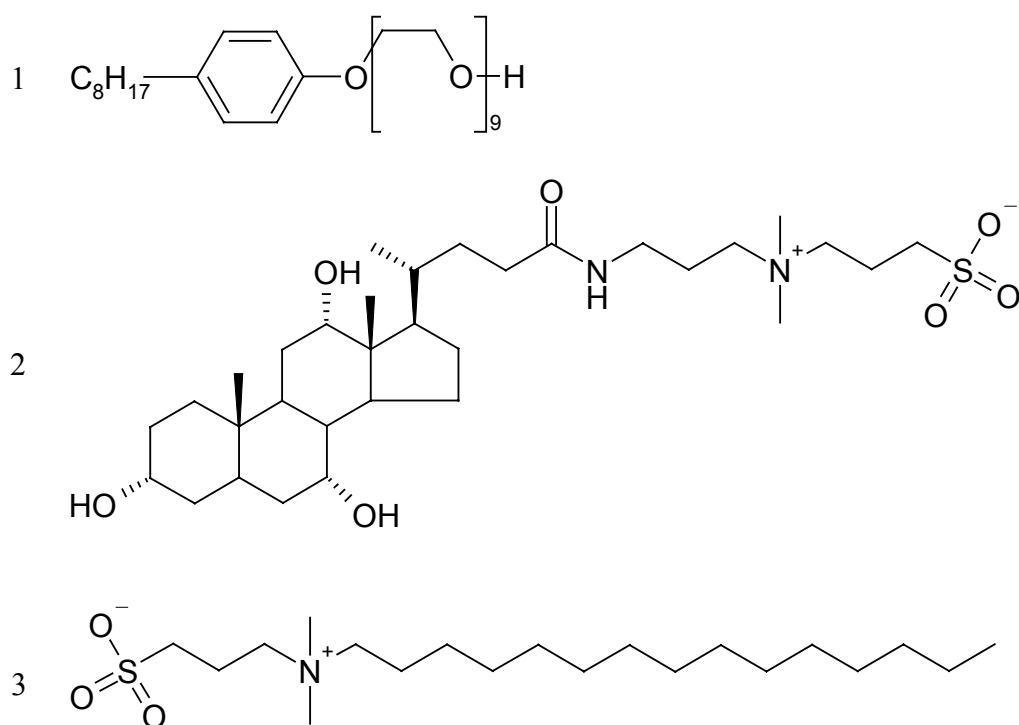


Abb. 5.7: 1: Nonidet P40 (Octylphenolpoly(ethylenglycolether)); 2: CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio)-1-propansulfonat); 3: Zwittergent® 3-14 (3-(N,N-Dimethyltetradecylammonio)-propansulfat)

Großen Einfluß hat auch eine effektive Solubilisierung der Proteine. O'FARRELL entwickelte 1975 den ersten denaturierenden Lysis-Puffer mit Harnstoff, β -Mercaptoethanol und dem nichtionischen Detergenz Nonidet P-40 (Abb 5.4).

PERDEW *et al.* (1983) ersetzten Nonidet P-40 durch das zwitterionische CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat; Abb. 5.7), welches sich vor allem bei der Solubilisierung hydrophober Membranproteine als effektiver erwies. Zur Isolierung von Membranproteinen sind in den letzten Jahren vor allem Sulfo- und Amidosulfobetaine zum Einsatz gekommen (z.B. Zwittergent® 3-14; vgl. Abb. 5.7) [CHEVALLET *et al.*, 1998; SANTONI *et al.*, 1999; MOLLOY *et al.*, 2000].

Harnstoff (bis zu 9,5 M) war über viele Jahre das einzige Chaotrop für die IEF. Seit einiger Zeit wird zusätzlich Thioharnstoff benutzt, da es die Solubilisierung vor allem von

Membranproteinen erleichtert [MOLLOY *et al.*, 1998; RABILLOUD *et al.*, 1998]. Üblicherweise werden 2 M Thioharnstoff und 5-7 M Harnstoff benutzt, da Harnstoff die Löslichkeit von Thioharnstoff in Wasser deutlich verbessert. GALVANI *et al.* (2001b) zeigten jedoch, daß Thioharnstoff Iodacetamid effektiv abfängt und dadurch eine optimale Alkylierung verhindert. Das Schwefelatom im Thioharnstoff ist in der Lage, ebenso wie die –SH-Gruppen des Cysteins im Alkalischen mit Iodacetamid zu reagieren.

In Experimenten zur vorliegenden Arbeit wurde daher auf den Zusatz von Thioharnstoff verzichtet. Reduktion und Alkylierung wurden nach dem Protokoll von YAN *et al.* (1999) durchgeführt. Die Proteinidentifizierung zeigte nur eine geringe Anzahl von ähnlichen Proteinen. Das Auftreten einiger *Spotketten* (vgl. Abbildungen 4.28 & 4.29) ist höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Glykosylierungsgrade zurückzuführen. So können z.B. bei Manganperoxidasen 10 bis 40 % der Molekülmasse auf Zuckerreste entfallen [GLUMHOFF *et al.*, 1990].

5.6 Proteinidentifizierung

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Enzyme aus Basidiomyceten entdeckt und untersucht, die direkt oder indirekt am Abbau von Lignin und Lignocellulose beteiligt sind. In der Literatur sind jedoch bisher wenige Untersuchungen zu finden, die sich mit der Gesamtheit der sekretierten Proteine von Basidiomyceten beschäftigen [STOOP & MOOIBROEK, 1999; OSPINA-GIRALDO *et al.*, 2000 ; APOGA *et al.*, 2001; GUETTLER *et al.*, 2002].

Wenn ein Protein in einem zweidimensionalen Gel getrennt vorliegt, gibt es im Wesentlichen zwei Wege, es weiter zu charakterisieren. Entweder wird das intakte Protein durch *blotting* auf eine chemisch inerte Matrix transferiert, wo dann weitere proteinbiochemische Analysen durchgeführt werden. Alternativ hierzu wird das Protein in der Gelmatrix enzymatisch zu Peptiden hydrolysiert, welche dann eluiert und analysiert werden. Wenn das Genom eines bearbeiteten Organismus vollständig sequenziert ist, können Proteine anhand ihres charakteristischen Peptidmusters (*peptide mass fingerprint*) mittels automatisierbarer MALDI-MS schnell identifiziert werden. Eine *de novo*-Sequenzierung von Proteinen mittels ESI-MS/MS ist bislang nicht automatisierbar und daher mit einem erheblich höheren Aufwand verbunden.

Die Identifizierung extrazellulärer Proteine von *P. sapidus* wurde daher zunächst auf besonders intensive *Spots* beschränkt. Es wurden außerdem solche Proteine ausgewählt, die entweder ausschließlich oder bevorzugt bei der Kultivierung auf Erdnußschalen bzw. Glaswolle exprimiert wurden. In Anwesenheit von Erdnußschalen wurden - abhängig vom jeweiligen Kulturtag - etwa 1,5 bis 2 mal höhere Proteinkonzentrationen sekretiert als auf Glaswolle (Abb. 4.3). Um für die massenspektrometrische Sequenzierung ausreichende Proteinkonzentrationen zu gewährleisten, wurden jeweils gleiche absolute Proteinmengen der zweidimensionalen elektrophoretischen Trennung unterworfen.

Mehrfach geladene Moleküle wurden vom Quadrupol-Analysator selektiv in die Kollisionszelle (Kollisionsenergie 25 bis 30 eV) zur kollisions-induzierten Fragmentierung überführt. Die gebildeten Tochterionen wurden mittels orthogonalem Flugzeit-(*time of flight*)-Analysator getrennt und die aufgenommenen MS-MS-Spektren nach Verstärkung zur Sequenzbestimmung der tryptischen Peptide verwendet (vgl. Abbildungen 5.8 & 5.9).

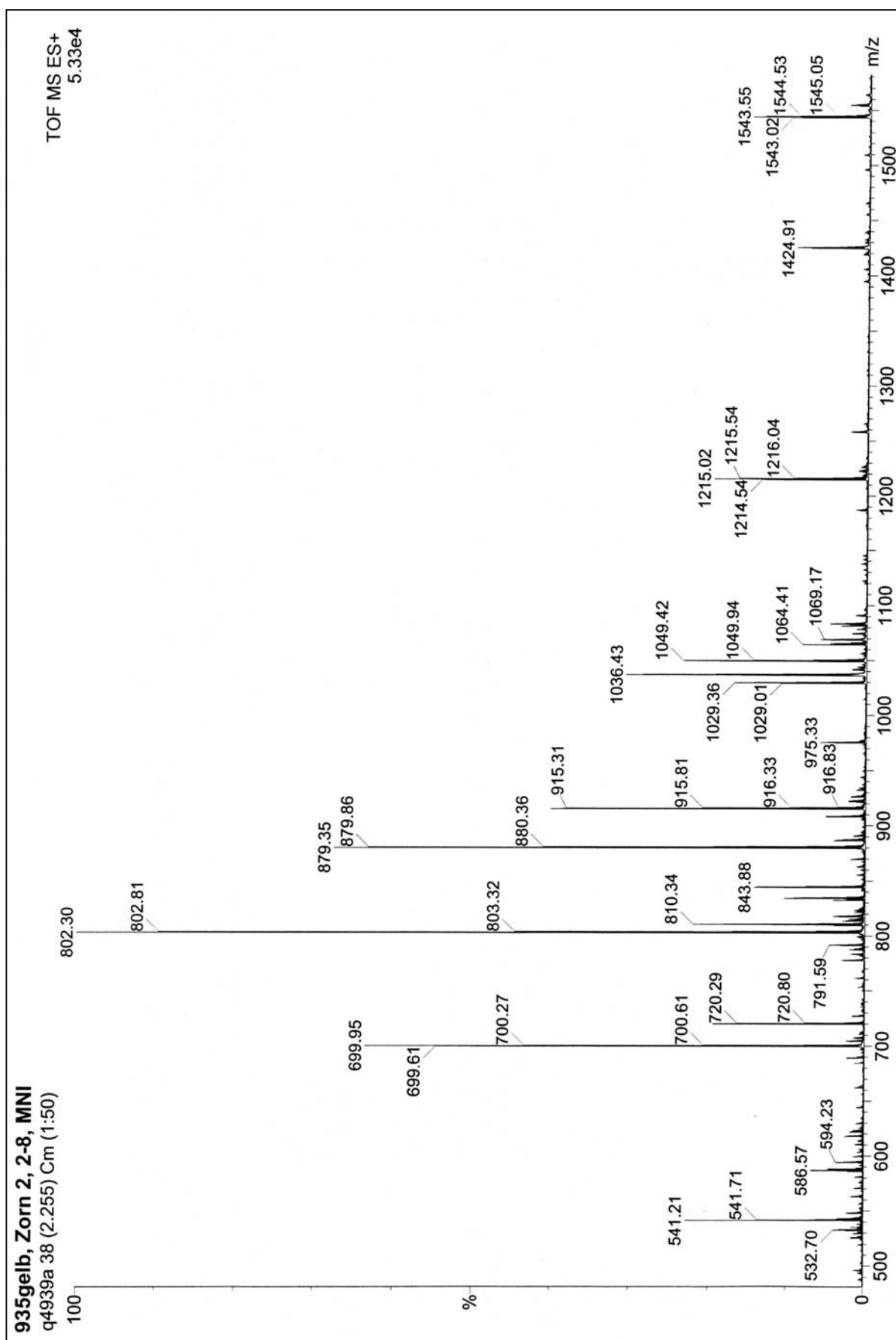


Abb. 5.8: Massenspektrum der Peptide von Protein 2-8 mit für die Elektrospray-Ionisation typischen, mehrfach geladenen Signalen. Für eine Sequenzierung wurde das Ionensignal mit $m/z = 802,3$ isoliert und fragmentiert (siehe Abbildung 5.9).

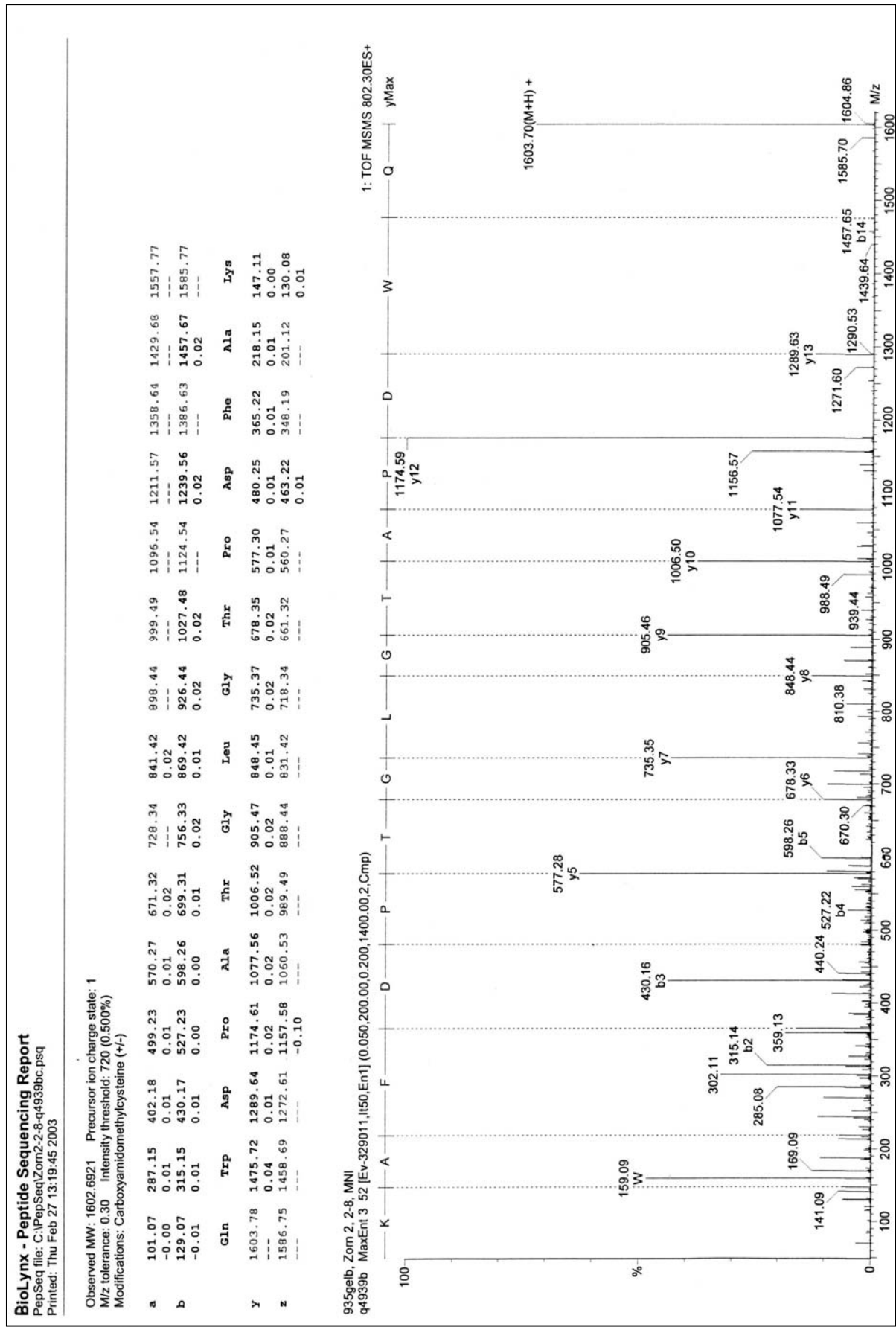


Abb. 5.9: MSⁿ-Spektrum des Fragments mit m/z = 802,3, aus dem direkt ein Teil der Sequenz ermittelt werden kann (hier die Aminosäuresequenz QWDPATGLGTPDFAK, vgl. Tabelle 4.4).

Einer weiteren Analyse wurden die in Abbildung 4.31 und 4.32 zusätzlich markierten Proteinspots zugeführt, bei denen es sich zum Teil auch um Proteine handelte, die bei beiden Kultivierungsmethoden auftraten (Tabelle 4.4).

Die Untersuchungen an den Proben 1-14, 1-15 und 1-16 aus dem Elektropherogramm der induzierten Kultivierung und den Proben 2-8 und 2-9 der Kultivierung auf Glaswolle zeigten deutliche Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen und hochsignifikante Homologien zu verschiedenen Peptidasen. Die *Spots* 2-8 und 2-9 entsprechen aufgrund ihrer Position auf dem Elektropherogramm den *Spots* 1-14 und 1-15. Die darüberhinausgehende Ähnlichkeit zu 1-16 zeigt, daß es sich hier höchstwahrscheinlich um Isoenzyme mit unterschiedlichem pI handelt.

Ähnlich verhält es sich mit den Proben 2-5, 2-6 und 2-7. Alle *Spots* liegen in demselben Molekülgrößenbereich und unterscheiden sich abgesehen von ihrer absoluten Menge nur durch ihren isoelektrischen Punkt. Hier bestehen hochsignifikante Homologien zu polyvalenten Peroxidasen, z.B. zu einer polyvalente Peroxidase aus *L. irina*, die sich verantwortlich für den Abbau von β,β -Carotin in norisoprenoide Aromastoffe zeigte [ZORN *et al.*, 2003e]. Polyvalente Peroxidasen weisen sowohl typische katalytische Eigenschaften von Manganperoxidasen als auch von Ligninperoxidasen auf. Sie oxidieren ein breites Spektrum an phenolischen und nicht-phenolischen aromatischen Substraten entweder direkt (wie Ligninperoxidasen) oder ähnlich wie Manganperoxidasen indirekt über die Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{3+} [RUIZ-DUENAS *et al.*, 1999; GOMEZ-TORIBIO *et al.*, 2001; RUIZ-DUENAS *et al.*, 2001]. Weitere polyvalente Peroxidasen wurden aus den Weißfäulepilzen *P. pulmonarius* [CAMARERO *et al.*, 1996], *P. ostreatus* [SARKAR *et al.*, 1997] und *Bjerkandera adusta* [HEINFLING *et al.*, 1998] beschrieben.

Viele der analysierten Proteine zeigten signifikante Homologien zu verschiedenen Peptidasen. Peptidasen, oft auch bezeichnet als Proteasen oder Proteinasen, sind verantwortlich für die Hydrolyse der Amidbindungen in der Polypeptidstruktur von Proteinen. Peptidasen spielen eine wichtige Rolle in allen Verdauungssystemen beim Abbau des in der Nahrung enthaltenen Proteins und werden z.B. beim Menschen in großen Mengen im Magen und der Bauchspeicheldrüse produziert. Es werden vier Klassen von Peptidasen anhand der in ihrem aktiven Zentrum vorhandenen und für die Katalyse verantwortlichen Gruppen unterschieden: (I) Serinpeptidasen, (II) Cystein- oder Thiolpeptidasen, (III) Metallpeptidasen und (IV) Carboxy- oder auch saure Peptidasen. Schließlich wird noch der Ort der Hydrolyse einer Polypeptidkette mit *endo* bezeichnet, wenn es sich um eine Spaltung innerhalb der Sequenz handelt, oder *exo*, wenn am Ende eines Polypeptids gespalten wird [BUGG, 1997].

Bei Serinpeptidasen beteiligt sich die Aminosäure Serin im aktiven Zentrum durch kovalente Bindungen zum Substrat an der Katalyse und wird dabei zusätzlich in einer konzertierten Aktion von Histidin und Aspartat unterstützt („katalytische Triade“). Zu den am besten untersuchten Serinpeptidasen gehört α -Chymotrypsin, eine Endopeptidase, die spezifisch hinter aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan schneidet. Diese Selektivität ist auf eine Interaktion zwischen aromatischer Seitenkette des Substrats und einer hydrophoben Bindungstasche nahe am katalytischen Zentrum zurückzuführen (Abb. 5.10).

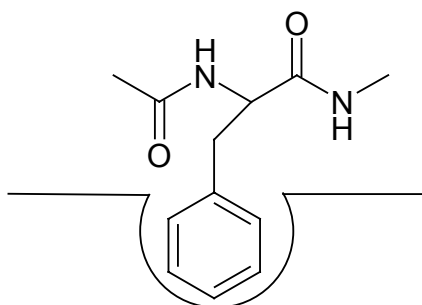


Abb. 5.10: Interaktion zwischen aromatischer Seitenkette des Substrats und hydrophober Bindungstasche von α -Chymotrypsin.

Die katalytische Aktivität beruht auf der ungewöhnlichen Reaktivität von Ser-195. Unter physiologischen Bedingungen ist eine $\text{-CH}_2\text{OH}$ -Gruppe chemisch relativ inert. Jedoch wird nach Zugabe eines Substrats ein Proton vom Ser-195 auf His-57 übertragen. His-57 bildet dabei ein Imidazol-Kation, welches durch elektrostatische Wechselwirkung vom negativ geladenen Asp-102 stabilisiert wird (Abb. 5.11). Die von zwei NH-Gruppen in der Hauptkette des Enzyms gebildeten Wasserstoffbrückenbindungen (von Ser-195 und Gly-193) tragen entscheidend zur Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustandes (Oxyanion genannt) bei.

Protonierung des Stickstoffs der Fluchtgruppe durch His-57 sorgt für die Abspaltung des Amins und führt zu einem Acyl-Enzym-Zwischenprodukt. His-57 fungiert anschließend als Base und deprotoniert H_2O , welches wiederum den Acylkohlenstoff nukleophil angreift. Es bildet sich zum zweiten Mal ein tetraedrisches Oxyanion, stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen. Eine abschließende Protonierung des Serin-Sauerstoffs durch His-57 führt zum Ende des katalytischen Zyklus und entläßt das Carbonsäureprodukt.

Serinpeptidasen können durch Organophosphor- und Chlormethylketonsubstrate inhibiert werden. Organophosphorverbindungen bilden dann stabile Phosphorester mit dem Serin-Sauerstoff, während Chlormethylketonsubstrate His-57 modifizieren.

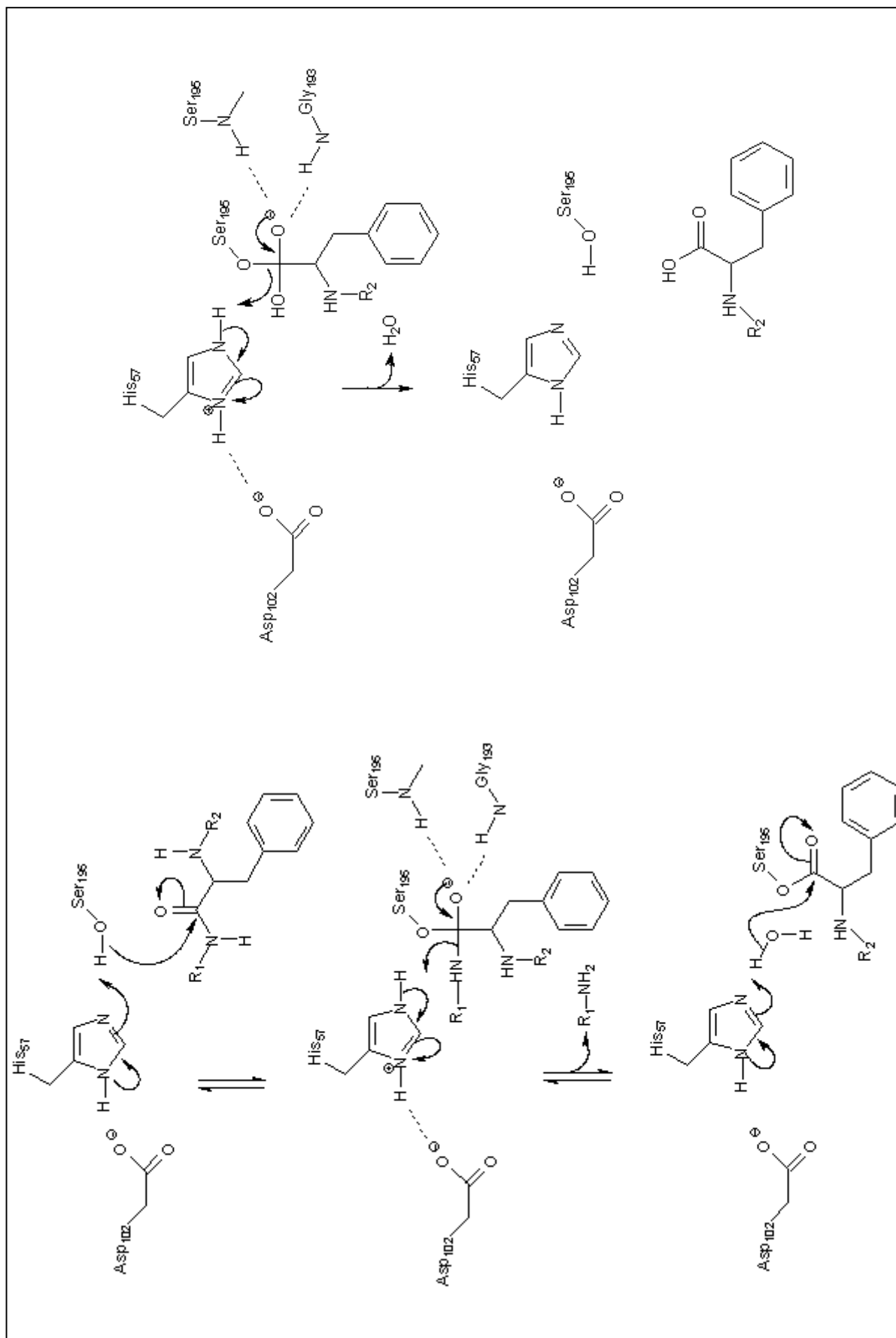


Abb. 5.11: Mechanismus der Spaltung einer Amidbindung unter Katalyse der Serinepeptidase α -Chymotrypsin [nach BUGG, 1997].

Thiolpeptidasen sind eine weitere sehr verbreitete Gruppe. Das aus der Papayafrucht gewonnene Papain besitzt ein Cystein im aktiven Zentrum, das wie das Ser-195 im α -Chymotrypsin wirkt. Die Katalyse verläuft über einen intermediären Thioester, wobei die Nukleophilie der $-SH$ -Gruppe durch ein benachbartes Histidin, das als Protonenakzeptor fungiert, verstärkt wird.

Metallpeptidasen werden durch ein Metallion als Cofaktor in ihrem aktiven Zentrum charakterisiert. In der Regel handelt es sich um Zn^{2+} , welches in den katalytischen Zyklus involviert ist. Praktisch lassen sich Metallpeptidasen leicht von anderen Peptidasen unterscheiden, da durch die Zugabe von chelatisierenden Reagenzien wie z.B. EDTA das Metallion aus dem aktiven Zentrum entfernt und das Enzym inaktiviert wird. Zu den am besten charakterisierten Vertretern dieser Klasse gehören Carboxypeptidase A (aus Rinderpankreas) und Thermolysin aus *Bacillus thermoproteolyticus*. Der Mechanismus der Hydrolyse ist gut untersucht (Abb. 5.12).

Carboxypeptidase A hydrolysiert carboxylendständige Peptidbindungen, wobei die Reaktion am schnellsten abläuft, wenn der C-terminale Aminosäurerest eine aromatische oder eine große aliphatische Seitenkette besitzt. Ein fest gebundenes Zinkion sitzt in einer Rille nahe der Moleküloberfläche und ist in einer tetraedrischen Anordnung von zwei Histidinseitenketten, einer Glutamatseitenkette und einem Wassermolekül koordiniert. Ein großer Hohlraum in der Nähe des Zinkions nimmt die Seitenkette des terminalen Restes des Substrats auf. Die Polarisierung der Carbonylgruppe des Substrats durch das Zinkion erleichtert den Angriff des Glu-270 auf das Kohlenstoffatom. Des weiteren wird die negative Ladung des Sauerstoffatoms im tetraedrischen Zwischenprodukt durch elektrostatische Wechselwirkungen mit einer Enzymseitenkette stabilisiert. Ein ganz ähnlicher Mechanismus ist beim Thermolysin zu finden (Abb. 5.12).

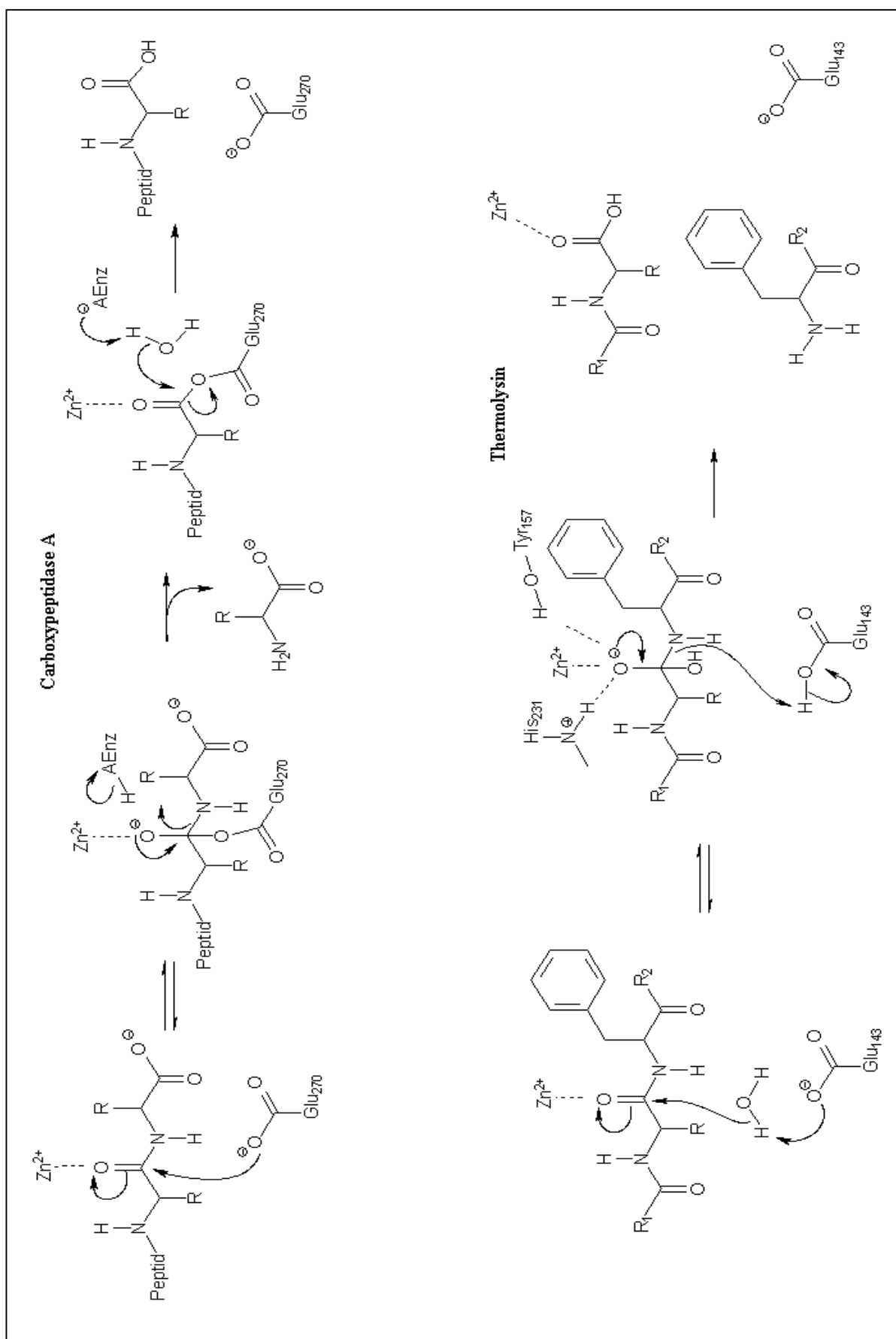


Abb. 5.12: Mechanismus der Hydrolyse von Amidbindungen unter Katalyse der Metallpeptidasen Carboxypeptidase A (oben) und Thermolysin (unten) [nach BUGG, 1997].

Carboxypeptidasen oder auch saure Peptidasen sind in der Regel nur in saurem Milieu aktiv. Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist das Pepsin, die wichtigste Peptidase im Magensaft. Im aktiven Zentrum dieses Enzyms befinden sich zwei Apartatreste, von denen eines ionisiert, das andere nichtionisiert vorliegen muß, damit es aktiv ist. Hieraus ergibt sich ein pH-Optimum zwischen 2 und 3. Carboxypeptidasen mit ähnlicher Struktur und ähnlichen Eigenschaften wurden vor allem aus Schimmelpilzen isoliert [NAKADAI *et al.*, 1972; ICHISHIMA *et al.*, 1973]. Den Carboxypeptidasen ist gemein, daß sie von sehr niedrigen Konzentrationen von Pepstatin spezifisch gehemmt werden. Das Hexapeptid Pepstatin ist ein Analogon des tetraedrischen Übergangszustandes des normalen Substrats.

Abschließend ist festzustellen, daß bei induzierter Kultivierung Peptidasen mengenmäßig überwogen. Nur *Spot* 1-8 zeigte hochsignifikante Ähnlichkeit zu einer Manganperoxidase. Auch bei Kultivierung auf Glaswolle wurden Proteine sekretiert, die als dem Ligninabbau zugehörig einzuordnen sind (2-1, 2-5 bis 2-7). Sowohl bei induzierter als auch bei nicht induzierter Kultivierung konnten für einige *Spots* keine Homologien ermittelt werden. Dies bietet Anlaß zu der Annahme, daß zahlreiche Proteine mit unbekannten Eigenschaften und Funktionen sekretiert werden.

5.7 Konstruktion einer cDNA-Bibliothek von *Pleurotus* *sapidus*

Um die zu den ermittelten Aminosäuresequenzen gehörenden Proteine molekularbiologisch charakterisieren zu können, wurde eine cDNA-Bibliothek von *P. sapidus* konstruiert (Vektor λ TriplEx2, *SMART cDNA library construction kit*, Clontech). Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden Mycelpellets aus einer Kultivierung auf Erdnußschalen von Kulturtag 7 eingesetzt. Mittels ESI-MS/MS analysierte Proteinspots stammen ebenfalls aus Elektropherogrammen von Kulturtag 7.

Um die Proteine, deren Aminosäureteilsequenzen durch massenspektrometrische Analyse ermittelt wurden, eindeutig identifizieren zu können, ist es nötig, möglichst vollständige cDNA-Sequenzen zu erhalten. Über diese Sequenzen können in der Folge Homologievergleiche zu anderen bereits bekannten Proteinen durchgeführt werden. Es gilt also, die in Tabelle 4.4 aufgeführten Aminosäuresequenzen nach Übersetzung in die zugehörige Abfolge von Basentriplets in der erstellten cDNA-Bibliothek wiederzufinden. Dies kann über PCR und entsprechende Primer erfolgen, die spezifisch an bekannte cDNA-Bereiche binden.

Um die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Identifizierung der analysierten Proteine zu erfüllen, wurden PCR-Primer für diejenigen Aminosäuresequenzen erstellt, denen bei den durchgeführten Homologievergleichen mittels FASTA 3 die kleinsten Erwartungswerte und damit die höchsten Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Proteinen zuzuordnen waren. Es handelte sich dabei um die Proteinspots 1-8, 1-15 und 2-6 mit ihren hochsignifikanten Homologien zu Manganperoxidasen, Tripeptidylpeptidasen und polyvalenten Peroxidasen.

Manganperoxidasen werden in der Papierindustrie zur Delignifikation (Bleichung) eingesetzt, da bereits geringste Ligninkonzentrationen zu einer Braunfärbung der Zellulose führen [GROENQVIST *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003]. Sie eignen sich jedoch auch zum oxidativen Abbau von Xenobiotika, deren strukturelle Eigenschaften denen des Lignins ähnlich sind wie z.B. Chlorphenole [SEDARATI *et al.*, 2003], Organo-Arsenverbindungen [HAAS *et al.*, 2003], PAHs (*polycyclic aromatic hydrocarbons*) [ZHENG & OBBARD, 2002; STEFFEN *et al.*, 2002 & 2003] oder PCBs (polychlorierte Biphenyle) [THOMAS *et al.*, 1992; KRCMAR *et al.*, 1999].

Peptidasen aus Pilzen sind vor allem in der Lebensmittelverarbeitung, z.B. bei der Herstellung von Sojasauce, von Bedeutung [DOUMAS *et al.*, 1998]. Des weiteren existieren zur Anwendung mikrobieller Peptidasen in lebensmitteltechnischen Prozessen zahlreiche Patentschriften [z.B. HAYASHI & NAKASHIRO, 1989; HAYASHI & IZAWA, 1996; MURAO & SHIN, 1996].

Die Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz in Basentriplets ist nicht eindeutig, da mehrere unterschiedliche Triplets für eine einzelne Aminosäure codieren. Daher wurden zunächst die entsprechenden cDNA-Bereiche homologer, möglichst aus Basidiomyceten stammender Enzyme verglichen und unter Berücksichtigung der *codon usage* von *Pleurotus ostreatus*, einem nahen Verwandten von *P. sapidus*, (Abb. 4.36) daraus Konsensussequenzen erstellt. Bei der Generierung der Primer wurde die Zahl der sogenannten *wobbles* (degenerierte Positionen in der Primersequenz), an denen sich unterschiedliche Basen befinden können, minimal gehalten. Mit dem Programm Primer 3 [ROZEN & SKALETSKY, 2000] wurden dann paarweise Oligonukleotide konstruiert, die an die homologe Sequenzregion der cDNA des Vergleichsproteins binden (Tabelle 4.5).

Basierend auf den Aminosäuresequenzdaten werden in Folgearbeiten cDNAs aus *P. sapidus*, die für Laccasen und Manganperoxidasen codieren, mittels PCR amplifiziert und sequenziert, um diese Enzyme genauer charakterisieren zu können. Ist die entsprechende cDNA bekannt, bietet sich außerdem die Möglichkeit der Überexpression der Strukturgene in einem

geeigneten eukaryotischen Expressionssystem (z.B. *Pichia pastoris*) als Voraussetzung zur Darstellung großer Enzymmengen für biotechnologische Anwendungen.

5.8 Charakterisierung einer neuen Lipase aus *Pleurotus sapidus*

Lipasen (Triacylglycerol Acylhydrolasen, EC 3.1.1.3) finden zahlreiche biotechnologische Anwendungen bei der Herstellung von Lebensmitteln, Kosmetika, Pharmaka, Detergenzien oder auch bei der Verarbeitung von Leder [IWAI & TSUJISAKA, 1974; ARNOLD *et al.*, 1975; MACRAE, 1983; MUKHERJEE, 1992]. Lipasekatalysierte Biotransformationen bieten Regio-, Stereo- und Substratspezifität bei milden Reaktionsbedingungen und geringem Energieaufwand auch bei der Darstellung großer Substanzmengen [BORGSTRÖM & BROCKMAN, 1984; HIROHARA *et al.*, 1985; YAMANE, 1988]. In Lebensmitteln hat die Freisetzung von Fettsäuren ($< C_{16}$) bei der Hydrolyse von Ölen in Glycerol, Fettsäuren, Mono- und Diacylglyceride unmittelbare Auswirkungen auf das Aroma [KROLL, 1991]. Zur Verstärkung des Aromas von Käse und Butter werden mikrobiologisch erzeugte Lipasen z.B. aus *Candida lipolytica* eingesetzt. Eine geringe Hydrolyse des MilCHFettes in Milchsokolade sorgt für einen verstärkten „Milchcharakter“ im Geschmack [WELSH *et al.*, 1989; BERGER, 1991]. Lipasen eignen sich außerdem für Entfettungen unter milden Bedingungen wie z.B. bei Knochen zur Herstellung von Gelatine [BELITZ & GROSCH, 1992].

Lipasen sind nur an der Grenzfläche Wasser/Lipide aktiv, wo sie die Hydrolyse emulgierter Acyllipide katalysieren. Sie unterscheiden sich dadurch von den Esterasen, die ausschließlich wasserlösliche Ester spalten. Man unterscheidet Lipasen hinsichtlich ihrer Spezifität, entweder bevorzugt mit den primären OH-Gruppen des Glycerins veresterte Fettsäuren zu hydrolysieren oder aber alle drei Esterbindungen gleich schnell zu spalten [BROCKERHOFF & JENSEN, 1974; BORGSTRÖM & BROCKMAN, 1984].

Die am besten untersuchte Lipase entstammt dem Schweinepankreas ($M=48$ kDa) [DOWNEY & ANDREWS, 1965]. Das Enzym hydrolysiert mit abnehmender Geschwindigkeit Triacyl-, Diacyl- und Monoacylglyceride. Die Lipase katalysiert zunächst die Hydrolyse der primären Acylreste. Erst nach längerer Inkubation wird durch eine Acylwanderung auch der dritte Acylrest freigesetzt [SAVARY & DESNUELLE, 1956]. Die Hydrolyse der Esterbindungen verläuft über einen Mechanismus, der dem des Chymotrypsins analog ist (vgl. Kap. 5.6). Im

Unterschied zu den Serinpeptidasen enthält die Pankreas-Lipase im aktiven Zentrum einen Leucinrest, der hydrophobe Kontakte zum Substrat herstellt und es zum aktiven Zentrum orientiert [WHITAKER, 1994].

Viele industriell genutzte Lipasen werden aus Pilzen (*Rhizomucor*, *Rhizopus* und *Candida*) und Bakterien (*Pseudomonas* und *Chromobacterium*) hergestellt [IWAI & TSUJISAKA, 1974 & 1984; WISDOM *et al.*, 1987; DEREWENDA *et al.*, 1994; JAEGER & REETZ, 1998; SCHMID & VERGER, 1998]. Pilzlipasen treten vorwiegend extrazellulär auf [IWAI & TSUJISAKA, 1984]. Die Sekretion extrazellulärer Lipasen ist auch für eine Vielzahl weiterer Mikroorganismen beschrieben worden [z.B. RAPP & BACKHAUS, 1992; HATZINIKOLAOU *et al.*, 1996; PRABHAKAR *et al.*, 2002]. Kenntnisse über extrazelluläre esterolytische und lipolytische Enzyme aus Basidiomyceten sind kaum vorhanden. SCHULTZ *et al.* (1996) beschrieben den Abbau von Suberin durch *Mycena meliigena* und extrazelluläre Lipasen wurden z.B. von *Calvatia gigantea*, *Ustilago maydis* und *Phanerochaete chrysosporium* produziert [ASTHER & CORRIEU, 1987; CHRISTAKOPOULOS *et al.*, 1992; KATSIVELA *et al.*, 1995].

Lipasen lassen sich auch für die Spaltung von Carotinoidestern einsetzen. Während pflanzliche Rohstoffquellen Carotinoide und Xanthophylle fast ausschließlich in Form ihrer Mono- und Diester enthalten, werden von der verarbeitenden Industrie bevorzugt freie Carotinoide eingesetzt. Das liegt in Studien zur Bioverfügbarkeit der Xanthophylle begründet, die belegen, daß eine optimale Resorption nur durch Verabreichung freier, d.h. unveresterter Carotinoide erreichbar ist [FLETCHER & PAPA, 1986; TYCZKOWSKI & HAMILTON, 1986; HENCKEN, 1992]. Neben dem Einsatz zur Färbung von Lebens- und Futtermitteln (E 161b; Zulassung laut Anl. 1 Teil B zu §3 Abs. 1 und §7 ZZulV zur Färbung verschiedener dort genannter Lebensmittel (z.B. Saucen, Snacks, Suppen)) gewinnen Carotinoide auch als Zusatzstoffe in *functional foods* an Bedeutung. Einigen Carotinoiden und Xanthophyllen werden Radikalfängereigenschaften zugeschrieben, außerdem werden sie präventiv zur Behandlung der adulten Makula-Degeneration eingesetzt [BIESALSKI *et al.*, 1996; GIOVANNUCCI *et al.*, 1998; LANDRUM & BONE, 2001; OLMEDILLA *et al.*, 2001].

Besondere Bedeutung bei der Gewinnung von Carotinoiden besitzen Oleoresine von Tagetes (*Tagetes erecta*) und Paprika (*Capsicum annuum*). [BUCKENHÜSKES, 1999].

Die herkömmliche Gewinnung von Carotinoiden und Xanthophyllen wie z.B. β,β -Carotin, Lutein, Capsanthin, β -Cryptoxanthin, Zeaxanthin, Capsorubin und Violaxanthin erfolgt vorwiegend über eine chemische Verseifung. Nach einer Extraktion mit Hexan mit anschließender Destillation des Oleoresins folgt die alkalische Hydrolyse (60 bis 80 °C über

24 h) mit konzentrierter (50 %iger) Kalilauge. Aus dem gesamten Prozeß resultieren Produktverluste von 30-40 % und vielfältige Produktschädigungen. Zudem ist aufgrund des Einsatzes hochkonzentrierter Lauge ein aufwendiger Personen- und Maschinenschutz notwendig.

Als Alternative bietet sich eine enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern an. Die enzymatische Spaltung von Estern ist außerdem von Interesse, da Zusatzstoffe nach geltendem europäischen Recht nur dann als „natürlich“ bezeichnet werden dürfen, wenn auch die Gewinnung der eingesetzten Ausgangsstoffe auf ausschließlich natürlichem, z.B. enzymatischem Wege erfolgt [ZORN *et al.*, 2000]. Das schließt den Einsatz eines chemischen Verseifungsprozesses zur Gewinnung freier Carotinoide generell aus. Zur enzymatischen Hydrolyse von Carotinoidestern existiert bislang nur wenig Literatur: KHACHIK *et al.* (1997) und LIU *et al.* (1998) untersuchten die Hydrolyse von Lutein-, Zeaxanthin- und β -Cryptoxanthinestern in Humanmilch und Serum durch eine Lipase aus *Candida rugosa*. Auch Capsanthinester wurden von der *C. rugosa*-Lipase als Substrat akzeptiert, wobei die Umsetzungen allerdings nicht quantitativ verliefen [BREITHAUPT, 2000].

Bei *P. sapidus* wurde hocheffiziente und nahezu quantitative Spaltung sowohl von Lutein- als auch Capsanthinestern beobachtet. Dabei konnte auf den Zusatz von Gallensalzen, die bei der enzymatischen Hydrolyse mit anderen Lipasen für die katalytische Aktivität unentbehrlich sind, verzichtet werden. Die Lipaseaktivität von *P. sapidus* war dabei im Kulturmedium lokalisiert [ZORN *et al.*, 2003b]. Der Carotinoidesterlipase konnte ein Molekulargewicht von 430 kDa zugeordnet werden [ZORN *et al.*, 2003b].

Zusätzlich zu der oben genannten konnte eine weitere neue Lipase aus *P. sapidus* charakterisiert werden. Das Enzym wies keine Aktivität zur Spaltung von Carotinoidestern auf, war jedoch in der Lage, die Hydrolyse des Emulgators Tween 80™ zu katalysieren (vgl. Testverfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Sorbitanestern, 3.4.2). Tween™ ist ein Warenzeichen der ICI America für Polyoxyethylenderivate der Sorbitanester (vgl. Bsp. in Abb. 5.13); bei Tween 80™ handelt es sich um ein Polyethoxysorbitanoleat. VEDDELER (2003) zeigte, daß neben *P. sapidus* noch weitere Basidiomyceten die Fähigkeit aufweisen, effektiv die Esterbindungen des Emulgators Tween 80™ zu spalten.

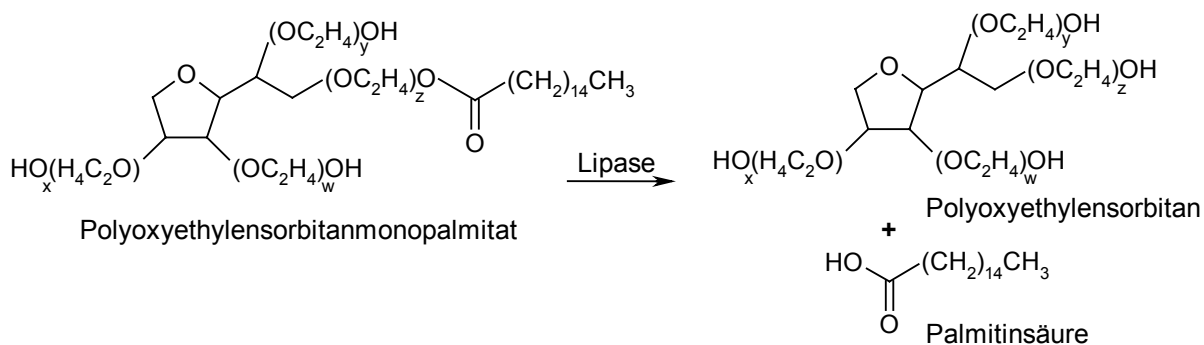


Abb. 5.13: Enzymatische Hydrolyse von Polyoxyethylsorbitanestern (Bsp.: Spaltung von Tween 40™ mittels Lipase zu Polyoxyethylsorbitan und Palmitinsäure)

Eine mittels IEC und GPC partiell gereinigte Enzymprobe wurde auf ein IEF-Gel aufgegeben. Es handelte sich hierbei nicht um die für die 2D-Gelelektrophorese benutzten IPG-Streifen, sondern um eine klassische, native isoelektrische Fokussierung in einer Flachbettkammer. Nach der Fokussierung wurde eine Spur mit einem Testagar zur Aktivitätsbestimmung (vgl. 3.4.2) überschichtet, während die übrigen mittels kolloidaler Coomassielösung gefärbt wurden. Die aktive Bande, der ein pI von 5,7 zugeordnet werden konnte, wurde aus dem IEF-Gel ausgeschnitten und nach denaturierender Probenvorbereitung direkt in die Auftragschamber eines SDS-PAGE-Gels überführt, um die Molekülgröße zu ermitteln (Abb. 4.42).

Die Kombination von klassischer IEF mit immobilisiertem pH-Gradienten und SDS-PAGE als Variante der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist in dieser Form in der Literatur bisher nicht beschrieben. Auf eine denaturierende IEF wurde zugunsten einer klassischen, nativen IEF verzichtet. Der Vorteil dieser Methode liegt zum einen darin, daß anhand von Vergleichsproteinen der pI des Enzyms bestimmt wurde. Zum anderen lag dadurch ein aktives Protein vor, dessen Bande auf dem Gel mittels Aktivitätstest genau zugeordnet werden konnte. Durch die denaturierende Aufarbeitung von Proteinen für die herkömmliche 2D-Gelelektrophorese werden Enzyme jedoch inaktiviert und damit eine genaue Zuordnung unmöglich. Zur Bestimmung der Molekülgröße wurde anschließend eine Trennung mittels SDS-PAGE durchgeführt.

Das Molekulargewicht der Lipase wurde anhand von Referenzproteinen zu ~55 kDa bestimmt. Es könnte sich bei dem Enzym um ein Dimer aus zwei gleich großen Untereinheiten handeln, da unter nativen Bedingungen ein Molekulargewicht von 101 kDa ermittelt wurde [ZORN *et al.*, 2003b]. Der Aufbau aus bis zu sechs Untereinheiten wurde auch für verschiedene Hefe- und Pilzlipasen (z.B. *Candida rugosa*, *Pythium ultimum*, *Neurospora crassa*) beschrieben [SAXENA *et al.*, 2003].

Das isolierte Enzym wurde aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Mittels ESI-MS/MS wurde eine *de novo*-Sequenzierung der tryptischen Fragmente durchgeführt. FASTA-Datenbankrecherchen [PEARSON & LIPMAN, 1988] ergaben für zwei der Fragmente signifikante Homologien zu einer Lipase aus *Geotrichum candidum* (SWALL: Q00884).

Basierend auf den ermittelten Aminosäuresequenzdaten können künftig Primer für eine PCR-Amplifikation der Lipase-cDNA erstellt werden. Die Überexpression des Strukturgens in einem geeigneten eukaryotischen Expressionssystem wie z.B. *Pichia pastoris* kann dann als Voraussetzung für eine Reindarstellung großer Enzymmengen für biotechnologische Anwendungen dienen.

5.9 Fazit und Ausblick

Die zweidimensionale Gelelektrophorese hat viele Eigenschaften, die sie für Proteomanalysen besonders geeignet machen. Sie ist hochauflösend und hochparallel: Es können bis zu 10^5 Komponenten in einem Gel gleichzeitig getrennt werden. Die 2D-Gelelektrophorese ist mit Detergenzien kompatibel und daher für alle Proteine universell einsetzbar, wie z.B. auch für die in der Regel hydrophoben Membranproteine. In einem einzigen Gel können Milligramm-Mengen von Proteinen präparativ getrennt werden.

Diesen Vorteilen gegenüber anderen Methoden stehen aber auch einige Limitationen entgegen. Die Reproduzierbarkeit der 2D-Gelelektrophorese ist zwar durch die Entwicklung der IEF mit immobilisierten pH-Gradienten verbessert worden, jedoch besitzt die Methode viele einzelne Arbeitsschritte, von denen jeder mit Fehlern vor allem durch den Anwender behaftet sein kann. So ist es nicht verwunderlich, daß unterschiedliche Anwender von der gleichen Probe unterschiedliche 2D-Muster erhalten. Es werden mittlerweile auch in großer Zahl Fertiggele für die zweite Dimension angeboten, diese sind jedoch noch recht teuer. Ein weiterer Nachteil ist, daß man nur einen Teil der Proteine erfaßt. Sehr große und sehr kleine gehen verloren, ebenso sehr basische und sehr saure. Selbst bei kleinen Genomen wie dem der Hefe erfaßt die 2D-Gelelektrophorese im besten Falle zwei Drittel aller exprimierten Proteine [LINK *et al.*, 1997]. 2D-PAGE-Muster, die aus Daten vollständig sequenzierter Genome theoretisch berechnet wurden, zeigen, daß sich der Hauptanteil der Proteine eines Zelllysates in einem pI-Bereich zwischen 4 und 9 befindet, während außerdem eine nicht zu

vernachlässigende Anzahl von Proteinen mit isoelektrischen Punkten bis zu 12 erwartet wird [HIMMELREICH *et al.*, 1996].

Seltene Proteine lassen sich oft schlecht erfassen. Zwar können große Proteinmengen aufgeladen werden und mit einer empfindlichen Methode angefärbt werden. In den Gelen sind die *Spots* nach einer Gauß-Kurve verteilt, d.h. die *Spots* der häufigen Proteine nehmen bei empfindlichen Färbemethoden viel Platz ein und überdecken die *Spots* der seltenen Proteine. Es kommt hinzu, daß sich natürlich nicht alle Proteine gleich gut anfärben lassen. Die Färbungsintensität ist je nach Eigenschaft des Proteins spezifisch und kann von Protein zu Protein sehr unterschiedlich sein. Für die gleichzeitige Quantifizierung von Proteinen, die einige Prozent des Gesamtproteins einer Zelle ausmachen und denjenigen, die oft nur in wenigen Kopien vorhanden sind, wäre ein dynamischer Bereich von mindestens 10^6 notwendig. Der reale dynamische Bereich liegt jedoch eher bei 10^3 [WILKINS *et al.*, 1998; HERBERT, 1999].

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß die hochauflösende zweidimensionale Gelelektrophorese für die Analyse eines Sekretoms, d.h. sämtliche in die Umgebung abgegebenen Proteine, gut geeignet ist. Es werden wesentlich mehr Proteine von einem Basidiomyceten wie *P. sapidus* oder *L. irina* in das Kulturmedium sekretiert, als zunächst anzunehmen ist. Denn die dargestellte Anzahl von *Spots* würde nicht erreicht, auch wenn jedem bisher bekannten extrazellulären Enzym mehrere Isoenzyme zuzuordnen wären.

Die Reproduzierbarkeit der Methode konnte gezeigt werden. Entscheidend ist die Konstanz der Bedingungen von der Stammkultur bis zum gefärbten Gel, die streng einzuhalten ist. Wünschenswert wäre eine Aufarbeitung der Kulturmedien in weniger Schritten, um Proteinverluste zu vermeiden.

Die aus den ESI-MS/MS-Daten erstellten Primer für die PCR sind wertvolle Ausgangswerkzeuge für eine weitere Charakterisierung der gefundenen Proteine. Noch wichtiger aber wäre eine vollständige Sequenzierung des *P. sapidus*-Genoms, um die Identifizierung der Proteine zu vereinfachen und zu beschleunigen.

6 LITERATUR

- ABRAHAM, B. (1994). Flüchtige Metabolite in Submerskulturen ligninolytischer Pilze (Klasse Basidiomycetes). Dissertation Universität Hannover.
- ADAMS, M.D.; Kelley, J.M.; Gocayne, J.D.; Dubnick, M.; Polymeropoulos, M.H.; Xiao, H.; Merrill, C.R.; Wu, A.; Olde, B.; Moreno, R.F. *et al.* (1991). Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science* **252**: 1651-1656
- ADLER, E. (1977). Lignin chemistry – past, present and future. *Wood Sci. Technol.* **11**: 169-218
- AIGNER, A.; Schrimpf, G.; Bangsow, T.; Czubayko, F. & Dechert, Ute (2002). *Gentechnische Methoden*. 3. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin.
- AMERSHAM Pharmacia Biotech (1998). 2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients – Principles & Methods.
- ANDER, P.; Mishra, C.; Farrell, R. & Eriksson, K.-E.L. (1990). Redox reactions in lignin degradation: Interactions between laccase, different peroxidases and cellobiose: quinone oxidoreductase. *J. Biotechnol.* **13**: 189-198.
- APOGA, D.; Ek, B. & Tunlid, A. (2001). Analysis of proteins in the extracellular matrix of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* using 2-D gel electrophoresis and MS/MS. *FEMS Microbiol. Lett.* **197**(2): 145-150
- ARAMAYO, R. & Timberlake, W.E. (1990). Sequence and molecular structure of the *Aspergillus nidulans* *yA* (laccase I) gene. *Nucleic Acids Res.* **18**(11): 3415
- ARNOLD, R.G.; Shahani, K.M. & Dwivedi, B.K. (1975). Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. *J. Dairy Sci.* **58**: 1127-1143
- AROMENVERORDNUNG vom 22.12.1982 (BGBl. I S. 1625), zuletzt geändert durch Art. 1 VO zur Änd. der AromenVO und zur Aufhebung lebensmittelrechtl. Vorschriften für Teigwaren v. 18.6.2001 (BGBl. I S. 1178).
- ASTHER, M. & Corrieu, G. (1987). Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 245-249
- AUTERHOFF, H.; Kuehl, J. (1966). Guaiac resins. I. Principle of the blue-color reaction. *Arch. Pharm.* **299**(7): 618-26
- BALAKSHIN, M.; Chen, C.-L.; Gratzl, J.S.; Kirkman, A.G. & Jakob, H. (1998). *Kinetics of pulp delignification with laccase-mediator system*. In: 5th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp Conference Proceedings, Aveiro, Portugal. S. 585-588
- BAMINGER, U.; Ludwig, R.; Galhaup, C.; Leitner, C.; Kulbe, K.D. & Haltrich, D. (2001). Continuous enzymatic regeneration of redox mediators used in biotransformation reactions employing flavoproteins. *J. Mol. Cat. B Enzym.* **11**: 541-550
- BANNWARTH, W. (1989). Bathophenanthroline-Ru(II) complexes as nonradioactive labels for dideoxy DNA sequencing. *Anal. Biochem.* **181**: 216-219

- BELITZ, H.-D. & Grosch, W. (1992). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 4. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- BERGER, R.G. (1991). *Genetic engineering III: food flavours*. In: Hui, Y.H. (Ed.) *Encyclopedia of food science and technology*. Wiley, New York.
- BERGMEYER, H.U. (1970). *Methoden der enzymatischen Analyse*. 2. Auflage, VCH, Weinheim
- BDSI (Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V.). Produktion von Knabberartikeln 2002. Bonn 07/2003
- BIESALSKI, H.K.; Hemmes, C.; Hopfenmüller, W.; Schmid, C. & Gollnick, H.P.M. (1996). Effects of controlled exposure of sunlight on plasma and skin levels of β -carotene. *Free Rad. Res.* **24**:215-224
- BJELLQVIST, B.; Ek, K.; Righetti, P.G.; Gianazza, E.; Goerg, A.; Westermeier, R. & Postel, W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **6**(4): 317-339
- BORDINI, E.; Hamdan, M. & Righetti, P.G. (1999a). Probing the reactivity of S-S bridges to acrylamide in some proteins under high pH conditions by matrix-assisted laser desorption/ionisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**(18): 1818-1827
- BORDINI, E.; Hamdan, M. & Righetti, P.G. (1999b). Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry for monitoring alkylation of beta-lactoglobulin B exposed to a series of N-substituted acrylamide monomers. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**(21): 2209-2215
- BORDINI, E.; Hamdan, M. & Righetti, P.G. (2000a). Assessment of the kinetics and sites of reaction of some immobiline chemicals with proteins and peptides by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**(13): 1141-1148
- BORDINI, E.; Hamdan, M. & Righetti, P.G. (2000b). Alkylation power of free Immobiline chemicals towards proteins in isoelectric focusing and two-dimensional maps, as explored by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**(14): 2911-2918
- BORGSTRÖM, B. & Brockman, H.L. (Eds.) (1984). *Lipases*. Elsevier, Amsterdam.
- BOYE, J.I. (1999). Protein-polyphenol interactions in fruit juices. *Rec. Res. Dev. Agric. Food Chem.* **3**(1): 85-107
- BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- BREITHAUPT, D.E. (2000). Enzymatic hydrolysis of carotenoid fatty acid esters of red pepper (*Capsicum annuum* L.) by a lipase from *Candida rugosa*. *Z. Naturforsch.* **55C**:971-976
- BRENNA, O. & Bianchi, E. (1994). Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine. *Biotechnol. Lett.* **16**: 35

- BROCKERHOFF, H. & Jensen, R.G. (1974). *Lipolytic Enzymes*. Academic Press, Orlando, Florida.
- BUCKENHÜSKES, H.J. (1999). Aktuelle Anforderungen an Paprikapulver für die industrielle Verarbeitung. *Z. Arzn. Gew.pfl.* **4**:111-118
- BUGG, T. (1997). *An Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry*. Blackwell Science, Oxford
- CAMARERO, S.; Böckle, B.; Martinez, M.J. & Martinez, A.T. (1996). Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. *Appl. Environ. Microb.* **62**:1070-1072
- CHAPON, L. (1996). Protein sensitivity of beers. The present level in research. Part 2. Protein/tannin interaction. *Monatsschr. Brauwiss.* **49**(1/2): 12-18
- CHEVALLET, M.; Santoni, V.; Poinas, A.; Rouquie, D.; Fuchs, A.; Kieffer, S.; Rossignol, M.; Lunardi, J.; Garin, J. & Rabilloud, T. (1998). New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**(11): 1901-1909
- CHILDS, E. & Abajian, A. (1976). Physico-chemical characterization of peanut hull as potential fiber additive. *J. Food Science* **41**: 1235-1236
- CHO, S.S. & Dreher, M.L. (2001). *Handbook of Dietary Fiber, Food Science and Technology*. Marcel Dekker, New York, Basel.
- CHODAT, V. R. (1912). Oxidizing Enzymes. *Archives des Sciences Physiques et Naturelles* **33**: 225-248
- CHRISTAKOPOULOS, P.; Tzia, C.; Kekos, D. & Marcis, B.J. (1992). Production of extracellular lipase from *Calvatia gigantea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:194-197
- COLLINS, P.J. & Dobson, A.D. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3444-3450
- DAVIS, B.J. (1964). Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**(2): 404-427
- DE JONG, E.; De Vries F.P.; Field J.A.; Van der Zwan, R.P. & De Bont, J.A. (1992). Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidase activity. *Mycol. Res.* **96**: 1098-1104
- DEREWENDA, U.; Swenson, L.; Green, R.; Wei, Y.; Yamafudi, S.; Joeger, R.; Haas, M.J. & Derewenda, Z.S. (1994). Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng.* **7**: 551-557
- DILL, I. & Kraepelin, G. (1988). Degradation of lignin/cellulose by white-rot fungi: influence of specific ecological factors. *Forum Mikrobiol.* **11**: 484-489
- DOE JOINT GENOME INSTITUTE (2002). Phanerochaete chrysosporium v1.0. Im Internet unter <http://genome.jgi-psf.org/whiterot/whiterot1.home.html> (28.02.2004)
- DON, R.H.; Cox, P.T.; Wainwright, B.J.; Baker, K. & Mattick, J.S. (1991). ‚Touchdown‘ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* **19**: 4008

- DOUMAS, A.; Van Den Broek, P.; Affolter, M. & Monod, M.. Characterization of the prolyl dipeptidyl peptidase gene (DPPIV) from the koji mold *Aspergillus oryzae*. *Appl. Env. Microbiol.* **64**(12): 4809-4815
- DOWNEY, W.K. & Andrews, P. (1965). Gel filtration applied to the study of lipases and other esterases. *Biochem. J.* **94**(1): 642
- DUMONCEAUX, T.; Bartholomew, K.; Valeanu, L.; Charles, T. & Archibald, F. (2001). Cellobiose dehydrogenase is essential for wood invasion and nonessential for kraft pulp delignification by *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* **29**: 478-489
- DSM (2001). DSM determines DNA sequence of *Aspergillus niger* genome (20.12.2001). Im Internet unter <http://www.dsm.com/newsarchive>
- EASTWOOD, M.A. (1974). Dietary fibre in human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **25**(12): 1523-1527
- EGGERT, C.; Temp, U. & Eriksson, K.-E.L. (1996). Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase. *ACS Symp. Ser.* **655**: 130-150
- FENGEL, D. & Wegener, G. (1984). *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. De Gruyter, Berlin.
- FIEDUREK, J. & Ilczuk, Z. (1992). Isolation and screening of glucose oxidase producing microorganisms from natural sources. *Acta Microbiol. Polonica* **41**(3-4): 179-186
- FIEDUREK, J.; Gromada, A. & Szczodrak, J. (1994). Glucose oxidase biosynthesis using mycelium of *Aspergillus niger* immobilized on seeds. *Microbiol. Res.* **149**(4): 425-428
- FLETCHER, D.L. & Papa, C.M. (1986). The effect of saponification on the broiler coloring capability of marigold extracts. *Poult. Sci.* **65**:1708-1714
- FUKUSHIMA, R.S. & Hatfield, R.D. (2001). Extraction and isolation of lignin for the utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *J. Agric. Food Chem.* **49**(7): 3133-3139
- GALHAUP, C. & Haltrich, D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; published online: 18.05.2001; DOI 10.1007/s002530100636.
- GALKIN, S.; Vares, T.; Kalsi, M. & Hatakka, A. (1998). Production of organic acids by different white rot fungi as detected using capillary zone electrophoresis. *Biotechnol. Tech.* **12**: 267-271
- GALVANI, M.; Hamdan, M. & Righetti, P.G. (2000). Investigating the reaction of a number of gel electrophoresis cross-linkers with beta-lactoglobulin by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**(17): 3648-3692
- GALVANI, M.; Hamdan, M.; Herbert, B. & Righetti, P.G. (2001a). Alkylation kinetics of proteins in preparation for two-dimensional maps: A matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry investigation. *Electrophoresis* **22**: 2058-2065
- GALVANI, M.; Rovatti, L.; Hamdan, M.; Herbert, B. & Righetti, P.G. (2001b). Protein alkylation in the presence/absence of thiourea in proteome analysis: A matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry investigation. *Electrophoresis* **22**: 2066-2074

- GARCIA, O.; Camarero, S.; Colom, J.F.; Martinez, A.T.; Martinez, M.J.; Monje, R. & Vidal, T. (2003). Optimization of a Laccase-Mediator Stage for TCF Bleaching of Flax Pulp. *Holzforschung* **57**: 513–519
- GERMANN, U.A.; Müller, G.; Hunziker, P.E. & Lerch, K. (1988). Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. *J. Biol. Chem.* **263**: 885-896
- GEVAERT, K. & Vandekerckhove, J. (2000). Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* **21**: 1145-1154
- GIANFREDA, L.; Xu, F. & Bollag, J.-M. (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem. J.* **3**: 1-25
- GIARDINA, P.; Aurilia, V.; Cannio, R.; Marzullo, L.; Amoresano, A.; Siciliano, R.; Pucci, P. & Sannia, G. (1996). The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Biochem.* **235**: 508-515
- GIARDINA, P.; Palmieri, G.; Scaloni, A.; Fontanella, B.; Faraco, V.; Cennamo, G. & Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. J.* **341**: 655-663
- GIOVANNUCCI, E.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; Hunter, D.J.; Fuchs, C.; Rosner, B.A.; Speizer, F.E. & Willett W.C. (1998). Multivitamin use, folate, and colon cancer in women in the nurses' health study. *Ann. Intern. Med.* **129**: 517-524
- GLENN, J.K.; Akileswaran, L. & Gold, M.H. (1986). Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **251**: 688-696
- GLUMHOFF, T.; Harvey, P.J.; Molinari, S.; Goble, M.; Frank, G.; Palmer, J.M.; Smit, J.D. & Leisola, M.S. (1990). Lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Molecular and kinetic characterization of isozymes. *Eur. J. Biochem.* **187**: 515-520
- GÖRG, A.; Postel, W.; Domscheit, A. & Günther, S. (1988). Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients of leaf proteins from barley (*Hordeum vulgare*): method, reproducibility and genetic aspects. *Electrophoresis* **9**(11): 681-692
- GÖRG, A. & Westermeier, R. (1998). Elektrophoretische Verfahren. In: Lottspeich, F.; Zorbas, H. (Hrsg.) *Bioanalytik*. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, S. 217-252
- GÖRG, A.; Obermaier, C.; Boguth, G.; Harder, A.; Scheibe, B.; Wildgruber, R. & Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**: 1037-1053
- GOMEZ-ALARCON, G.; Saiz-Jimenez, C. & Lahoz, R. (1989). Influence of Tween 80 on the secretion of some enzymes in stationary cultures of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbios* **60**(244-245): 183-192
- GOMEZ-TORIBIO, V.; Martinez, A.T.; Martinez, M.J. & Guillen, F. (2001). Oxidation of hydroquinones by the versatile lignolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii* – H₂O₂ generation and influence of Mn²⁺. *Eur. J. Biochem.* **268**: 4787-4793

- GOOLEY, A.A. & Packer, N.H. (1997) in: Wilkins, M.R.; Williams, K.L.; Appel, R.D.; Hochstrasser, D.F. (Eds.) *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer, Berlin, S. 35-64
- GRAHAM, G.; Nairn, R.S. & Bates G.W. (1978). Polyacrylamide gel staining with Fe^{2+} -bathophenanthroline sulfonate. *Anal. Biochem.* **88**: 434-441
- GROENQVIST, S.; Suurnaekki, A.; Niku-Paavola, M.-L.; Kruus, K.; Buchert, J. & Viikari, L. (2003) Lignocellulose processing with oxidative enzymes. *ACS Symp. Ser.* **855** (Applications of Enzymes to Lignocellulosics): 46-65
- GUETTLER, S.; Jackson, E.N.; Lucchese, S.A.; Honaas, L.; Green, A.; Hittinger, C.T.; Tian, Y.; Lilly, W.W. & Gathman, A.C. (2002). ESTs from the basidiomycete *Schizophyllum commune* on nitrogen-replete and nitrogen-limited media. *Fungal Gen. Biol.* **39**(2): 191-198
- GUTFINGER, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**: 966-968
- HA, H-C.; Honda, Y.; Watanabe, T. & Kuwahara, M. (2001). Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**(6): 704-711
- HAAS, R.; Scheibner, K. & Hofrichter, M. (2003). Degradation of organo-arsenical chemical warfare agents by fungal enzyme manganese peroxidase. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* **15**(4): 224-226
- HÄRTIG, C. & Lorbeer, H. (1993). Phenomenological principles of microbial lignin degradation. *Acta Biotechnol.* **13**: 31-40
- HALLBERG, B.M.; Henriksson, G.; Pettersson, G.; Vasella, A. & Divne, C. (2003). Mechanism of the Reductive Half-reaction in Cellobiose Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **278**(9): 7160-7166
- HARI, V. (1981). A method for the two-dimensional electrophoresis of leaf proteins. *Anal. Biochem.* **113**(2): 332-335
- HATAKKA, A. (1994). Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 125-135
- HATAKKA, A. (2001). Biodegradation of Lignin. In: Hofrichter, M.; Steinbüchel, A. (Eds.) *Lignin, humic substances and coal*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 129-180
- HATFIELD, R.D.; Grabber, J.; Ralph, J. & Brei, K. (1999). Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: Some cautionary notes. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 628-632
- HATZINIKOLAOU, D.G.; Macris, J.B.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Kolisis, F.N. & Fountoukidis, G. (1996). Production and partial characterisation of extracellular lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* **18**: 547-552
- HAYASHI, R. & Nakashiro, M. (1989). Dipeptidyl peptidase assay in food industries. Japanisches Patent JP 01281100
- HAYASHI, K. & Izawa, N. (1996). Cloning of gene for amino peptidase of *Aeromonas caviae* for food processing. Japanisches Patent JP 08173168

- HEINFLING, A.; Ruiz-Duenas, J.; Martinez, M.J.; Bergbauer, M.; Szewzyk, U. & Martinez, A.T. (1998). A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* **428**: 141-146
- HENCKEN, H. (1992). Chemical and physiological behaviour of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poult. Sci.* **71**: 711-717
- HENRIKSSON, G.; Sild, V.; Szabo, I.J.; Pettersson, G. & Johansson, G. (1998). Substrate specificity of cellobiose dehydrogenase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1383**(1): 48-54
- HENSON, J.M.; Butler, M.J. & Day A.W. (1999). The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* **37**: 447-471
- HERBERT, B.; Galvani, M.; Hamdan, M.; Olivieri, E.; MacCarthy, J.; Pedersen, S. & Righetti, P.G. (2001). Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: Why, when, and how? *Electrophoresis* **22**: 2046-2057
- HERBERT, B.; Hopwood, F.; Oxley, D.; McCarthy, J.; Laver, M.; Grinyer, J.; Goodall, A.; Williams, K.; Castagna, A. & Righetti, P.G. (2003). Beta-elimination: an unexpected artefact in proteome analysis. *Proteomics*. **3**(6): 826-31
- HEUKESHOVEN, J. & Dernick, R. (1985). Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**: 103-112
- HIGGINS, D.; Thompson, J.; Gibson, T.; Thompson, J.D.; Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680. Im Internet unter <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> (29.01.2004)
- HIGHLEY, T.L. & Micales, J.A. (1990). Effect of aromatic monomers on production of carbohydrates-degrading enzymes by white-rot and brown-rot fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **66**: 15-22
- HIGUCHI, T. (1986). Catabolic Pathways and Role of Ligninases for the Degradation of Lignin Substructure Models by White-Rot Fungi. *Wood Res.* **73**: 58-81
- HIMMELREICH, R.; Hilbert, H.; Plagens, H.; Pirkel, E.; Li, B.-C. & Hermann, R. (1996). Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 1996, **24**, 4420-4449
- HIGUCHI, T. (1993). Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. *J. Biotechnol.* **30**: 1-8
- HIROHARA, H.S.; Mitsuda, S.; Ando, E. & Kanki, R. (1985). *Enzymatic preparation of optically active alcohols related to synthetic pyrethroid insecticides*. In: Biocatalyst in Organic Synthesis (Tramper, J.; van der Plas, H.C. & Linko, P. (Eds.)) Elsevier, Amsterdam.
- HJERTEN, S. (1962). New method for preparation of agarose for gel electro-phoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **62**: 445-449
- HOFRICHTER, M.; Vares, T.; Kalsi, M.; Galkin, S.; Scheibner, K.; Fritsche, W. & Hatakka, A. (1999). Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of

- ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1864-1870
- HOFRICHTER, M. & Steinbüchel, A. (2001). *Biopolymers*. Wiley-VCH, Weinheim
- HUYNH, V.B.; Paszczynski, A.; Olson, P. & Crawford, R. (1986). Transformations of arylpropane lignin model compounds by a lignin peroxidase of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**(1): 186-196
- ICHISHIMA, E.; Yamane, A.; Nitta, T.; Kinoshita, M.; Nikkuni, S.; Oka, T. & Yokoyama, S. (1973). Production of a new type of acid carboxypeptidase of molds of the *Aspergillus niger* group. *Appl. Microbiol.* **26**(3): 327-331
- IIMURA, Y.; Ikeda, S.; Sonoki, T.; Hayakawa, T.; Kajita, S.; Kimbara, K.; Tatsumi, K. & Katayama, Y. (2002). Expression of a gene for Mn-Peroxidase from *Coriolus versicolor* in transgenic tobacco generates potential tools for phytoremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 246-251
- IWAI, M. & Tsujisaka, Y. (1974). The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 1241-1247
- IWAI, M. & Tsujisaka, Y. (1984). *Fungal lipase*. In: Borgström B. & Brockman, H.L. (Eds.), *Lipases*. Elsevier, Amsterdam
- JAEGER, K.-E. & Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**: 396-403
- KALUSKAR, V.M.; Kapadnis, B.P.; Jaspers, Ch. & Penninckx, M.J. (1999). Production of laccase of immobilized cells of *Agaricus sp.*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **76**: 161-170
- KARAHANIAN, E.; Corsini, G.; Lobos, S. & Vicuña, R. (1998). Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biochim. Biophys. Acta* **1443**: 65-74
- KATSIVELA, E.; Kleppe, F.; Lang, S. & Wagner, F. (1995). *Ustilago maydis* lipase I. Hydrolysis and ester-synthesis activities of crude enzyme preparation. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 739-745
- KELSAY, J.L. (1978). A review of research on effects of fiber intake on man. *Am. J. Clin. Nutr.* **31**(1): 142-159
- KERR, T.; Benner, R.; Woodward, J.; Rigsby, W. & Windham, W. (1986). Chemical composition and in vitro digestibility of biologically degraded peanut hulls. *J. Sci. Food Agric.* **37**: 637-651
- KERSTEN, P.J.; Kalyanaraman, B.; Hammel, K.E.; Reinhammar, B. & Kirk, T.K. (1990). Comparison of lignin peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. *Biochem. J.* **268**: 475-480
- KHACHIK, F.; Spangler, C.J. & Smith Jr., J.C. (1997). Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *J. Agric. Food Chem.* **69**: 1873-1881
- KIRK, T.K. & Farrell, R.L. (1987). Enzymatic „combustion“: The microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 465-505

- KRATOCHVIL, J.F.; Burris, R.H.; Seikel, M.K. & Harkin J.M. (1971). "Isolation and characterization of alpha guaiaconic acid and the nature of guaiacum Blue," *Phytochem.* **10**: 2529-2531
- KRCMAR, P.; Kubatova, A.; Votruba, J.; Erbanova, P.; Novotny, C. & Sasek, V. (1999). Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **15**(2): 237-242
- KROLL, J. (1991). *Lipolytische Enzyme*. In: Ruttloff, H. (Ed.), *Lebensmittelbiotechnologie*. Akademie-Verlag, Berlin
- KUPLETSKAYA, M.B. & Kurakov, A.V. (1999). Microscopic filamentous fungi as producers of glucose oxidase. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya* **35**(2): 160-164
- KUWAHARA, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A. & Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **169**: 247-250
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685
- LANDRUM, J.T. & Bone, R.A. (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**: 28-40
- LEHMANN, Y.; Meile, L. & Teuber, M. (1996). Rubrerythrin from *Clostridium perfringens*: Cloning of the gene, purification of the protein, and characterization of its superoxide dismutase function. *J. Bacteriol.* **178**: 7152-7158
- LEONOWICZ, A.; Cho, N.-S.; Wojtaś-Wasilewska, M.; Rogalski, J. & Luterek, J. (1997). Enzymes of white-rot fungi cooperate in biodeterioration of lignin barrier. *J. Kor. Wood Sci. Technol.* **25**: 1-20
- LEONOWICZ, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J.; Ziegenhagen, D.; Wojtaś-Wasilewska, M.; Cho, N.-S.; Hofrichter, M. & Rogalski, J.; (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology.* **27**: 175-185
- LI, D.; Alic, M. & Gold, M.H. (1994). Nitrogen regulation of lignin peroxidase gene transcription. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(9): 3447-3449
- LIN, S. & Dence, W.D. (1992). *Methods in Lignin Chemistry*. Springer, Heidelberg, Berlin, New York.
- LINK, A.J.; Robison, K. & Church, G.M. (1997). Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis* **18**: 1259-1313
- LIU, Y.; Xu, M.J. & Canfield, L.M. (1998). Enzymatic hydrolysis, extraction, and quantitation of retinol and major carotenoids in mature human milk. *J. Nutr. Biochem.* **9**: 178-183
- LOWRY, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- LYR, H. (1958). Detection of oxidases and peroxidases in higher fungi and the significance of these enzymes for the reaction of Bavendam. *Planta* **50**: 359-70

- MACRAE, A.R. (1983). Lipase catalyzed interesterification of oils and fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60**: 291-294
- MAJCHERCZYK, A.; Johannes, C. & Hüttermann, A. (1999). Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 267-276
- MASUDA-NISHIMURA, I.; Ichikawa, K.; Hatamoto, O.; Abe, K. & Koyama, Y. (1999). cDNA cloning of bilirubin oxidase from *Pleurotus ostreatus* strain Shinshu and its expression in *Aspergillus sojae*: an efficient screening of transformants, using the laccase activity of bilirubin oxidase. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45**: 93-97
- MATTOO, R.L.; Ishaq, M. & Saleemuddin, M. (1987). Protein assay by Coomassie Brilliant Blue G-250 binding method is unsuitable for plant tissues rich in phenols and phenolases. *Anal. Biochem.* **163**(2): 376-384
- MARGOLIS, J. & Kenrick, K.G. (1967). Polyacrylamide gel-electrophoresis across a molecular sieve gradient. *Nature* **214**(5095): 1334-1336
- MARLETT, J.A.; McBurney, M.I. & Slavin, J.L. (2002). Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J. Am. Diet Assoc.* **102**(7): 993-1000
- MCCORD, J.M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6054
- MERRIL, C.R. & Washart, K.M. (1998) in: Hames, B.D. (Ed.) *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, S. 53-91
- MOLLOY, M.P.; Herbert, B.R.; Walsh, B.J.; Tyler, M.I.; Traini, M.; Sanchez, J.C.; Hochstrasser, D.F.; Williams, K.L. & Gooley, A.A. (1998). Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**(5): 837-844
- MOLLOY, M.P.; Herbert, B.R.; Slade, M.B.; Rabilloud, T.; Nouwens, A.S.; Williams, K.L. & Gooley, A.A. (2000). Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.* **267**(10): 2871-2881
- MOREIRA, M.T.; Feijoo, G.; Canaval, J. & Lema, J.M. (2003). Semipilot-scale bleaching of Kraft pulp with manganese peroxide. *Wood Sci. Technol.* **37**(2): 117-123
- MUKHERJEE, K.D. (1992). Gewinnung wertvoller Lipide mit Hilfe enzymatischer Reaktionen. *Fat Sci. Technol.* **94**: 542-546
- MULLIS, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.
- MUNOZ, C.; Guillen, F.; Martinez, A.T. & Martinez, M.J. (1997). Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2166-2174
- MURAO, S. & Shin, T. (1996). Preparation of tripeptidyl peptidase of *Streptomyces herbaricolor* and its applications in food industries. Japanischen Patent JP 08308565
- MILSTEIN, O.; Hüttermann, A.; Majcherczyk, A. & Schulte, K. (1993). Transformation of lignin-related compounds with laccase in organic solvents. *J. Biotechnol.* **30**: 37-47

- NAKADAI, T.; Nasuno, S. & Iguchi, N. (1972). Purification and properties of acid carboxypeptidase III from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **36**(9): 1481-1488
- NEUHOFF, V.; Arold, N.; Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255-262.
- NEUHOFF, V.; Stamm, R.; Pardowitz, I.; Arold, N.; Ehrhardt, W. & Taube, D. (1990). Essential problems in quantification of proteins following colloidal staining with coomassie brilliant blue dyes in polyacrylamide gels, and their solution. *Electrophoresis* **11**: 101-117.
- NEUJAHN, H.Y. & Kjelle'n, K.G. (1979). Bioprobe electrode for phenol. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 671-678
- NUERO, O.M.; Garcia-Lepe, R.; Lahoz, C.; Santamaria, F. & Reyes, F. (1994). Detection of lipase activity on ultrathin-layer isoelectric focusing gels. *Anal. Biochem.* **222**: 503-505
- ODIER, E.; Artaud, I. & Winkelmann, G. (Hrsg.) (1992). *Microbial Degradation of Natural Products, 6. Degradation of lignin*. VCH, Weinheim, S. 161-191
- O'FARRELL, P.H. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* **250**(10): 4007-4021
- OLMEDILLA, B.; Granado, F.; Blanco, I.; Vaquero, M. & Cajigal, C. (2001). Lutein in patients with cataracts and age related macular degenerations: a long term supplementation study. *J. Sci. Food Agric.* **81**: 904-909
- ORNSTEIN, L. (1964). Disk electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**(2): 321-349
- OSPINA-GIRALDO, M.D.; Collopy, P.D.; Romaine, C.P. & Royse, D.J. (2000). Classification of Sequences Expressed during the Primordial and Basidiome Stages of the Cultivated Mushroom *Agaricus bisporus*. *Fungal Gen. Biol.* **29**: 81-94
- PALMIERI, G.; Giardina, P.; Marzullo, L.; Desiderio, B.; Nitti, G.; Cannio, R. & Sannia, G. (1993). Stability and activity of a phenol oxidase from the lignolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 632-636
- PALMIERI, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Scaloni, A.; Capasso, A. & Sannia, G. (1997). A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* **272**(50): 31301-31307
- PALMIERI, G.; Giardina, P.; Bianco, C.; Fontanella, B. & Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 920-924
- PAYEN, A.M. (1838). Mémoire sur la composition du tissu des plantes et du ligneux. *Compt. Rend.* **7**: 1052-1056
- PEARSON, W.R. & Lipman, D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448

- PERDEW, G.H.; Schaup, H.W. & Selivonchick, D.P. (1983). The use of a zwitterionic detergent in two-dimensional gel electrophoresis of trout liver microsomes. *Anal. Biochem.* **135**(2): 453-455
- PERRY, C.R.; Smith, M.; Britnell, C.H.; Wood, D.A. & Thurston, C.F. (1993). Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**(6): 1209-1218
- POEHLING, H. & Neuhoff, V. (1981). Visualization of proteins with a silver stain: a critical analysis. *Electrophoresis* **2**: 141-147
- POLACHEK, I. & Cabib, E. (1981). A simple procedure for protein determination by the Lowry method in dilute solutions and in the presence of interfering substances. *Anal. Biochem.* **117**: 311-314
- POLIS, B.D. & Shmukler, H.W. (1953). Crystalline lactoperoxidase. I. Isolation by displacement chromatography. II. Physicochemical and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* **201**(1): 475-500
- POTTHAST, A.T.; Rosenau, T.; Chen, C.-L. & Gratzl, J.S. (1995). Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes. *J. Org. Chem.* **60**: 4320-4321
- PRABHAKAR, T.; Kumar, K.A. & Ellaiah, P. (2002). The effect of cultural conditions on the production of lipase by fungi. *J. Sci. Ind. Res.* **61**: 123-127
- RABILLOU, T. (1998). Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **19**(5): 758-760
- RABILLOU, T. & Charmont, S. (2000). Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In: Rabilloud, T. (Hrsg.) *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Detection Methods*. Springer, Berlin, S. 107-126
- RABILLOU, T.; Strub, J.-M.; Luche, S.; van Dorsselaer, A. & Lunardi, J. (2001). A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* **1**: 699-704
- RAGHUKUMAR, C.; D'Souza, T.M.; Thorn, R.G. & Reddy, C.A. (1999). Lignin-Modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(5): 2103-2111
- RAPP, P. & Backhaus, S. (1992). Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. *Enzyme Microbiol. Technol.* **14**: 938-943
- RAYMOND, S. & Weintraub, L. (1959). Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**: 711
- REINHAMMAR, B. & Malstrom, B.G. (1981). *Copper Proteins (Metal Ions in Biology)*, Spiro, T.G. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc., New York; S. 109-149
- RENARD, C.M.G.C.; Baron, A.; Guyot, S. & Drilleau, J.-F. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *Int. J. Biol. Macromol.* **29**(2): 115-125
- RICHTER, G. (1988). *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Thieme, Stuttgart.
- RÖMPP Chemie Lexikon (1995). Hrsg.: Falbe, J.; Regitz, M.; Thieme, Stuttgart, New York.

- ROUX, K.H. (1995). Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl.* **4**: 5185-5194
- ROZEN, S. & Skaletsky, H.J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.; Misener, S. (Eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, S. 365-386. Im Internet unter http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html (29.01.2004)
- RUIZ-DUENAS, F.J.; Martinez, M.J. & Martinez, A.T. (1999). Molecular characterisation of a novel peroxidase from the lignolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* **31**: 223-235
- RUIZ-DUENAS, F.J.; Camarero, S.; Perez-Boada, M.; Martinez, M.J. & Martinez, A.T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochem. Soc. Trans.* **29**: 116-122
- RYPACEK, V. (1966). *Biologie holzzerstörender Pilze*. Fischer, Jena.
- SAIKI, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491
- SAMBROOK, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor.
- SANTONI, V.; Rabilloud, T.; Doumas, P.; Rouquie, D.; Fuchs, A.; Kieffer, S.; Garin, J. & Rossignol, M. (1999). Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* **20**(4-5): 705-711
- SARIOGLU, H.; Lottspeich, F.; Walk, T.; Jung, G. & Eckerskorn, C. (2000). Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins. *Electrophoresis* **21**(11): 2209-2218
- SARKANEN, K.V. & Ludwig, C.H. (Eds.) (1971): *Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions*. Wiley Interscience, New York
- SARKAR, S.; Martinez, A.T. & Martinez, M.J. (1997). Biochemical and molecular characterisation of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1339**: 23-30
- SAVARY, P. & Desnuelle, P. (1956) Specificity in the enzymic hydrolysis of triglycerides. *Biochem. Biophys. Acta* **21**: 349-360
- SAXENA, R.K.; Sheoran, A., Giri, B. & Davidson, W.S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods* **52**: 1-18
- SCHMID, R.D. & Verger, R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**: 1608-1633
- SCHULTZ, E.; Chamuris, G.P. & Dallabrida, S. (1996). Screening wood- and bark-inhabiting Basidiomycetes for esterase activity in liquid stationary culture. *Mycologia* **88**: 831-838
- SCOTT, G.M. & Akhtar, M. (2001). Biotechnological applications of lignin-degrading fungi (white-rot fungi). In: Hofrichter, M.; Steinbüchel, A. (Eds.) *Lignin, humic substances and coal*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 181-207

- SEDARATI, M.R.; Keshavarz, T.; Leontievsky, A.A. & Evans, C.S. (2003). Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. *Electronic J. Biotechnol.* **6**(2)
- SHAPIRO, A.L.; Vinuela, E. & Maizel, J.V. Jr. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**(5): 815-820
- SHEVCHENKO, A.; Wilm, M.; Vorm, O. & Mann, M. (1996). Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* **68**: 850-858
- SHISHKO, Z.F.; Mikhailova, R.V.; Lobanov, A.G. & Yassenko, M.I. (1999). The effect of the quantity and quality of the inoculum on the production of extracellular glucose oxidase by *Penicillium funiculosum* G-15 and *Penicillium adametzii* BIM-90. *Biotehnologiya* **6**: 62-67
- SHUMAN, S. (1991). Recombination Mediated by *Vaccinia* Virus DNA Topoisomerase I in *Escherichia coli* is Sequence Specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10104-10108
- SHUMAN, S. (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using *Vaccinia* DNA Topoisomerase. *J. Biol. Chem.* **269**: 32678-32684
- SIEBERT, K.J.; Troukhanova, N.V. & Lynn, P.Y. (1996) Nature of Polyphenol-Protein Interactions. *J. Agric. Food Chem.* **44**(1): 80-85
- SOLOMON, E.I.; Sundaram, U.M. & Machonkin, T.E. (1997). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563-2605
- SPADARO, J.T.; Gold, M.H. & Renganathan, V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(8): 2397-2401
- SPRECHER, E. (1959). Über die Guttation bei Pilzen. *Planta* **53**: 565-574
- STÄHLIN, A. (1957). *Arachis hypogaea* L., Erdnuß. In: *Die Beurteilung der Futtermittel. Methodenbuch* Bd. XII. 328-333. Verlag Neumann, Radebeul und Berlin
- STEFFEN, K. T.; Hatakka, A. & Hofrichter, M. (2002). Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**(1-2): 212-217
- STEFFEN, K. T.; Hatakka, A. & Hofrichter, M. (2003). Degradation of benzo[a]pyrene by the litter-decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of manganese peroxidase. *Appl. Env. Microbiol.* **69**(7): 3957-3964
- STOOP, J.M.H. & Mooibroek, H. (1999). Advances in genetic analysis and biotechnology of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 474-483
- STRAHLER, J.R.; Hanash, S.M.; Somerlot, L.; Weser, J.; Postel, W. & Görg, A. (1987). High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of basic myeloid polypeptides: use of immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* **8**(4): 165-173

- STRASBURGER, E.; Sitte, P.; Weiler, E.W.; Kadereit, J.W.; Bresinsky, A. & Körner, C. (Hrsg.) (2002). *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 35. Aufl., Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin.
- TANG, C.; Ge, W. & Buswell, J.A. (2003). Cloning and transcriptional analysis of laccase genes from *Pleurotus sajor-caju*. Unveröffentlicht (EMBL accession number AJ507324).
- THOMAS, D.R.; Carswell, K.S. & Georgiou, G. (1992). Mineralization of biphenyl and PCBs by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Bioeng.* **40**(11): 1395-1402
- THURSTON, C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26
- TISELIUS, A. (1958). Electrophoresis, past, present and future. *Clin. Chim. Acta*, **3**(1): 1-9
- TYCZKOWSKI, J. & Hamilton, P.B. (1986). Absorption, transport, and deposition in chickens of lutein diester, a carotenoid extracted from *marigold* (*Tagetes erecta*) petals. *Poult. Sci.* **65**: 1526-1531
- VASDEV, K. & Kuhad, R.C. (1994). Decolorization of Poly R-478 (polyvinylamine sulfonate anthrapyridone) by *Cyathus bulleri*. *Folia Microbiol.* **39**: 61-64
- VEDDELER, B. (2003). Biotransformation terpenoider Substrate mit Mikroorganismen. Dissertation Universität Hannover
- VESTERBERG, O. Svensson, H. (1966). Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem. Scand.* **20**(3): 820-834
- WAHLEITHNER, J.A.; Xu, F.; Brown, K.M.; Brown, S.H.; Golightly, E.J.; Halker, T.; Kauppinen, S.; Peterson, A. & Schneider, P. (1996). The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet.* **29**: 394-403
- WANG, J.; Lin, Y.; Eremenko, A.V.; Ghindilis, A.L. & Kurachkin, I.N. (1993). A laccase electrode for organic phase enzymatic assay. *Anal. Lett.* **26**: 197-207
- WARIISHI, H.; Valli, K. & Gold, M.H. (1992). Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. *J. Biol. Chem.* **267**: 23688-23695
- WELSH, F.W.; Murray, W.D. & Williams, R.E. (1989). Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **9**: 105-169
- WESSEL, D. & Flügge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**: 141-143
- WHITAKER, J.R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences* (Food science and technology; v. 61), 2. Aufl., S. 438-443
- WICH, G. (2001). *Weißfäulepilze im Dienste der Biotechnologie: das Lignozym®-Verfahren*. Consortium für elektrochemische Industrie.

- WILKINS, M. R.; Gasteiger, E.; Sanchez, J.-C.; Bairoch, A. & Hochstrasser, D. F. (1998). Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* **19**: 1501-1505
- WISDOM, R.A.; Dunnill, P. & Lilly, M.D. (1987). Enzymatic transesterification of fats: laboratory and pilot scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: 1081-1085
- WU, H.-C.; Tzeng, W.-S. & Lin, L.-P. (2001). Biological decolorization by an immobilized white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Taiwan Nongye Huaxue Yu Shipin Kexue* **39**(3): 250-263
- YAN, J.X.; Sanchez, J.C.; Rouge, V.; Williams, K. & Hochstrasser, D.F. (1999). Modified immobilized pH gradient gel strip equilibration procedure in SWISS-2DPAGE protocols. *Electrophoresis* **20**(4-5): 723-726
- YAUVER, D.S.; Xu, F.; Golightly, E.J.; Brown, K.M.; Brown, S.H.; Rey, M.W.; Schneider, P.; Halkier, T.; Mondorf, K. & Dalboge, H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 834-841
- ZAHN, A. (2003). Molecule of the month January 2003. Im Internet unter <http://dcbwww.unibe.ch/dcbneu/mom/mom07.html> (29.01.2004).
- ZHANG, Y. & Ma, L. (2003). Cloning of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* and its expression in *Pichia pastoris*. Unveröffentlicht (EMBL accession number AY450404).
- ZHAO, J. & Kwan, H.S. (1999). Characterization, molecular cloning and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4908-4913
- ZHENG, Z. & Obbard, J.P. (2002). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *Enz. Microb. Technol.* **31**(1-2): 3-9
- ZIEGENHAGEN, D. & Hofrichter, M. (2000). A simple and rapid method to gain high amounts of manganese peroxidase with immobilized mycelium of the agaric white-rot fungus *Clitocybula dusenii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 553-557
- ZORN, H.; Neuser, F.; Latza, E. & Berger, R.G. (2000). Wie "natürlich" kann ein "Bioflavor" sein? *Lebensmittelchemie* **54**: 91
- ZORN, H.; Hanke, T. & Berger, R.G. (2002a). Biotechnologische Gewinnung lignolytischer Enzyme. *Lebensmittelchemie* **56**: 26
- ZORN, H.; Takenberg, M. & Berger, R.G. (2002b). Carotene specific lipase. Europäisches Patent EP 02447169.0
- ZORN, H.; Breithaupt, D.E.; Takenberg, M.; Schwack, W. & Berger, R.G. (2003a). Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase. *Enzyme Microb. Tech.* **32**: 623-628

ZORN, H.; Takenberg, M. & Berger, R.G. (2003b). Hydrolyse von Carotinoidestern durch Speisepilzenzyme. *Lebensmittelchemie* **57**: 52

ZORN, H. (2003c). Biochemische und molekularbiologische Strategien zur Synthese von Aromastoffen. Habilitationsschrift, Universität Hannover.

ZORN, H.; Langhoff, S.; Scheibner, M. & Berger, R.G. (2003d). Cleavage of β,β -carotene to flavor compounds by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Published online: 26.04.2003 DOI 10.1007/s00253-003-1309-4

ZORN, H.; Langhoff, S.; Scheibner, M.; Nimtz, M. & Berger, R.G. (2003e). A peroxidase of *Lepista irina* cleaves β,β -carotene to flavour compounds. *Biol. Chem.* **384**(7): 1049-1056

Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken vom 29.01.1998 (BGBII S. 230), zuletzt geändert durch Art. 1 ZStoffR-ÄndVO 2002 v. 20.12.2002 (BGBl. I. S. 4695)

7 ANHANG

7.1 Ligninabbau: Diskontinuierliche Detektion von relevanten Enzymen durch Farbreagenzien

Die Bestimmung der Farbintensitäten erfolgte nach folgendem Schema:

keine Aktivität	0,
schwache Aktivität	1,
mittlere Aktivität	2,
starke Aktivität	3.

Außerdem wurde Ort der Färbung verzeichnet, wenn eine eindeutige Zuordnung möglich war:

Färbung des Mycels	MY
Färbung des umgebenden Mediums	X
Färbung an den Erdnußschalen	ES

Tabelle 7.1: Enzymaktivitäten von Basidiomyceten aus Oberflächenkultivierungen mit und ohne Erdnußschalen. Aktivitäten: 0=keine, 1=schwache, 2=mittlere, 3=starke Aktivität. Ort der Färbung (wenn eindeutige Zuordnung möglich): MY=Mycel, X=Färbungshof, ES=Erdnußschalen.

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
1	<i>Bjerkandera adusta</i> CBS 414.48								
	Polyphenoloxidase	0	0	2	0	2	0	1	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	1	0	0	0
	Laccase	0	0	1	0	1	0	1	0
	Peroxidase	1	0	2	1	2	2	2	0
2	<i>Clitocybe lignatilis</i> FSU C 31-2								
	Polyphenoloxidase	1 ^{MY}	1 ^{MY}	2 ^{MY}	2 ^{MY}	2 ^{MY}	2 ^{MY}	3 ^{MY}	2 ^{MY}
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	2 ^{MY}	1 ^{MY}	2 ^{MY}	0
	Peroxidase	0	0	1 ^{MY}	0	3 ^{MY}	2 ^{MY}	2 ^{MY}	0

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
3	<i>Collybia peronata</i> CAS 353								
	Polyphenoloxidase	2 MY ES	0	1 MY ES	1 MY	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	1 MY	1 MY	0	1 MY	0	0	0	0
4	<i>Cyathus earlei</i> CBS 440.80								
	Polyphenoloxidase	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	1 MY	1 MY	1 MY ES	1 MY
	Tyrosinase	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	0	1 MY	1 MY
	Laccase	3 MY X	3 MY X	3 MY	3 MY	1 MY	0	0	1 MY
	Peroxidase	3 MY	3 MY	1 MY	1 MY	1 MY	1	0	1 MY
5	<i>Cyathus helenae</i> CBS 372.80								
	Polyphenoloxidase	1 MY ES	1 MY	2 MY	1 MY	2 MY ES	1 MY	1 MY ES	1 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	1 MY	0
	Laccase	1 MY	2 MY	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	1 MY	2 MY
	Peroxidase	1 MY	2 MY	1 MY	2 MY	1 MY	2 MY	1 MY	1 MY
6	<i>Cyathus julietae</i> CBS 373.80								
	Polyphenoloxidase	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY
	Tyrosinase	1 MY	2 MY	2 MY	2 MY	1 MY	1 MY	3 MY	2 MY
	Laccase	1 MY	1 MY	2 MY	2 MY	0	0	0	0
	Peroxidase	0	1 MY	1 MY	1 MY	0	0	0	1 MY
7	<i>Cyathus limbatus</i> CBS 335.81								
	Polyphenoloxidase	2 MY ES	1 MY	2 MY	2 MY	1 MY	1 MY	1 MY ES	1 MY
	Tyrosinase	0	1 MY	0	0	0	0	0	0
	Laccase	3 MY X	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	2 MY	3 MY	3 MY
	Peroxidase	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	1 MY	2 MY

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
8	<i>Cyathus pallidus</i> CBS 376.80								
	Polyphenoloxidase	1 MY	1 MY	2 MY	1 MY	2 MY	2 MY	2 MY	1 MY
	Tyrosinase	0	0	1 MY	0	2 MY	0	2 MY	1 MY
	Laccase	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY X	3 MY X	3 MY X	1 MY X
	Peroxidase	1 MY	1 MY	1 MY	2 MY	3 MY	3 MY	1 MY	2 MY
9	<i>Cyathus striatus</i> DSMZ 1652								
	Polyphenoloxidase	1 MY	1 MY	2 MY X	1 MY	2 MY ES	1 MY	1 MY	1 MY
	Tyrosinase	0	1	2 MY	2 MY	2 MY	1 MY	2 MY	1 MY
	Laccase	2 MY X	2 MY X	3 MY X	3 MY X	3 MY	2 MY	3 MY	1 MY
	Peroxidase	0	2 X	1 X	2 MY	1 MY	2 MY	1 MY	2 MY
10	<i>Fomitopsis pinicola</i> DSMZ 4957								
	Polyphenoloxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
11	<i>Ganoderma applanatum</i> CBS 250.61								
	Polyphenoloxidase	1 MY ES	0	1 ES	0	0	0	1 MY	1 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	1 MY X	0	0	0	1 MY	0	0	0
	Peroxidase	1 X	0	0	0	1 MY	0	1 MY	1 MY
12	<i>Gloeophyllum odoratum</i> CBS 444.61								
	Polyphenoloxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	1 MY	0	1 MY	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	1 MY	1 MY	0	1 MY	1 MY	0	1 MY	0

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
13	<i>Grifola frondosa</i> CBS 480.63								
	Polyphenoloxidase	2 MY	1 MY	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	3 MY ES	2 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	3 MY	1 MY	2 MY X	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	1 MY
	Peroxidase	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	2 MY	1 MY	1 MY	2 MY
14	<i>Hericius erinaceus</i> CBS 260.74								
	Polyphenoloxidase	1 MY	1 MY	2 MY ES	1 MY	2 MY ES	1 MY	2 MY ES	1 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	0	1 MY X	1 MY X	1 MY
	Peroxidase	2 MY	2 MY X	2 MY	2 MY	0	2 MY	0	1 MY
15	<i>Hypomyces odoratus</i> CBS 764.68								
	Polyphenoloxidase	0	0	2 MY	0	2 MY	2 MY	1 MY	2 MY
	Tyrosinase	0	0	3 MY	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	1 MY	0	1 MY	1 MY	1 MY	0
	Peroxidase	0	0	2 MY	1 MY	0	2 MY	1	1 MY
16	<i>Ischnoderma benzoinum</i> CBS 311.29								
	Polyphenoloxidase	2 MY	0	2 MY	2 MY	1 MY	3 MY	1 MY	2 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	3 MY	0	3 MY X	1 MY	2 MY	3 MY	2 MY	2 MY
	Peroxidase	2 MY	1 MY	1 MY X	2 MY X	2 MY X	1 MY	1 MY	1 MY
17	<i>Lentinellus cochleatus</i> FSU L 13-2								
	Polyphenoloxidase	1	0	1	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	1	0	0	0

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
18	<i>Lentinula edodes</i> FSU A 20-8								
	Polyphenoloxidase	1 MY	0	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY
	Laccase	1 MY X	1 MY	3 MY X	1 MY	1 MY	1 MY	0	0
	Peroxidase	1 X	1 X	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	0	1 MY
19	<i>Lentinula edodes</i> CBS 225.51								
	Polyphenoloxidase	2 MY	2 MY	1 MY	1 MY	1 MY	3 MY	1 MY	3 MY
	Tyrosinase	0	2 MY	0	2 MY	0	1 MY	1 MY	2 MY
	Laccase	2 MY	2 MY	0	0	0	1 MY	0	3 MY
	Peroxidase	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	2 MY	0	3 MY
20	<i>Lentinula edodes</i> CBS 389.89								
	Polyphenoloxidase	0	2 MY	0	1 MY	0	1 MY	0	1 MY
	Tyrosinase	2 MY	0	1 MY	1 MY	2 MY	1 MY	1 MY	0
	Laccase	0	3 MY	0	2 MY	0	2 MY	0	0
	Peroxidase	0	2 MY	0	1 MY	0	1 MY	0	1 MY
21	<i>Lentinus lepideus</i> CBS 450.79								
	Polyphenoloxidase	2 MY	0	3 MY	0	1 MY	0	1 MY	0
	Tyrosinase	0	0	1 MY	1 MY	1 MY	2 MY	0	1 MY
	Laccase	2 MY	0	3 MY	0	2 MY	0	3 MY	0
	Peroxidase	1 X	0	2 MY	0	1 MY	0	1 MY	0
22	<i>Lepista irina</i> CBS 458.79								
	Polyphenoloxidase	1 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	2 MY	1 MY X	2 MY X	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY
	Peroxidase	1 MY	1 X	1 MY	3 MY	3 MY	2 MY	2 MY	3 MY

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
23	<i>Lepista nuda</i> CBS 300.58								
	Polyphenoloxidase	1 MY	2 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY	2 MY	2 MY
	Tyrosinase	1 MY	0	1 MY	1 MY	2 MY	0	1 MY	0
	Laccase	2 MY X	3 MY X	3 MY X	3 MY	3 MY X	3 MY X	3 MY X	2 MY
	Peroxidase	2 X	0	3 MY	2 MY	2 MY	3 MY	2 MY	3 MY
24	<i>Marasmius alliaceus</i> CAS 413								
	Polyphenoloxidase	1 MY	0	3 MY	0	0	0	3 MY	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	1 MY	0	1 MY	0	0	1 MY X	2 MY	0
	Peroxidase	1 MY	0	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	3 MY	0
25	<i>Marasmius scorodonius</i> CBS 850.87								
	Polyphenoloxidase	2 MY	2 MY	2 MY	1 MY	3 MY	2 MY	3 MY	1 MY
	Tyrosinase	2 MY	2 MY	0	2 MY	1 MY	1 MY	2 MY	0
	Laccase	2 MY	2 MY	2 MY X	2 MY X	3 MY	2 MY	2 MY	2 MY
	Peroxidase	2 MY	2 MY	0	1 MY X	1 MY	2 MY	1 MY	2 MY
26	<i>Marasmius scorodonius</i> CBS 166.44								
	Polyphenoloxidase	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	3 MY	3 MY X	3 MY X	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Peroxidase	1 MY	1 MY	2 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
27	<i>Marasmius scorodonius</i> CBS 137.83								
	Polyphenoloxidase	2 MY	1 MY	3 MY	1 MY	3 MY	3 MY	3	3
	Tyrosinase	0	0	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3	3
	Laccase	3 MY X	1 MY	2 MY	1 MY X	3 MY	3 MY	3	3
	Peroxidase	1	1	1	2	3	3	3	3

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
28	<i>Nidula niveotomentosa</i> ATCC 38357								
	Polyphenoloxidase	0	0	2 MY	1 MY	1 MY	2 MY	1 MY	1 MY
	Tyrosinase	0	0	2 MY	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
29	<i>Nidula niveotomentosa</i> CBS 380.80								
	Polyphenoloxidase	0	0	2 MY	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
30	<i>Meripilus giganteus</i> CBS 561.86								
	Polyphenoloxidase	3 MY	1 MY	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY
	Tyrosinase	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY
	Laccase	3 MY X	2 MY X	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY	1 MY
	Peroxidase	2 MY	1 MY	1 MY	3 MY	1 MY	3 MY	3 MY	1 MY
31	<i>Phaneroch. chrysosporium</i> CBS 316.75								
	Polyphenoloxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
32	<i>Phaneroch. chrysosporium</i> CBS 481.73								
	Polyphenoloxidase	1 MY	0	0	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	1 MY	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	1 MY	0	0	0	0	0	0	0

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
33	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> CBS 671.71								
	Polyphenoloxidase	1 MY	0	1 X	1 X	0	0	0	0
	Tyrosinase	1 MY	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	1 MY	0	1 X	1 X	0	0	0	0
	Peroxidase	1 MY	1 MY	1 MY	2 MY	1 MY	1 MY	0	0
34	<i>Phellinus pini</i> (Tram. pini) DSMZ 5238								
	Polyphenoloxidase	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	2 MY	1 MY	2 MY
	Tyrosinase	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	3 MY
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	0	0	0	0
35	<i>Piptoporus betulinus</i> CAS 583								
	Polyphenoloxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
36	<i>Pholiota populnea</i> CBS 264.32								
	Polyphenoloxidase	2	0	1 MY	0	1 MY ES	0	2 MY ES	0
	Tyrosinase	2	2	2 MY	2	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	1	0	0	0	0	0	0
37	<i>Pholiota squarrosa</i> DSMZ 5127								
	Polyphenoloxidase	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Tyrosinase	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY
	Laccase	3 MY	2 MY	2 MY	0	2 MY	2 MY	1 MY	0
	Peroxidase	3 MY	2 MY	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	0

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
38	<i>Pleurotus sanguineus</i> CBS 614.73								
	Polyphenoloxidase	1 MY	1 MY	2 MY	2 MY	3 MY	2 MY	3 MY	1 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	1 MY	0
	Laccase	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	0	1 MY
	Peroxidase	1 MY	1 MY	0	0	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY
39	<i>Pleurotus sapidus</i> DSMZ 8266								
	Polyphenoloxidase	2 MY	2 MY	2 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY ES	3 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	3 MY X	2 MY X	3 MY X	1 MY	3 MY	3 MY	3 MY ES	3 MY
	Peroxidase	1 X	1 X	0 MY	1 X	1 MY	1 MY	2 MY ES	3 MY
40	<i>Polyporus umbellatus</i> CBS 483.72								
	Polyphenoloxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
41	<i>Psilocybe cubensis</i> CBS 324.58								
	Polyphenoloxidase	0	0	0	0	1	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	1	0	1	0	0	0	0	0
42	<i>Trametes suaveolens</i>								
	Polyphenoloxidase	1	0	1 MY ES	0	2 MY	2 MY	1 MY	3 MY
	Tyrosinase	1	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	2	0	1 MY	0	2 MY	1 MY	1 MY	1 MY
	Peroxidase	1	0	1 X	0	1 MY	1 MY	1 MY	0

Nr.	Organismus	Aktivitätsüberprüfung nach [d]							
		7		14		21		28	
		induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert	induziert	nicht induziert
43	<i>Trametes versicolor</i> ITAL 93								
	Polyphenoloxidase	3 MY	2 MY	3 MY	3 MY	3 MY	3 MY	2 MY	2 MY
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	2 MY	2 MY _X	2 MY	2 MY	3 MY	3 MY	1 MY	3 MY
	Peroxidase	1 MY	1 MY	1 MY	1 MY	3 MY	3 MY	1 MY	1 MY
44	<i>Tyromyces sambuceus</i> CBS 492.76								
	Polyphenoloxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
45	<i>Tyromyces floriformis</i> CBS 232.53								
	Polyphenoloxidase	0	0	1 MY	0	1 MY	0	2 MY	0
	Tyrosinase	2 MY	0	3 MY	0	2 MY	0	2 MY	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	2 MY	0	0	0	0	0
46	<i>Wolfiporia cocos</i> CBS 279.55								
	Polyphenoloxidase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tyrosinase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Laccase	0	0	0	0	0	0	0	0
	Peroxidase	0	0	0	0	1	0	0	0

7.2 multiple sequence alignment mit CLUSTAL W

Vergleich verschiedener Laccase-cDNAs aus Basidiomyceten mit CLUSTAL W (Zugangsnummern: A20705 = *Phlebia radiata*; TV44851 = *Trametes versicolor*; AF152170 = *Pycnoporus cinnabarinus*; AB015758 = *Schizophyllum commune*; POAJ5018 = *Pleurotus ostreatus*); die Bindungsregionen der Primer sind farbig markiert (blau: lac forward, rot: lac reverse).

```

A20705      -----
TV44851     -----
AF152170    -----
AB015758    TCGGCCGCTCGCCGCTGCATCCGTCCTGTTTCCCTTCTCGCTCCTTGTGTTGCG 60
POAJ5018     -----A 1

A20705      -----ATGCACACTTTCCTTCGCTCCACGGCACTCGTTG-T 35
TV44851     -----ATGGG---TCTGCAGCGATTTCAGCTTCTTCGTCA-C 32
AF152170    -----ATGTCGAGGTTCCAGTCCCTCTTCTTCTTCGTCC-T 35
AB015758    CCGGAGACTTTTC-CTGACTTGCTTTTCGTTCTATCGTTGTGCAATGCGCGTCTCAT 119
POAJ5018    CCGCATCCCTCAGCCGATCTCCCATGGCGGTTGCATTCGTTGC--GCTTGTTCCTACT 58
                                         *          *

A20705      GGCAGGCTGTCTGCCCCGCCCTT-----GCCAGCATGGG-CCCGTTACCGACTTTCA 89
TV44851     CCTCGCGCTCGTCGCTCGCTCTCTT-----GCAGCCATCGGG-CCGGTGGCGAGCCTCGT 86
AF152170    CGTCTCCCTCACCCTGTGGCCAAAC-----GCAGCCATAGGG-CCTGTGGCGGACCTGAC 89
AB015758    GATCATAGCTCTCGTCTATGTTCTATCTCGCTCGCCCTAGGGCTGTAGGGAATTTACC 179
POAJ5018    CGCATTAGCACTCGTACGCTTGA-----GGCCAGCATGGGCCCCCGGAACGCTGAAC 113
                                         *      ** *   ** ** *

A20705      CATCGTCAACGCCGCGTCTCTCCCGATGGTTTCTCTCGCCAGGCTGTCTGGCTGAGGG 149
TV44851     CGTCGCGAACGCCCCCGTCTCGCCGACGGCTTCCTTCGGGATGCCATCGTGGTCAACGG 146
AF152170    CCTTACCAATGCCAGGTCAGCCCCGATGGCTTCGCTCGCGAGGCCGTCGTGGTGAACGG 149
AB015758    TATCGTAAACAAAGAGATCGCACCGGATGGATTTTCTCGCCCGACCGTACTCGCCAACGG 239
POAJ5018    -ATCGCGAACAAAGTCATCAACCAGATGGATTTTATCGCTCAACCGTGTCTCGCCGGTGG 172
      *   **      **   ** ** ** ** **   **   *   *   *   **

A20705      TGTCTTCCCTGGCCCGCTCATCGCCGGCAACAAGGTACTCCATTTCTCTCTCATCCCCGG 209
TV44851     CGTGGTCCCTTCCCCGCTCATCACCGGAAGAAGGT-CGGCGTGTCTGTGTCGTCCT--A 203
AF152170    TATCACCCTGCCCTCTCATCACAGCAATAAGG----- 184
AB015758    TAAATTCCTGGCGAGCTCATCAAGGCACGAAGG----- 274
POAJ5018    CTCTACCCGGGCCATTGATCAAGGGCAAGACCG----- 207
      ***   *   *   ***   ** *   *   *

A20705      GATATGCGCTGACGGTCCGGC-ACAGGGCGACAATTTCCAGATCAATGTGATTGACGAATT 268
TV44851     CTCCTTTGCTGACAGCGATCTACAGGGAGACCGCTTCCAGCTCAACGTGACGACACCTT 263
AF152170    -----GCGATCGATTCCAGCTCAATGTGATCGACCAAGT 218
AB015758    -----GGAACACGTTCAAGATCAATGTGCAAGACCAAGT 308
POAJ5018    -----GCGACAGGTTCCAAATTAATGTGCGTGAACAAGCT 241
                                         *   *   *** *   *   **   **   *

A20705      GACCAACGCAACTATGTTGAAGACTACCACTATCGTCAGTTCACTTGCCACTCCCCGTGT 328
TV44851     GACCAACCACAGCATGCTCAAGTCCACTAGTATCGTAAGTGTGACGAT--CCGAATGTGA 321
AF152170    GACAAATCATACCATGTTGAAAACATCTAGTATT----- 252
AB015758    CAATGACACACGATGCTGAGGAGCACAACCATT----- 342
POAJ5018    CGCCGACAGTCGATGCCGGTCGACACCAAGTATC----- 275
      *      ***      *   *   **

A20705      TCTCACTCTGAATTAATCGTCTTTG-GTAGCACTGGCATGGCTTCTTCAGCACGGTACA 387
TV44851     CATCATCTGGGGCTAATTAACCGCGCACAGCACTGGCACGGCTTCTTCAGGCAGGCACC 381
AF152170    -----CATTGGCACGGCTTCTTCAGCAAGGCACG 282
AB015758    -----CACTGGCATGGATTCTTCCAAAAGAACTCC 372
POAJ5018    -----CACTGGCACGGTCTCTTCGTCAAGGGACAC 305
                                         ** *   ** *   ** *

```

```
A20705      AACTGGGCTGATGGACCGGCATTTATCAATCAATGCCCCATTGCGTCTGGTGACTCGTTC 447
TV44851     AACTGGGCAGACGGACCCGCGTTCGTCAACCAGTGCCCTATTGCTTCCGGGCATTCATTT 441
AF152170    AACTGGGCGGATGGTCCCGGTTTCGTGAACCAGTGTCCTATCGCTTCGGGCCACTCGTTC 342
AB015758    AACTGGGCGGATGGCCCTGCTGGAGTCACACAATGCCCTATCGCTACCGGAGACTCTTTC 432
POAJ5018    AATTGGGCAGATGGCCCTGCCATGGTTACGCAATGTCCAATCGTTCCGGGCCACTCGTTT 365
            ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      CTGTACAACCTCCAGGTGCCCCACCAAGCTGGTATG---TCCCAGTT---TCCTGTTGT 500
TV44851     CTGTACGACTTCCATGTGCCCCGACCAGGCAGGTAAGCAGTCTTTGTGTGATCCTCGTGT 501
AF152170    TTGTATGACTTTCAAGTTCGCCGACCAAGC----- 371
AB015758    GTCTACGAGTTTCGGCGTCCCCGACCAGC----- 461
POAJ5018    TTGTACGACTTCGAAGTCCTGATCAAGC----- 394
            * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      TGGATAATACCAGCAT-CTTAATTATTATGATACAGGTACCTTCTGGTATCACAGCCATC 559
TV44851     GATGCAATGTTCTCATGCTCCGACGTGATCG-ACAGGAACGTTCTGGTACCACAGTCATC 560
AF152170    -----AGGGACTTTCTGGTACCATAGCCATC 397
AB015758    -----GGGGACATTCTGGTATCACTCGCATT 487
POAJ5018    -----TGGAACATTTTGGTATCACTCTCATC 420
                        ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      TCTCCACGCAGTACTGTGACGGTCTTCGCGGACCTTTCGTAGTGTACGATCCTGCTGACC 619
TV44851     TGTCTACGCAATACTGTGACGGGCTGCGAGGACCGTTTCGTGCTGTACGACCCCAAGGATC 620
AF152170    TCTCCACGCAATACTGCGATGGTTTGGAGGGGCGCTTTCGTGCTGTACGACCCCAACGATC 457
AB015758    TGAGTACGCAGTACTGTGACGGACTACGCGGTGCGATGGTTGTATACGATCCCGCAGACC 547
POAJ5018    TTGGGACACAATACTGTGATGGACTGCGGGGGCCATTGGTCTGCTACTCTAAGAATGACC 480
            * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      CGTACCTTGACCAGTACGACGTCGATGATGGTACGCAAGAGGCATTTATTGTTTTCGCTT 679
TV44851     CGCACGCCAGCCGCTACGATGTTGACAACGGTACGTGCGCCACGGAGTATATCACACAGC 680
AF152170    CTCACGCTAGCCTGTATGACATTGATAACG----- 487
AB015758    CTCATCGCTCGCGGTACGACGTCGACGACG----- 577
POAJ5018    CCCATAAGCGTTTGTACGATGTCGACGATG----- 510
            * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      ATATATTGAACCCGTGCTCA--GACAGCACTGTTATCACTTTGGCGGACTGGTATCACAC 736
TV44851     ATGCGTTGACGTCGGGCCAACAGAGAGCACGGTCATCACGTTGACCGACTGGTACCACAC 740
AF152170    -----ACGACACTGTCAATTACGCTGGGTGATTGGTATCACGT 524
AB015758    -----ACAATACTGTGATCACTCTTGGCGGATTGGTATCACGC 614
POAJ5018    -----AATCCACCGTGCTGACCGTTGGTGTGATTGGTACCATGC 547
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      CGCCGCGAGATTGGGGAGCCCTTTCCCGTAAGTACTCAG-AGCTTGTCCATTGTCAAATG 795
TV44851     CGCTGCCCCGCTCGGTCCAGGTTCCCGTAAGCTCGCAATGGATTAGTTTTTACGGATTA 800
AF152170    TGCTGCCAAGCTCGGACCTCGCTTCCCAT-----TTGGCT----- 559
AB015758    GTTGGCACCAACGATTATAGGCGTCGG-----CACGC----- 646
POAJ5018    CCCCTCATTTGTCGCTCACTGGAGTCCC-----CCATC----- 579
            * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      CTCATTTC-CGCTGCAGCGCT-----GCGGATACCACCTTGATCAACGGCCTTGGAC 845
TV44851     TTTGCTTATGTTGCGTCGATAGACTCGGCGCGGACGCCACGCTCATCAATGGTCTTGGGC 860
AF152170    -----CCGATTCAACCCCTTATCAATGGACTTGGTC 589
AB015758    -----CCGACTCCACCCTCATCAACGGAAAGGGCA 676
POAJ5018    -----CCGACTCGACACTATTCAATGGCCTTGGCC 609
                        * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      GGTGCGGTGAAGCCGGCTGCCCGGTCTCTGATCTTGCTGTCTATCTCGGTTACTAAAGGCA 905
TV44851     GGTC-----GGCCTCCACTCCCACCGCCGCGCTTGCTGTGATCAACGTCAGCAGCGAA 914
AF152170    GAACC-----ACTGGCATAGCACCGTCCGACTTGGCAGTTATCAAGGTCACGCAGGGCA 643
AB015758    GATAC-----AATGGCGGATCGCTCACCAATCTCACTCGCATCAACGTCGTTTCGGCGGC 730
POAJ5018    GTTCT-----CTCAATGGTCCAGCCTCGCCGCTGTACGTCATGAACGTGGTCAAAGGCA 663
            * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      AACGGTATGTCGATCGTTTCAGTAGCATGTTAGTATCTAACATTTTCT-----GCCTTC 958
TV44851     AGCGGTGAGCATTTCTTTGCATGCCATTTCAATGCTCTAAATTGACCTATCGGCACCACG 974
AF152170    AGCG----- 647
AB015758    TTCG----- 734
POAJ5018    AGCG----- 667
            * * * * * * * * * * * * * * * * * *

A20705      CAGCTACCGTTTCCGCTGGTTTCCATCTCTTGGCATTCATTCTTCACATTTAGCATCGA 1018
TV44851     CAGCTACCGCTTCCGCTCTCGTTTCGATCTCGTGCGACCCGAACCTACAGTTCAGCATCGA 1034
AF152170    ---CTACCGCTTCCGCTTGGTGTCTGCTTTCTTGGCATCCGAACCATAACATTAGCATCGA 704
AB015758    ---CTATCGCTCCGCTTGTCTCTCTTGTCTGCGACCCGAGCTTCACCTTCGCTATCCA 791
POAJ5018    ---CTATCGTATTCGGCTCATCAACACTTCCTGCGACTCCAACCTATCAATTCTCTATCGA 724
            *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

A20705	TGGGCACAGTCTGAACGTCATTGAGGTTGATGCTACCAACCACCAGCCGTTGACCGTCGA	1078
TV44851	CGGGCACAAATCTGACCGTCATCGAGGTCGACGGTATCAACAGCCAGCCTCTCCTTGTCGA	1094
AF152170	TAATCACACAATGACTATAATTGAGGCGGACTCGATCAACACTCAACCCCTAGAGGTTGA	764
AB015758	CGGACACAATATGACGATCATTGAGGCCGATGGTGTGAATACGCAGCCGCTAGTGGTGA	851
POAJ5018	CGGACATACCTTCACTGTTATCGAAGCTGATGGAGAGAATACTCAGCCTCTGCAGGTCGA	784
	* * * * *	
A20705	CGAGCTCACTATTTATGTCAGGCCAGCGCTACTCCTTCATCGTAAGTTTCAAGTGTAACTG	1138
TV44851	CTCTATCCAGATCTTCGCGCGCAGCGCTACTCCTTTGTGGTATGCCCTGCCCTCTTGAT	1154
AF152170	TTCAATCCAGATTTTTCGCGCGCAGCGCTACTCCTTCGT-----	803
AB015758	CTCCCTAGAGGTCTTCGCGGGGCGAGGATACTCGGTGGT-----	890
POAJ5018	TCAAGTGCAAATTTTTCAGGCCAACGTTATTCGCTTGT-----	823
	* * * * *	
A20705	GACTCAGACTGAAGGTTATTGATGACATTTGTTACTTAGCTCAGGCCGACCAAGACGTC	1198
TV44851	GCTTCCAAGTGG---CCTCGCTCAC-CCAGTCTTTTAGTTGAATGCGAACCAACGCGTC	1209
AF152170	-----GCTGGATGCTAGCCAGCCGGTG	825
AB015758	-----AGTCCATGCGAACGAGCGTATC	912
POAJ5018	-----CCTCAACGCGAATCAGGCAGTC	845
	* * * *	
A20705	GATAACTACTGGATCCGAGCAAAACCCCGGTATTGGCATCACCACAGGCTTTGCGGGCGGT	1258
TV44851	GGCAACTACTGGGTCCGCGCGAAACCCGAACTTCGGAA---CGGTGGGTTGCGCCGGGGG	1266
AF152170	GATAACTACTGGATCCGCGCAAAACCCCTGCCTTCGGAA---ACACAGGTTTGTGGTGA	882
AB015758	GGCAACTACTGGATCCGCGCGAAACCCAGCTTCGGTA---CCATCGGCTTTGCAGGCGGC	969
POAJ5018	GGCAACTACTGGATTGCGCGCAAAACCCCAACAGCGGCG---ACCCCGGCTTCGAAAACAG	902
	* * * * *	
A20705	ATCAACTCTGCTATTCTTCGTTATGATGGTGCCGACGTGGTCGAGCCTACAACACTACTCAG	1318
TV44851	ATCAACTCCGCCATCCTACGCTACCAAGGCGCACAGTTCGCGGAGCCCACTACGACCCAG	1326
AF152170	ATCAATTCTGCCATCCTGCGTTATGATGGCGCACCCGAGATCGAGCCTACGTCTGTCCAG	942
AB015758	CTCAACTCCGCCGTCTCCTCACTACATCGCGCCTCCTCCTCCGAGCCCGCTGAGGTGAT	1029
POAJ5018	ATGAACCTTGCCATCCTCCGCTACAAAGGCGCACGAGCATCGACCCACAACGCCCGA-	961
	* * * * *	
A20705	GCGACAA---GTCCCGTTGTGCTGAGCGAGTCGAACTTGGCCCCACTGACCAACGCTGCT	1375
TV44851	ACGACGT---CGGTGATCCCGCTTATCGAGACGAACTTGCACCCCTCGCTCGCATGCT	1383
AF152170	ACTACTC---CTACGAAGCCTCTGAACGAGGTGCACTTGCATCC-----	983
AB015758	ACCGAGCCGTCTCTCTTCGCTTTCTGTGGAGACCGCCCTCCG-----	1073
POAJ5018	GCAAAAC---GCTACCAACCCCTTCCACGAATAACCTTCGCCC-----	1003
	* * * *	
A20705	GCTGTCAGTCTTATCTTTTGTGTAT-TGCTTTGCTTGCGTCTAACCG-----GTAGA	1426
TV44851	GTGGTATGTCTCTTTTTCGATCATCTGAGTTGCCCGTTGTTGACCGCATTATGTGTTAC	1443
AF152170	-----TCTCTCGCTTAT-----GCCTGT-----	1001
AB015758	-----TCCTCTCGAGAAC-----CCTGGCGC-----	1094
POAJ5018	-----GCTCATCAAGAAG-----CCTG---C-----	1021
	* * *	
A20705	TCTTTAGCCTGGTCTCCCGAGGTTGGCGGTGTCGACCTTGCCCTCAACTTCAACCTGAC	1486
TV44851	TATATAGCCTGGCAGCCCGACACCCGGGGCGTCGACAAGGCGCTCAACCTCGCGTTTAA	1503
AF152170	-----GCCTGGCAGCCCGAGCCCGAGGTGTCGACAAGCCTCTGAACCTTGGTCTTCAA	1055
AB015758	-----GCCTGGTCTCCCCAGCAAGGGGAGCCGACGTGAACATCAACCTCGCGATTGA	1148
POAJ5018	-----GCCAGGCAACCTTTCCCCGGCGCGCGATCACAACATCAACCTAAACTTTCGC	1075
	* * * * *	
A20705	CTTCGTGAGTACCCTGGCTGAATCGAGCGGATATTTGT---TGAACGCAGGGTTGTGCAG	1543
TV44851	CTTCGTAAGTATCTCTACTACTTAGGCTGGAGGCTCGTCGCTGATCATACGGTGTTCAG	1563
AF152170	CTTC-----	1059
AB015758	CCTTA-----CG	1155
POAJ5018	TTTCG-----AT	1082
	*	
A20705	GATGGCCCTCCCTAAAATTCCAAATCAACGGAGTCACCTTCGTTCCGCCCAACCGTGCC	1603
TV44851	AACGGCACC-----AATTCTTTCATCAACAACGCGACTTTCACGCCCGGACCGTCCCG	1617
AF152170	AACGGCACC-----AATTCTTTCATCAACGACCAACCTTTGTCCCGCGCTGTGTCCCA	1113
AB015758	CTCGACCCATTCC---AGTTACGGTGAACGGCGCGCCATTTCATTCGCCGAGTCTGCCG	1212
POAJ5018	CCTGCCACCGCGC---TGTTACCGCGAACAACCATACGTTTGTGCCCCCTACCGTTCCA	1139
	* * * * *	
A20705	GTTCTTCTCCAAATCCTCAGTGGTGCCAGTCGGCTGCAGACCTACTGCCATCCGGAAGC	1663
TV44851	GTAATCCTCCAGATTCTGAGCGGTGCGCAGACCGCACAGACCTGCTCCTGCAAGGCTCT	1677
AF152170	GTCTTGCTACAAATCCTCAGTGGGGCGCAGGCGGCTCAGGACCTGGTCCCGGAGGGCAGC	1173
AB015758	GTGCTGCTGCAGGTGATGAGCGGAGCGGCTACTGCGCAGGAGCTGCTTCGGAAGGGAGC	1272
POAJ5018	GTGTTGTTGCAGATCTTGTGGGCGACACGCGATGCGCATGATCTGGCCCTGTGGGTGCG	1199
	* * * * *	

A20705	GTGTACGCGCTGCCTTCGAACGCGACCATCGAGCTGAGTCTGCC-----CGCCGGCGCA	1717
TV44851	GTCTACCCGCTCCCGGCCCACTCCACCATCGAGATCACGCTGCCGGCGACCGCCTTGGCC	1737
AF152170	GTGTTCGTTCCTTCCAGCAACTCGTCCATTGAGATATCCTTCCCTGCCACTGCCAATGCC	1233
AB015758	GTGTACACGCTACCGCCCAACCAGACCGTTGAGATATCGATAACC-----CGCGCGCAGT	1326
POAJ5018	ATTTATGACATTAAGCTGGGAGACGTGCTTGAGATCACTATGCC-----TGCCCTCGTA	1253
	* * * * *	
A20705	CTGGGGCGGCCCGCACCCCTTCCACTTGCACGGC-----	1750
TV44851	CCGGGTGCACCGCACCCCTTCCACCTGCACGGTGTATGTTCCCTGCCTTCCCTTCTTAT	1797
AF152170	CCTGGATTCCCCCATCCGTTCCACTTGCACGGT-----	1266
AB015758	GCTGGAGCCCTCATCCTTCCATTTCACACGGG-----	1359
POAJ5018	TTCGCTGGACCACATCCCATCCATTACACGGG-----	1286
	* ** * * * *	
A20705	-----CACACCTTCAGCGTCGTCGGTCCCGCT	1777
TV44851	CCCCGAACCAAGTGCTCACGTCCGTCCCATCTAGCACGCCTTCGCGGTGCTTCGCAGCGCG	1857
AF152170	-----CACGCCTTCGCTGTCGTCGGAGCGCC	1293
AB015758	-----CATACGTTTCGACGTTGTCGCGACGCGC	1386
POAJ5018	-----CATACCTTCGCCGTAGTTCGGAGTGCC	1313
	** * * * *	
A20705	GGCTCCACGACGTACAACATATGTCAACCCCGTCCAGCGTGACGTCGTGAGCATTGGAAA-	1836
TV44851	GGGAGCACCAAGTATAACTACAACGACCCGATCTTCCGCGACGTGAGCACGGGCACG	1917
AF152170	GGGAGCAGCGTCTACAACACGACAACCCGATCTTCCGCGACGTGTCAGCACCGGCCAG	1353
AB015758	GGGAGCACGACTACAACACGCGAATCCGATTGCGCGGACGTGGTCAACACGGGCT--	1444
POAJ5018	GGCAGCAGCAGTACAACACGAAACCCCGTCCGTAGGGATGTCGTATCCATCGGTGA-	1372
	** ** * * * * *	
A20705	-----CACCGGCGACAACGTACCAATCCGCTTCGATACTAACAACCCGGGCGCGTGGTTC	1891
TV44851	CCCGCCGCGGGGCGACAACGTACGATCCGCTTCCAGACGGACAACCCGGGCGCGTGGTTC	1977
AF152170	C-----CCGGCGACAACGTACGATTTCGCTTCGAGACCAATAACCCAGGCCGCGTGGTTC	1407
AB015758	--TGGCTGGT--GACAATACTACGATTTCGATTTCAGGACAGACAATTCCGGGCGCTGGATT	1500
POAJ5018	--TGACCCAACGGACAACGTACCATCCGATTTGTAGCAGACAATGCAGGTCCATGGTTC	1430
	***** ** * * * * *	
A20705	CTCCATTGCCACATTGACTGGCATCTCGAGGCTG-CTTTGCCGTTGTCTTCGCTGAGGAC	1950
TV44851	CTCCACTGCCACATCGACTTCCACCTCGACGCGGGCTTCGCGATCGTGTTCGCAGAGGAC	2037
AF152170	CTCCACTGCCACATTGACTTCCACCTCGACGCGAGGCTTTGCTGTAGTCATGGCCGAGGAC	1467
AB015758	CTTCATTGCCATATTGACTGGCACCTCGCATCGGTCTCGCCGTGCTGATGGCAGAGGAC	1560
POAJ5018	CTCCATTGCCACATCGACTGGCATCTTGACCTTGGCTTCGCTGTCGTCTTTGCCGAAGGA	1490
	** * * * * * *	
A20705	ATCCCTGACGTTGCGTCCATTAACCTGTCCCCAGGACTGGTCCAACCTGTGCCCTATC	2010
TV44851	GTTGCGGACGTGAAGGCGCGCAACCCGTTCCGAAGGCGTGGTCGGACCTGTGCCCGATC	2097
AF152170	ACTCCGGACACCAAGGCGCGCAACCTGTTCCTCAGGCGTGGTCGGACTTGTGCCCCATC	1527
AB015758	ACGGATGGTATGGC-GCAGTCCGTACAG--CCAACTGCATACAGTGATCTCTGTCCCAAG	1617
POAJ5018	GTAATCAGACTGCAGCGGCCAACCCGTACCTGAAGCCTGGAACAATCTTTGCCCAATA	1550
	* * * * *	
A20705	TACAACGCTCTGGACGCATCTGATCACTAGCGGATTC----GCATCAATCATACAGTGGA	2066
TV44851	TACGACGGGCTGAGCGAGGCAACCAATGA-----	2127
AF152170	TATGATGCACTTGACCCCGCGACCTCTGA-----	1557
AB015758	TACGACGCGTTG--TCTGACGAAGAATTGGGTGGACTCGTTGACTAGACTTCGCGGCCCTT	1675
POAJ5018	TACAACAGCTCGAACCCTCGAAACTCCTAATGGGC-----ACCAATGCCATCGGCCGT	1604
	** * *	
A20705	TGATGGGTGGTAACGGACTATTTGCACCACATGCTCTTTTATTCTCGGGTCGCAG----	2122
TV44851	-----	
AF152170	-----	
AB015758	C-GTCTGCTGCACGGAAGTCATGCTACGGA--GAGTTTGGACGCTAACAATGTATCCT-	1730
POAJ5018	CTGCCTGCGCCATTGAAAGCATGATTATAATTGACTTTGAGCGAGAGTCGTGGATAGTA	1664
A20705	-----	
TV44851	-----	
AF152170	-----	
AB015758	TTGATTTGCGCTTCTCACTATGCCTGTTATCCTTAAATAAATGGTATATATTCA-CGAGG	1789
POAJ5018	TTTATTTCGCACTTCACCCACCTCTCAGATCATCCTATATACTACTACATAATAGGCTTTA	1724
A20705	-----	
TV44851	-----	
AF152170	-----	
AB015758	GTTCAATTCAAGGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----	1822
POAJ5018	TTTCGTTTCGTAATATCTGTTAGGAATCAATGGATTGAATGAATCAGAG-----	1772

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, daß die vorliegende Arbeit nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Hannover, März 2004

LEBENS LAUF

Name: Thilo Peters
Geburtsdatum: 31. März 1973
Geburtsort: Einbeck
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet, geb. Hanke

Schulbildung

August 1979 bis Juli 1983	Grundschule Leinetal Drüber
August 1983 bis Juli 1985	Orientierungsstufe Sohnreyschule Einbeck
August 1985 bis Juli 1990	Gymnasium Goetheschule Einbeck
August 1990 bis Juni 1992	Gymnasium Corvinianum Northeim
Juni 1992	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

Oktober 1992 bis März 1993	Studium des Chemieingenieurwesens an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe
April 1993 bis März 1996	Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Fridericiana zu Karlsruhe
Dezember 1995	Diplomvorprüfung
April 1996 bis Juni 1999	Studium der Chemie (Diplom) an der Universität Hannover
Dezember 1998 bis Juni 1999	Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper mit dem Thema „Untersuchungen zur Isolierung und Charakterisierung von Enzymen aus marinen Mikroorganismen“
Juni 1999	Verleihung des Grades Diplom-Chemiker

Berufstätigkeit

September 1999 bis März 2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover bei Herrn Prof. Dr. Ralf G. Berger
------------------------------	---
