

Oxidoreduktasen aus *Meripilus giganteus* und *Hirneola auricula- judae* für die Lebensmitteltechnologie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biochemiker

Gunnar Schmidt

geboren am 27.03.1982 in Wismar

Hannover 2012

Referent: Prof. Dr. Dr. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. U. Rinas

Tag der Promotion: 21.09.2012

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Oxidoreduktasen aus *Meripilus giganteus* und *Hirneola auricula-judae* für die Lebensmitteltechnologie

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Gunnar Schmidt

Danksagung

Herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und das entgegengebrachte Vertrauen. Außerdem bedanke ich mich für den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas und für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V (durch AIF und BMWi) und dem BMBF Cluster Biokatalyse2021 danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Mein weiterer Dank gilt besonders Herrn PD Ulrich Krings für die Betreuung, die gute Zusammenarbeit und stete Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zu einem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Prof Dr. Ursula Rinas (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates und Herrn Prof. Dr. Thomas Brüser (Institut für Mikrobiologie) für die Bereitschaft den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Herrn Dr. Manfred Nimtz (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig) danke ich für die Sequenzierung der Peptide mittels ESI-MS/MS.

Desweiteren gilt mein ausdrücklicher Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die große Hilfsbereitschaft und eine unvergessliche Zeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich immer unterstützt und gefördert haben und bei meiner Freundin, die mir stets mit Rat, Hilfe und viel Verständnis zur Seite gestanden hat.

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 2007 bis Dezember 2011 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens „Speisepilze als neue Quelle für Oxidoreduktasen zur Backwarenherstellung“ des Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (AiF 15305) und „Enzymatische Oxidationssysteme für Nahrungsmittel und für den technischen Einsatz“ des Bundesministerium für Bildung und Forschung (Cluster Biokatalyse2021, FKZ 0315172F) durchgeführt. Teile dieser Dissertation wurden in einer international anerkannten Zeitschrift publiziert sowie in Form von Postern und Vorträgen veröffentlicht.

Veröffentlichungen

1. **Schmidt, G.**, Krings, U., Nimtz, M., Berger, R. G., (2012) A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, pp. 1623-1632.
2. **Schmidt, G.**, Linke, D., Krings, U., Köhler, P., Berger, R. G. (2009) Speisepilze als neue Quelle für Oxidoreduktasen zur Backwarenherstellung. Erfolgsmodell Industrielle Gemeinschaftsforschung, Hrsg. Forschungskreis der Ernährungsindustrie, Bonn, 99-100, ISBN 978-3-925032-47-9
3. **Schmidt, G.**, Meyer, C., Lunkenbein, S., Krings, U., Köhler, P., Berger, R. G. (2009) Speisepilze als neue Quelle für Oxidoreduktasen zur Backwarenherstellung. Lebensmittelchemie, 63, 156
4. Meyer, C., **Schmidt, G.**, Lunkenbein, S., Krings, U., Berger, R. G., Köhler, P.: Enzymatische Oxidation von Pentosanen mit Laccasen aus Speisepilzen. Lebensmittelchemie 63, 142 (2009).
5. Meyer, C., **Schmidt, G.**, Berger, R. G., Köhler, P. (2010) Enzymatic oxidation of arabinoxylans with laccases from edible mushrooms. Proceedings of the 10th International Gluten Workshop (Branlard G, Ed) INRA, Paris, 262-264, ISBN: 978-2-738012-81-4
6. **Schmidt, G.**, Linke, D., Zelena, K., Matthes, R., Krings, U., Berger, R. G. (2010) Basidiomycota als Quelle neuer Biokatalysatoren. HIGHCHEM hautnah - Aktuelles aus der Lebensmittelchemie, Hrsg. GDCh, Frankfurt 2010
7. **Schmidt, G.**, Karrasch, S., Zelena, K., Berger, R. G. (2010) Redox mechanisms to modify the textural and sensory properties of food., 5th International Congress on Biocatalysis (BioCat2010) Hamburg (Germany), Book of Abstracts, 106.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	IX
Abstract	XI
1 Einleitung	1
1.1 Enzyme als Biokatalysatoren	1
1.2 Oxidoreduktasen	2
1.2.1 Peroxidasen.....	3
1.2.1.1 Klasse II Peroxidasen.....	3
1.2.1.2 Dye-decolorizing Peroxidasen.....	6
1.2.2 Laccasen.....	8
1.3 Biotechnologie	10
1.3.1 Rote Biotechnologie.....	11
1.3.2 Grüne Biotechnologie.....	12
1.3.3 Weiße Biotechnologie.....	13
1.3.4 Einsatz von Oxidoreduktasen in der Lebensmittelindustrie.....	17
1.4 Ziele der Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Geräte und Chemikalien	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Basidiomycetenstämme.....	24
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	24
2.1.4 Allgemeine Geräte.....	31
2.1.5 Lösungsmittel.....	32
2.2 Methoden	32
2.2.1 Kultivierung.....	32
2.2.1.1 Sterilisation der Kulturmedien.....	32
2.2.1.2 Kulturmedien für Basidiomyceten.....	33
2.2.1.3 Stammkulturen auf SNL-Agarplatten.....	33

2.2.1.4	<i>Submerskultur</i>	33
2.2.1.5	<i>Submerskultur mit Induktoren</i>	33
2.2.1.6	<i>Submerskulturen mit Holzspänen</i>	33
2.2.1.7	<i>Kultivierung im Bioreaktor</i>	34
2.2.1.8	<i>LB-Übernachtskulturen</i>	34
2.2.2	Proteinchemische Assays	34
2.2.2.1	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i>	34
2.2.2.2	<i>ABTS-Assay</i>	35
2.2.2.3	<i>Phenolrot-Assay</i>	35
2.2.2.4	<i>Azure B-Assay</i>	36
2.2.2.5	<i>Veratrylalkohol-Assay</i>	36
2.2.2.6	<i>DMP-Assay</i>	36
2.3	Enzymkatalyse	37
2.3.1	Quervernetzung von Ferulasäure mit Lcc1 und HjP	37
2.3.2	Umsetzung von Curcumin in 30% Ethanol	37
2.3.3	Umsetzung von Curcumin in Diethylether mit Lcc1.....	38
2.3.4	Umsetzung der O-Acetylcurcuminoide mit Lcc1	39
2.3.5	Umsetzung der O-Monoacetylcurcumine mit Lcc1	39
2.3.6	Umsetzung von Vanillin durch Lcc1 und HjP.....	39
2.4	Isolierung von O-Monoacetylbisdemethoxycurcumin (5*) und O-Monoacetylcurcumin (6)	40
2.5	HPLC	40
2.6	LC-ESI(-)-MS	42
2.7	Identifizierung von Peptidfragmenten	45
2.8	GC-MS	45
2.9	FPLC	45
2.9.1	HIC	46
2.9.2	Ionenaustauschchromatographie	46
2.9.3	Affinitätschromatographie.....	47
2.10	Elektrophorese	48
2.10.1	IEF	48
2.10.2	SDS-PAGE	49
2.10.3	CBB-Färbung	49
2.10.4	Silberfärbung	49
2.10.5	Westernblot.....	50
2.10.6	Aktivitätsfärbung.....	50

2.10.7	Agarosegelelektrophorese	50
2.11	Molekularbiologische Methoden	50
2.11.1	Primer Design	50
2.11.2	PCR	54
2.11.2.1	Standard-PCR.....	54
2.11.2.2	Gradienten-PCR.....	55
2.11.2.3	Touch Down-PCR.....	55
2.11.2.4	Kolonien-PCR.....	56
2.11.2.5	Rückmutation des <i>lcc1</i> Gens.....	56
2.11.3	Klonierung von DNA-Sequenzen	56
2.11.3.1	Aufreinigung und Elution des zu klonierenden DNA-Fragmentes.....	56
2.11.3.2	Ligation.....	57
2.11.3.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> für die Transformation	57
2.11.3.4	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> für die Chaperon-Co-Expression	57
2.11.3.5	Transformation	57
2.11.3.6	Ermittlung positiver Klone.....	58
2.11.3.7	Plasmid-Präparation	58
2.11.3.8	Sequenzierung.....	58
2.11.3.9	Herstellung von Glycerolstocks	58
2.11.4	Identifizierung von Basidiomyceten über die ITS-Sequenz	58
2.11.5	cDNA-Synthese	58
2.11.6	Isolierung genomischer DNA	60
2.12	Heterologe Expression der <i>lcc1</i> in <i>E.coli</i>	60
2.12.1	Klonierung in den pCOLDI Expressionsvektor.....	60
2.12.2	Protein Expression	60
2.12.3	<i>In silico</i> Verfahren	61
3	Ergebnisse und Diskussion.....	62
3.1	Screening nach Oxidoreduktasen in Basidiomycetenkulturen.....	62
3.1.1	Verwendung der Induktoren Xylidin und Lignin	62
3.1.2	Alternative Induktoren Ferulasäure, Ethanol und Eichenholzspäne.....	66
3.1.3	ITS-Sequenzierung <i>Mgi</i> und <i>Haj</i>	69
3.2	A surfactant tolerant laccase of <i>Meripilus giganteus</i>	70
3.2.1	Introduction.....	71
3.2.2	Materials and Methods.....	72
3.2.3	Results.....	75
3.2.4	Discussion	81

3.3	Heterologe Expression der Lcc1 in <i>E.coli</i>	86
3.3.1	Expression im pCOLDI-System.....	86
3.3.2	Co-Expression der rek. Lcc1 mit Chaperonen	90
3.4	Charakterisierung einer Peroxidase aus <i>Hirneola auricula-judae</i> (<i>Haj</i>)	97
3.4.1	Proteinsequenzierung <i>Haj</i>	99
3.4.2	Fischen des Hjp-Gens.....	100
3.4.3	Alternative Aufreinigung der DyPs aus <i>Haj</i>	103
3.5	DyP aus <i>Pleurotus sapidus</i>	107
3.6	Oxidative Quervernetzung von Ferulasäure	110
3.7	Untersuchungen zum Abbau von Curcumin durch Lcc1 und Hjp zur Gewinnung von Vanillin	116
3.7.1	Abbau von Curcumin	116
3.7.2	Quervernetzung von Vanillin	120
3.7.3	Spaltung von O-Acetylcurcumin durch Lcc1	125
4	Ausblick	129
5	Literaturverzeichnis	130
6	Lebenslauf	156

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BIS	Bisacrylamid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cam	Chloramphenicol
CAR/PDMS	Carboxen [™] /Polydimethylsiloxan
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CDS	<i>Coding Sequence</i>
CPO	Chloroperoxidase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DAD	<i>Diode Array Detektor</i>
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
diFs	Dehydrodiferulasäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide Triphosphates</i>

DyP	<i>Dye-decolorizing</i> Peroxidase
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz
ESI	Elektronenstoßionisation
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EtOH	Ethanol
FA	Ferulasäure
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GC	Gaschromatograph
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HjP	<i>Hirneola auricula-judae</i> Peroxidase
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i>
IMAC	<i>Immobilized-Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
konz.	Konzentriert
LB	Luria-Bertani-Flüssigmedium
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
Lig	Lignin
LiP	Ligninperoxidase
M	Molar (mol L^{-1})
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MeOH	Methanol
min	Minute
MM	Minimalmedium

Mn-Peroxidase	Manganperoxidase
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MTBE	Methyl tert-butylether
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular Weight</i>
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
n.d.	Nicht detektiert
neg.	Negativ
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
rek.	Rekombinant
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
RT	Raumtemperatur
SBP	<i>Soybean Peroxidase</i>
SDS	Sodium Dodecylsulfate
SEC	Size Exclusion Chromatography
SNL	<i>Standard Nutrient Liquid</i>
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>

ss	<i>Single stranded</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TMBZ	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
tRNA	<i>Transfer Ribonucleic Acid</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TOF	<i>Time Of Flight</i>
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
UV	Ultraviolet
Vis	<i>Visible</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Xyl	Xylidin (2,5-Dimethylanilin)

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- und Dreibuchstabencode abgekürzt.

Zusammenfassung

Durch ein umfangreiches Screening gelang es, zahlreiche neue Laccasen und Peroxidasen aus Basidiomyceten zu identifizieren. Durch Variation der Kultivierungsbedingungen konnten die vorhandenen Oxidoreduktaseaktivitäten drastisch erhöht oder gänzlich neu induziert werden. Hierfür wurden lebensmitteltaugliche und kostengünstige Zusätze, wie Ethanol, Ferulasäure und Eichenholzspäne als potente Induktoren ermittelt und zum Einsatz gebracht. Mit den Pilzen *Meripilus giganteus* und *Hirneola auricula-judae* konnten gute Laccase- bzw. Peroxidaseproduzenten identifiziert werden.

Die Laccase (Lcc1) aus dem Weißfäulepilz *Meripilus giganteus* wurde mit sehr guten Ausbeuten über konventionelle Chromatographie oder durch Schäumung isoliert und anschließend biochemisch charakterisiert. Das Enzym, mit einem isoelektrischen Punkt von 3,1 und einem Molekulargewicht von 55 kDa, ist in der Lage etablierte Laccasesubstrate wie 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) und 2,6-Dimethoxyphenol über einen breiten pH-Bereich von 2,0 bis 6,5 zu oxidieren. Darüber hinaus besitzt die Lcc1 niedrige K_m -Werte von 8 μM (ABTS) und 80 μM (DMP) und eine herausragende katalytische Effizienz gegenüber dem nicht-phenolischen Substrat ABTS mit $37437 \text{ k}_{\text{cat}}/\text{k}_m \text{ (s}^{-1} \text{ mM}^{-1}\text{)}$. Weiterhin offenbarte die Laccase nicht nur eine sehr gute Stabilität gegenüber hohen Konzentrationen an verschiedenen Metallionen, EDTA und Tensiden, sondern zeigte zudem in Anwesenheit von grenzflächenaktiven Verbindungen eine deutlich gesteigerte Aktivität und Stabilität.

Durch Ableitung von degenerierten Primern aus *de novo* sequenzierten Peptidfragmenten gelang die vollständige Amplifikation der 1,551 Bp langen *lcc1*-Sequenz, welche für 516 Aminosäuren kodiert und 82% Identität und 90% Ähnlichkeit mit einer Laccase aus *Rigidoporus microporus* aufweist. Die Sequenz wurde anschließend erfolgreich zur heterologen Expression der rek. Lcc1 unter Verwendung eines Kälteexpressionssystems mit Co-Expression der Chaperone GroEL-ES in *E.coli* genutzt. Hiermit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Expression einer Laccase pilzlichen Ursprungs, unter Erhalt der Aktivität gegenüber ABTS, in einem prokaryotischen Wirtssystem beschrieben werden.

Durch die Induktion von *Hirneola-auricula-judae* mit Xylidin und Ethanol konnten sowohl eine neue als auch zwei bereits literaturbekannte Mn-unabhängige Peroxidasen mit isoelektrischen Punkten von 3,9 sowie 4,3 und 4,1 identifiziert werden. Mit einem zweistufigen Aufreinigungsprozess wurde eine einfache und schnelle Methode zur gleichzeitigen Isolierung der als *dye-decolorizing* Peroxidase (DyP) klassifizierten Enzyme etabliert. Für eine weitere DyP aus *Pleurotus sapidus* gelang unter Zuhilfenahme des sequenzierten und annotierten Genoms des engen Verwandten *Pleurotus ostreatus* als Vorlage die Amplifizierung einer 830 Bp langen Teilsequenz.

Anschließend wurden mögliche Anwendungen für die in dieser Arbeit isolierten Oxidoreduktasen Lcc1 aus *Meripilus giganteus* und den DyPs aus *Hirneola auricula-judae* in der Lebensmittelindustrie untersucht. Sowohl die Laccase als auch die DyPs katalysieren die oxidative Quervernetzung von

Ferulasäure zu höhermolekularen Produkten, welche über LC-ESI(-)-MS als Di-, Tri- und Tetramere identifiziert wurden. Dies verdeutlicht das mögliche Potential des Einsatzes dieser Enzyme in der Backwarenindustrie zur Verbesserung der rheologischen Eigenschaften von Teigen durch oxidative Quervernetzung von phenolhaltigen Polysacchariden wie Arabinoxylanen.

Die isolierten Oxidasen sind zudem in der Lage, Curcumin effektiv in einem Zwei-Phasen System zu spalten. Durch Acetylierung des Curcumins und Isolierung des O-Monoacetylcurcumins konnte die Bildung von Acetylvanillin aus O-Monoacetylcurcumin mit einem Umsatz von 55% und einer Ausbeute von 45% bestätigt werden und somit eine mögliche Methode zur Gewinnung von „natürlichem“ Vanillin zum Einsatz in der Lebensmittelindustrie mittels oxidativer Spaltung von Curcumin aufgezeigt werden.

Des Weiteren konnte mit den isolierten DyPs die effektive Transformation von Vanillin zu Divanillin, welches interessante Geschmackseigenschaften aufweist, beschrieben werden. Es wurden neue bisher unbekannte Di-, Tri- und Tetramere des Vanillins durch LC-ESI(-)-MS identifiziert.

Schlagwörter:

Basidiomyceten, Laccase, DyP, Expression, *E. coli*, Quervernetzung, Curcumin, Vanillin

Abstract

During an extended screening of white rot fungi new laccases and peroxidases were identified. By variation of the culture conditions existing oxidoreductase activities were enhanced significantly, or completely new activities were induced. Cheap and food grade additives such as ethanol, ferulic acid or oak wood chips were found as potent inducers. Amongst the fungi screened *Meripilus giganteus* was identified as a high laccase and *Hirneola-auricula-judae* as a high peroxidase producer.

The laccase (Lcc1) from the white-rot fungus *Meripilus giganteus* was purified with superior yields by conventional chromatography or by foam separation and further characterized. Lcc1, which possesses an isoelectric point of 3.1 and a molecular weight of 55 kDa, was found to oxidize the common laccase substrate 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,6-dimethoxyphenol (DMP) over a broad pH range from 2.0 to 6.5. In addition, the laccase exhibits low K_m values of 8 μM (ABTS) and 80 μM (DMP) and remarkable catalytic efficiency towards the non-phenolic substrate ABTS of 37,437 k_{cat}/k_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$). This oxidoreductase not only showed a high stability towards high concentrations of various metal ions, EDTA and surfactants but also an increased activity as well as a striking boost of stability in the presence of surface active compounds.

Degenerated primers were deduced from *de novo* sequenced peptide fragments and the complete coding sequence of *lcc1* was determined to 1,551 bp. The deduced 516 amino acid (aa) sequence of the *lcc1* gene shares 82% identity and 90% similarity with a laccase from *Rigidoporus microporus*. Afterwards the sequence was successfully utilized for the heterologous expression of rec. Lcc1 in *E.coli*. Using a cold shock expression system and co-expression with the chaperones GroEL-ES the expression of a fungal laccase was achieved in a procaryotic host for the first time, while preserving the ABTS-activity.

After induction with ethanol and xylinine two already known manganese independent peroxidases as well as a newly discovered manganese independent peroxidase with isoelectric points of 4.3, 4.1 and 3.9, respectively, could be identified. A simple and fast two-step purification protocol for the isolation of the respective peroxidases, hereafter classified as dye-decolorizing peroxidases, was established. By using the sequenced genome of the immediate relative *Pleurotus ostreatus* as template, a 830 bp coding fragment of another DyP from *Pleurotus sapidus* was successfully obtained.

Subsequently possible applications in the food industry of the purified Lcc1 from *Meripilus giganteus* and the DyPs from *Hirneola auricula-judae* were examined. The Laccase as well as the DyPs catalyses the cross-linking of ferulic acid to higher molecular weight compounds, which were identified by means of LC-ESI(-)-MS as di-, tri- and tetramers of ferulic acid. This demonstrates the potential of these enzymes for applications in the food industry, e.g. for the improvement of the rheological properties of dough by enzymatic cross-linking of phenolic polysaccharides like arabinoxylans.

Furthermore, both oxidases were found to degrade efficiently curcumin in a two-phase system. Curcumin was acetylated and the corresponding O-monoacetylcurcumin was oxidatively cleaved with a conversion rate of 55% yielding 45% vanillin acetate. This opens access to the production of “natural” vanillin, a highly demanded flavor compound in the food industry.

Another biotransformation, the dimerisation of vanillin to the tasty divanillin, was achieved by the use of the purified DyPs. Additionally, new di-, tri-, and tetramers of vanillin were identified by means of LC-ESI(-)-MS.

Keywords:

Basidiomycetes, laccase, DyP, expression, *E. coli*, cross-linking, curcumin, vanillin

1 Einleitung

1.1 Enzyme als Biokatalysatoren

Enzyme sind Biokatalysatoren, die bei chemischen Reaktionen die Aktivierungsenergie herabsetzen und so die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Beeinflussung des Reaktionsgleichgewichtes beschleunigen. Als Biokatalyse wird der Einsatz von Enzymen im Gegensatz zu ganzen Zellen (Biotransformation) zur Durchführung von chemischen Reaktionen bezeichnet. Enzyme wurden bereits seit tausenden von Jahren unbewusst von Menschen verwendet, bevor ihre Natur allmählich verstanden wurde. Die Anwendung der Biokatalyse hat ihre Wurzeln in der Herstellung und Konservierung von Nahrungsmitteln und alkoholischen Getränken im alten Mesopotamien sowie China und Japan. Homers Ilias erwähnt erstmals die Verwendung des Magens einer jungen Ziege zur Herstellung von Käse. Lange Zeit blieb die wahre Natur der Biokatalyse unklar. 1833 konnte erstmals von Payan und Person ein enzymatischer Komplex aus Malz isoliert werden, der den Abbau von Stärke zu Glucose katalysiert. Die sogenannte Diastase war das erste entdeckte Enzym. 1835 erkannte Berzelius die Hydrolyse von Stärke durch Diastase als katalytische Reaktion und 1876 schlug Kühne erstmals vor, diese isolierten Substanzen Enzyme zu nennen (Bornscheuer and Buchholz 2005; Buchholz *et al.* 2005; Liese *et al.* 2006).

Dabei bieten Enzyme als Biokatalysatoren einige entscheidende Vorteile gegenüber der klassischen Katalyse. Als hocheffiziente Katalysatoren beschleunigen sie Reaktionen mit einem Faktor von 10^8 - 10^{10} , selten sogar bis zu 10^{17} . Im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren, die gewöhnlich im molaren Konzentrationsverhältnis zum Substrat von 0,1-1% (mol/mol) eingesetzt werden, können die meisten enzymatischen Reaktionen mit 10^{-3} - 10^{-40} % (mol/mol) durchgeführt werden (Faber 2011). Des Weiteren sind Enzyme vollständig biologisch abbaubar und es gibt für nahezu jede chemische Reaktion eine enzymkatalysierte Alternative (Sih *et al.* 1977). Das Arbeiten unter milden Reaktionsbedingungen (Temperatur, Druck, pH-Wert), welche die Bildung von unerwünschten Nebenreaktionen durch Zersetzung, Racemisierung oder Umlagerung des Produktes minimieren, ist zusätzlich zu den Aspekten des Arbeitsschutzes und der Ökobilanz von entscheidendem Vorteil. Der größte Vorteil der Verwendung von Enzymen als Biokatalysatoren ist jedoch ihre hohe Regio-, Chemo-, und Enantioselektivität, welche sowohl eine hohe Ausbeute als auch Reinheit und einfache Produktisolierung ermöglichen. Dies ist besonders für die Herstellung von pharmazeutischen Produkten, in denen eine ganz besonders hohe Anforderung an die Produktreinheit gestellt wird, von eminenter Bedeutung.

Stolpersteine im Siegeszug der Enzyme in der organischen Katalyse sind zum einen die engen Funktionsparameter in der Prozessführung hinsichtlich der Temperatur, des pH-Wertes und des Einsatzes von organischen Lösungsmitteln. Von großem Nachteil ist die Tatsache, dass viele Enzyme ihre opti-

male Aktivität in wässrigen Systemen, in denen viele organische Substrate nicht löslich sind, entfalten. Darüber hinaus kann bei den meisten Enzymen eine Verringerung oder ein Verlust der Aktivität in organischen Lösungsmitteln beobachtet werden (Arnold 1990; Klibanov 1990). Andererseits kann die Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln auch zu einer Erhöhung der Stabilität und einer „positiven“ Änderung der Selektivität führen (Klibanov 2001). Möglichkeiten der Verbesserung der Stabilität von Enzymen sind eine Immobilisierung (D'Souza 1999; Klibanov 1979) oder die Veränderung des Enzyms durch gerichtete Evolution (Luetz *et al.* 2008). So konnte die Stabilität einer Laccase aus *Myceliophthora thermophila* gegenüber verschiedenen Co-Solventien durch fünf Runden gerichteter Evolution und Expression in *Saccharomyces cerevisiae* deutlich verbessert werden (Zumárraga *et al.* 2007). Auch die Verwendung von ionischen Flüssigkeiten kann für Laccasen und Peroxidasen eine weitere Möglichkeit der Prozessoptimierung darstellen (Cantone *et al.* 2007).

Ein weiterer Nachteil ist eine mögliche Inhibierung von Biokatalysatoren durch eine hohe Substrat- oder Produktkonzentration und die Abhängigkeit einiger Enzyme von teuren Cofaktoren, welche aufwendig regeneriert oder zudosiert werden müssen. Obwohl Enzyme mitunter eine sehr hohe Promiskuität hinsichtlich der Substratauswahl zulassen, gelang es bisher nicht, teure und instabile Cofaktoren, wie z.B. NAD(P)H und ATP, durch synthetische zu ersetzen (Faber 2011).

Die größte Herausforderung besteht aber in der kostengünstigen Bereitstellung von Enzympräparaten, um mit den meist deutlich kostengünstigeren klassischen Katalysatoren in der Herstellung von Produkten abseits von Feinchemikalien konkurrenzfähig zu sein. Der rasante Fortschritt auf dem Gebiet der Molekularbiologie, der zu einer konstanten Verringerung der Kosten für die Enzymherstellung führt (Faber 2011), ermöglicht es, immer mehr organische Synthesen durch Biokatalyse zu ersetzen. Die Grundlage für eine kostengünstige Produktion von Enzymen im industriellen Maßstab ist die heterologe Expression, welche zumeist in Prokaryoten wie *E.coli* und verschiedenen *Bacillus*-Stämmen sowie in Eukaryoten, wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* und *Aspergillus niger*, seltener in Pflanzen-, Insekten- oder Säugerzellen erfolgt (Yin *et al.* 2007). Oxidoreduktasen, wie Laccasen, werden vorrangig in filamentösen Pilzen und Hefen exprimiert (Kunamneni *et al.* 2008a). Die heterologe Expression von Enzymen ermöglicht es, maßgeschneiderte Enzyme mit den gewünschten Eigenschaften über „protein engineering“ für die Anwendung in der Biotechnologie bereitzustellen.

1.2 Oxidoreduktasen

Enzyme werden nach dem Nomenklatorsystem der *International Union of Biochemistry* (IUB) gemäß der Art der katalysierten Reaktion in sechs Enzymklassen eingeteilt (Buchholz *et al.* 2005). Oxidoreduktasen werden dabei in die erste Klasse (EC 1) eingeordnet und abhängig vom verwendeten Elektronendonator weiter in verschiedene Unterklassen eingeteilt (Burton 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde das Hauptaugenmerk auf lignolytische Enzyme aus Basidiomyceten, den Manganperoxi-

xidasen (EC 1.11.1.13), Ligninperoxidasen (EC 1.11.1.14), versatilen Peroxidasen (EC 1.11.1.16), *dye-decolorizing* Peroxidasen (EC 1.11.1.19) und vor allem Laccasen (E.C. 1.10.3.2), gelegt und soll in dieser Einleitung besondere Beachtung finden.

1.2.1 Peroxidasen

Peroxidasen (EC 1.11.1) sind in Pflanzen, Mikroorganismen und Tieren weit verbreitet und werden zumeist nach ihrer Quelle, wie z.B. die Meerrettichperoxidase, oder ihrem Substrat, wie im Beispiel der Ligninperoxidase, benannt. Allen gemein ist die Verwendung von Peroxiden, vorrangig Wasserstoffperoxid, als Elektronenakzeptor. Der Großteil der Peroxidasen sind Häm-Enzyme mit Eisen-Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe. Einige Peroxidasen, wie Manganperoxidasen, besitzen zusätzlich ein Metallion, wie Mangan, in ihrem aktiven Zentrum (Adam *et al.* 1999).

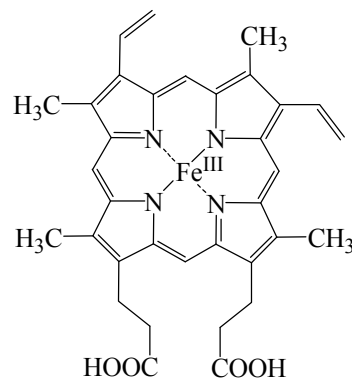


Abb. 1: Struktur des Eisen-Protoporphyrin IX

Häm-Peroxidasen werden prinzipiell in zwei Haupt-Superfamilien eingeteilt, die Peroxidasen-Cyclooxygenasen (früher Tier- oder Säugetierperoxidasen) und die nicht-tierischen (*non-animal*) Peroxidasen (Synonym Pflanzen-Peroxidasen). Die nicht-tierischen Peroxidasen bestehen aus drei Klassen: den intrazellulären und bakteriellen Peroxidasen Klasse I, den sekretierten pilzlichen Peroxidasen Klasse II und den sekretierten Pflanzenperoxidasen Klasse III (Hofrichter *et al.* 2010).

1.2.1.1 Klasse II Peroxidasen

Die Klasse II Peroxidasen sind extrazelluläre Enzyme und werden weiter in *Coprinopsis cinerea* Peroxidasen (CiP), Manganperoxidasen (MnP), Ligninperoxidasen (LiP) und versatile Peroxidasen (VP) unterteilt (Hofrichter *et al.* 2010). Die katalytische Häm-Gruppe ist zwischen zwei Domänen, welche jeweils durch ein Ca^{2+} -Ion stabilisiert werden, eingebettet und liegt hexa-koordiniert mit einem proximalen Histidin und einem distalen Wassermolekül vor. Der allgemeine katalytische Mechanismus besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt (Abb. 2) verdrängt H_2O_2 , unterstützt durch ein distales His, welches als Protonakzeptor für das H_2O_2 fungiert, das distal am Häm gebundene Wassermolekül unter

Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem resultierenden Hydroperoxyl-Anion und dem Häm ($\text{Fe}^{3+}\text{-O-OH}$).

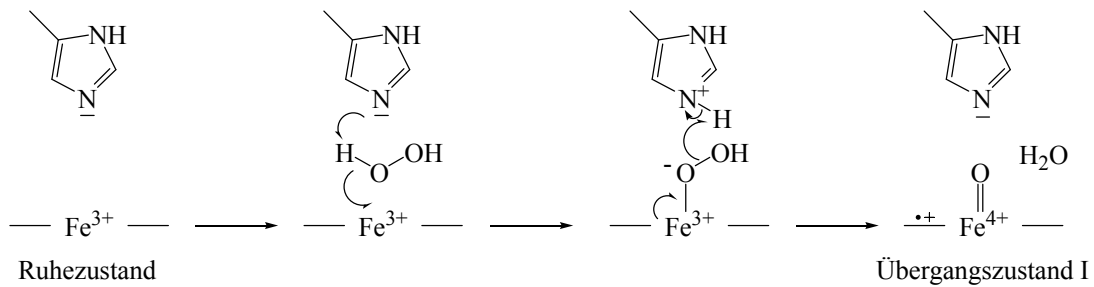


Abb. 2: Schematische Darstellung der Bildung des Übergangszustandes I bei Peroxidasen, die schwarzen Striche links und rechts des Eisenatoms repräsentieren die Porphyrinringe, im Übergangszustand I symbolisiert der schwarze Punkt und das Plus-Zeichen den als kationisches Radikal vorliegenden Porphyrinring, modifiziert nach Yoshida *et al.* (2011)

Über einen anschließenden „push and pull“-Effekt wird die Peroxobindung unter Abspaltung eines Wassermoleküls und Bildung des Übergangszustandes I gespalten. In diesem liegt der Tetrapyrrolring als kationisches Radikal vor, der den Fe(IV)-Oxokomplex koordiniert (Abb. 2). Durch zwei individuelle Ein-Elektronen-Oxidationen der Substrate wird, wie in Abb. 3 dargestellt, der Übergangszustand I zum Übergangszustand II und anschließend unter Abgabe eines weiteren Wassermoleküls zum Ausgangszustand reduziert (Conesa *et al.* 2002; Hofrichter *et al.* 2010; Martínez 2002). Durch überschüssiges H_2O_2 können LiP und MnP über Ausbildung eines weiteren Übergangszustands III inaktiviert werden (Cai and Tien 1992; Wariishi *et al.* 1992).

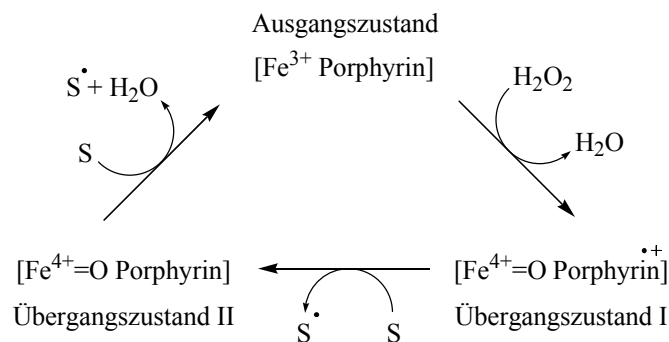


Abb. 3: Katalytischer Zyklus von Peroxidasen, modifiziert nach (Martínez 2002)

Klasse II Peroxidasen besitzen ein breites Substratspektrum, sind wie die meisten extrazellulären Enzyme glykosidiert (5-15%), besitzen einen isoelektrischen Punkt zwischen 3-6, eine Größe von 35-50 kDa und werden von allen lignolytisch aktiven Pilzen zur Degradation von Lignin genutzt (Hofrichter *et al.* 2010).

Ligninperoxidasen wurden zuerst im Modellorganismus *Phanerochaete chrysosporium* beschrieben und werden meist als komplexes Gemisch von Isoenzymen und Isoformen sekretiert (Hammel and

Cullen 2008). Die Gruppe der LiP sind die katalytisch leistungsfähigste Klasse II Peroxidasen, welche durch ihr hohes Redoxpotential von +1,4-1,5 V in der Lage sind nicht-phenolische Lignin Modellsubstrate, meist Aromaten mit einer geringen Elektronendichte, wie Veratrylalkohol und β -O-4 verknüpfte Arylglycerol-Arylether, direkt zu oxidieren (Hammel and Cullen 2008; Hofrichter *et al.* 2010). Die Oxidation erfolgt an der Enzymoberfläche über ein katalytisch aktives Trp (Abb. 4), welches an der Elektronenübertragung über einen „*long-range electron-transfer*“-Mechanismus (LRET) von den aromatischen Substraten zur Häm-Gruppe beteiligt ist (Choinowski *et al.* 1999; Smith *et al.* 2009). Dies erlaubt es der LiP kleine und auch große aromatische Substrate, wie Lignin-Oligomere, die nicht in direkten Kontakt mit dem Häm treten können, zu oxidieren (Hammel and Cullen 2008). Darüber hinaus besitzt die LiP eine zweite Substrat-Bindungsstelle am Häm-Komplex, an der Farbstoff-Moleküle wie ABTS oxidiert werden können (Doyle *et al.* 1998). Zur Degradation von großen Ligninkomplexen oxidiert die LiP Veratrylalkohol, welches als sehr effizienter Mediator fungiert. Gleichzeitig schützt Veratrylalkohol das Enzym vor einer Inaktivierung durch H_2O_2 (Conesa *et al.* 2002; Hammel and Cullen 2008).

Manganperoxidasen sind die am häufigsten vorkommenden Klasse II Peroxidasen bei holz- und lignocellulose-abbauenden Basidiomyceten. Wie auch die LiP wurden sie zuerst in *Phanerochaete chrysosporium* beschrieben (Kuwahara *et al.* 1984; Martínez 2002). Die hohe Substratspezifität wird durch eine Mn^{2+} -Bindungsstelle in der Nähe des Häm, in der das Ion sechsfach-koordiniert vorliegt und die eine rasche Übertragung der Elektronen auf die Häm-Gruppe gewährleistet, hervorgerufen (Gold *et al.* 2000; Kamitsuji *et al.* 2005; Sundaramoorthy *et al.* 2005). Für die Vollständigkeit eines Peroxidasezyklus werden zwei Mn^{2+} zu zwei Mn^{3+} oxidiert. Diese diffundieren aus dem aktiven Zentrum und werden durch Chelatisierung mit organischen Dicarbonsäuren, wie Oxalat und Malonat, welche vom Pilz gebildet werden, stabilisiert. Somit entstehen starke diffusionsfähige Charge-Transfer-Mediatoren mit einem Redoxpotential von ca. +1,0-1,2 V, die sowohl phenolische Verbindungen und Farbstoffe als auch große komplexe Polymere, wie Ligninstrukturen, oxidieren können (Hofrichter *et al.* 2010; Martínez 2002). Ein zweiter postulierter Abbauweg von Ligninstrukturen beruht auf der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren durch Mn^{3+} unter Bildung von Peroxyradikalen, welche nicht-phenolisches Lignin oxidieren (Hammel and Cullen 2008).

Versatile Peroxidasen wurden zuerst in den Weißfäulepilzen *Pleurotus eryngii* (Camarero *et al.* 1999) und *Bjerkandera spp.* (Mester and Field 1998) beschrieben und besitzen eine hohe Strukturverwandtschaft mit LiP und beide katalytische Eigenschaften von LiP und MnP. Versatile Peroxidasen verfügen sowohl über das LiP-charakteristische Trp als auch eine Mn^{2+} -Bindungsstelle (Abb. 4) und können nicht-phenolische Substrate, wie β -O-4 verknüpfte Arylglycerol-arylether und Veratrylalkohol, effektiver oxidieren als LiP. Des Weiteren sind sie in der Lage, Hydrochinone und substituierte Phenole in der Abwesenheit von Veratrylalkohol oder Mn^{2+} im Gegensatz zu LiP und MnP direkt zu oxidieren (Martínez 2002). Wie LiP besitzen sie ein Redoxpotential von ca. +1,4-1,5V (Hofrichter *et al.* 2010).

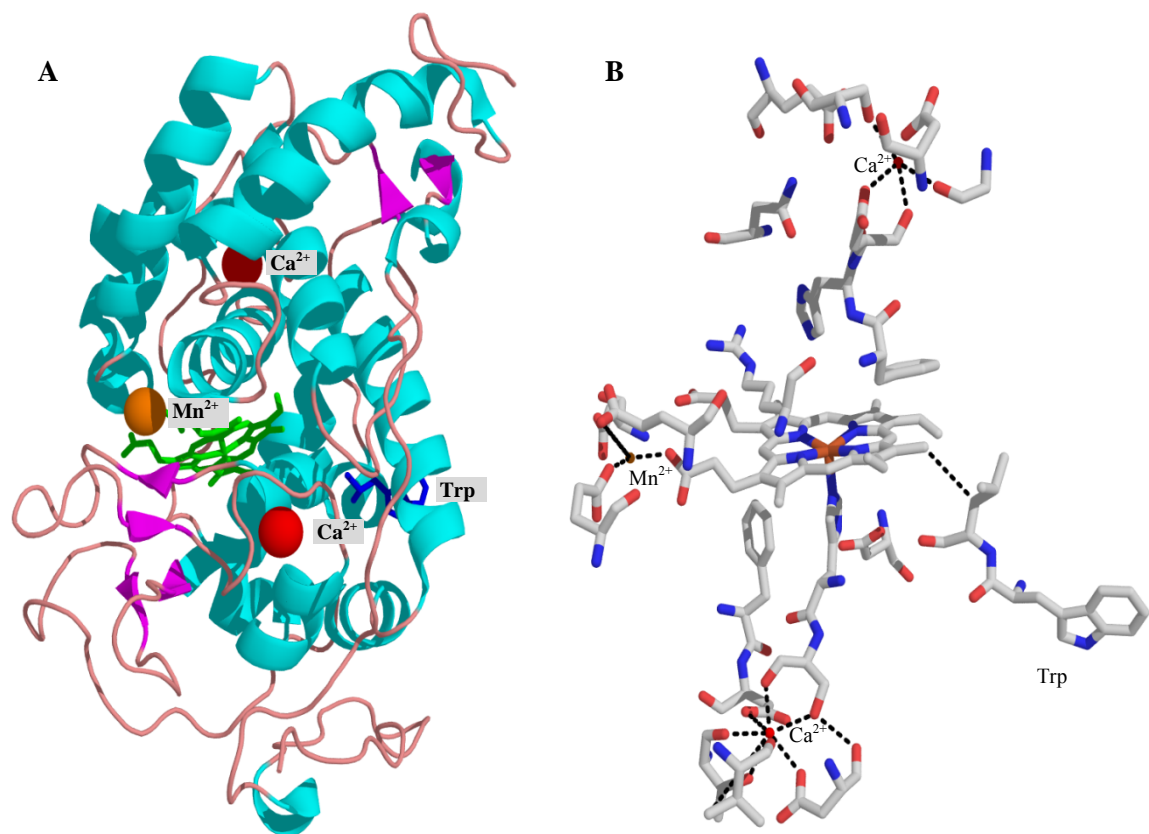


Abb. 4: (A) Molekülstruktur einer versatilen Peroxidase (VPL2) aus *Pleurotus eryngii* (pdb 2BOQ) mit dem Häm-Molekül (grün), den Ca^{2+} -Ionen (rot) sowie den katalytisch aktiven Mn^{2+} -Ion (orange) und Trp (blau), (B) Darstellung des aktives Zentrums, modifiziert nach Martínez (2002) ¹

Die extrazelluläre Peroxidase aus *Coprinopsis cinerea* (CiP) ist in der Lage, wie die Pflanzenperoxidase HRP, Phenole und kleine Farbstoffmoleküle leicht zu oxidieren. Im Gegensatz zu LiP und MnP fehlt ihr allerdings das Vermögen, Veratrylalkohol zu oxidieren und Mn^{2+} zu binden. Sie wird daher eher als „low-redox-potential“ Peroxidase angesehen (Hofrichter *et al.* 2010).

1.2.1.2 Dye-decolorizing Peroxidasen

Dye-decolorizing Peroxidasen (DyP) bilden eine neue Superfamilie innerhalb der Häm-Peroxidasen und werden in weitere Subfamilien A, B, C und D eingeteilt². Sie sind in der Lage, phenolische und nicht-phenolische Stoffe ohne Mn^{2+} zu oxidieren (Liers *et al.* 2010). Im Besonderen können sie verschiedenste synthetische Anthrachinon-Farbstoffe, wie Reactive Black 5, oxidativ abbauen. Dieser Eigenschaft entstammt ihre Bezeichnung dye-decolorizing Peroxidase (Sugano 2009). Die erste DyP

¹Sämtliche Proteinabbildungen wurden mittels PyMol (<http://www.pymol.org/>) erstellt und mit POV-Ray (<http://www.povray.org/>) gerendert

²PeroxiBase, <http://peroxibase.toulouse.inra.fr/classes.php>, abgerufen am 24.05.12

wurde 1995 im Basidiomyceten *Bjerkandera adusta* Dec 1 (früher *Thanatephorus cucumeris* Dec 1) (Kim *et al.* 1995) entdeckt und ist ein glykosidiertes Häm-Enzym (17%) mit einer molekularen Masse von 60 kDa und einem pI von 3,8. Wie in den meisten Pilzen, in denen DyP gefunden wurde, werden oft mehrere Isoenzyme gebildet, deren Trennung und Isolierung sich mitunter als sehr schwierig herausstellte (Kim and Shoda 1999).

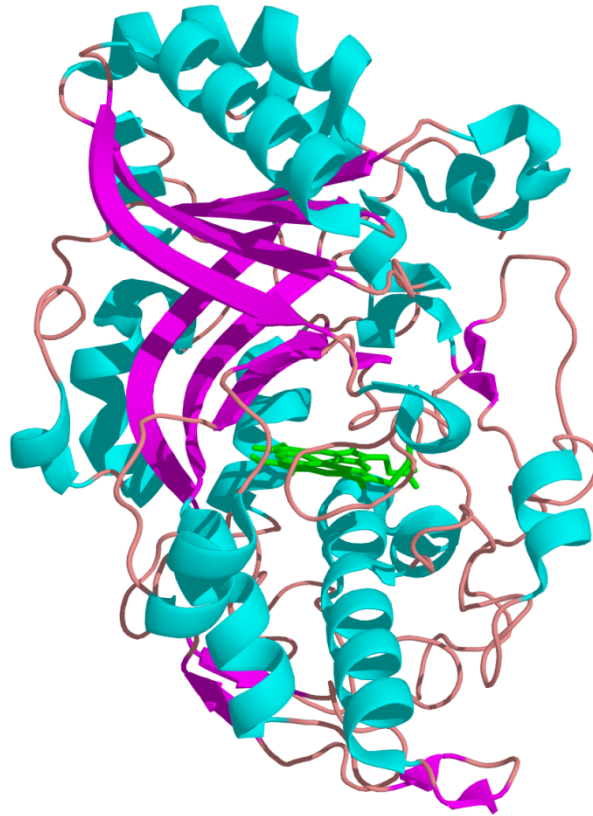


Abb. 5: Dreidimensionale Struktur einer DyP aus *Bjerkandera adusta* Dec 1 (früher *Thanatephorus cucumeris* Dec 1, pdb 3afv), Häm-Molekül ist grün dargestellt

DyPs zeigen nur eine sehr geringe Sequenz-Übereinstimmung von 0,5-5% mit anderen pilzlichen Peroxidasen wie den LiP, MnP oder CiP und besitzen statt des katalytischen His ein Asp im aktiven Zentrum (Yoshida *et al.* 2011). DyPs sind bzgl. ihrer Aminosäuresequenzen sehr heterogen, verfügen aber über eine gemeinsame dreidimensionale Struktur und ein hochkonserviertes GXXDG-Motiv. Neben ihrem Vermögen synthetische Farbstoffe mit hohem Redoxpotentialen zu oxidieren, besitzen DyPs weitere besondere katalytische Eigenschaften. So katalysieren sie die hydrolytische Spaltung des Anthrachinon-Rückgrates unter Bildung von Phthalsäure (Sugano 2009) und besitzen die Möglichkeit, auch β -Carotin in einer Peroxid-unabhängigen Reaktion zu spalten (Scheibner *et al.* 2008). Darüber hinaus zeigen DyPs herausragende Stabilität unter hohem Druck (2500 bar) und Temperatur (70 °C) (Pühse *et al.* 2009) und besitzen ein hohes Redoxpotential von ca. +1,2-1,5 V (Hofrichter *et al.* 2010). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine heterologe Expression mit hohen Ausbeuten in *E.coli* (Zelena *et al.* 2009b) und *Aspergillus spp.* (Zorn *et al.* 2011) möglich ist.

1.2.2 Laccasen

Laccasen (EC 1.10.3.2), welche ebenfalls eine Rolle im Ligninabbau spielen, repräsentieren die größte Gruppe der *multicopper oxidases*. Sie wurden bereits vor über 6000 Jahren zu Herstellung von Lack in China verwendet (Huttermann *et al.* 2001) und 1883 zum ersten Mal aus dem Lack-Baum (*Rhus verniciflura*) isoliert (Yoshida 1883). In der Natur sind Laccasen weit verbreitet und wurden in Pflanzen (Bao *et al.* 1993), Insekten (Dittmer and Kanost 2010), Archae (Dittmer and Kanost 2010), Bakterien (Sharma *et al.* 2007) und Pilzen (Baldrian 2006) beschrieben und erfüllen eine Vielzahl an physiologischen Rollen. In Pflanzen sind sie am Ligninaufbau (O'Malley *et al.* 1993) und der Wundheilung (Huttermann *et al.* 2001) beteiligt. In Insekten wirken sie möglicherweise an der Bildung des Exoskelettes (Sugumaran *et al.* 1992) mit und bei Bakterien sind sie für die Melaninbildung (Faure *et al.* 1994), Sporenbildung und Morphogenese (Sharma *et al.* 2007) verantwortlich. Ihr weit verbreitetes Vorkommen in Pilzen spiegelt ihre unterschiedlichen Rollen, wie Morphogenese, Pathogen-Host-Interaktion zwischen Pilz und Pflanze, Stressabwehr und Ligninabbau, wieder (Baldrian 2006). Laccasen aus Weißfäulepilzen bilden mit über 100 untersuchten Vertretern die größte Gruppe und sind meist monomere hochglykosidierte extrazelluläre Enzyme, mit einem Molekulargewicht zwischen 55-85 kDa und einem pI von 3-7 (Baldrian 2006). Laccasen koppeln die Ein-Elektronen-Oxidation von Substraten mit der Vier-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser.

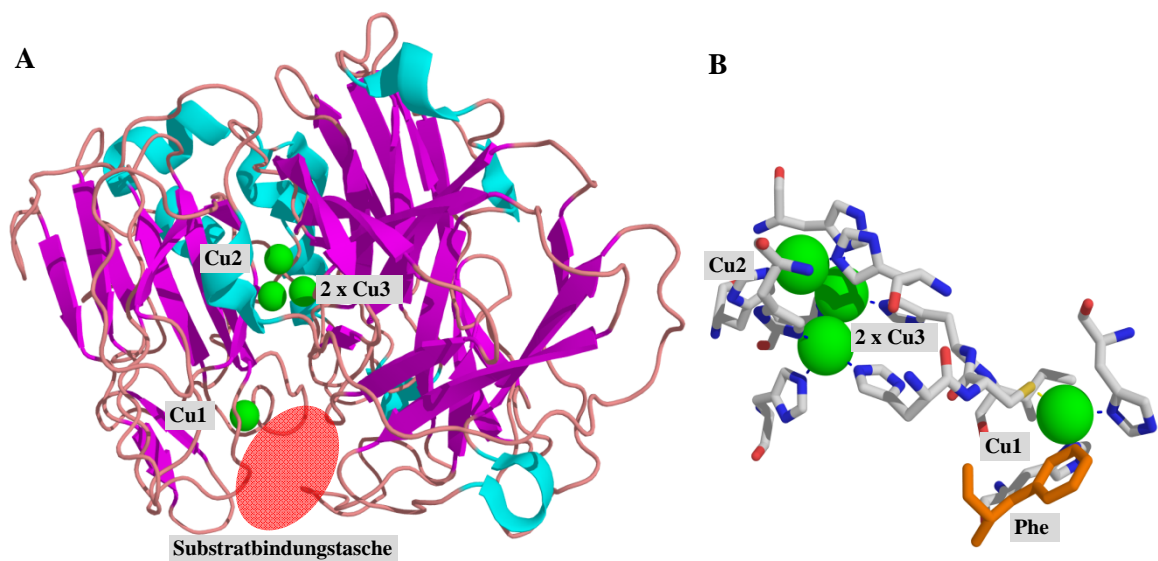


Abb. 6: (A) Dreidimensionale Struktur einer Laccase aus *Trametes versicolor* (PDB 1KYA) mit vier Cu-Atomen (grün) und der Substratbindungstasche (rot), (B) Koordination der Cu-Atome (grün), das für das hohe Redoxpotential wichtige Phe ist orange dargestellt, modifiziert nach Rodgers *et al.* (2010)

Hierfür sind vier unterschiedlich koordinierte Kupferionen, von denen eins (Cu1) im Zentrum T1, eins (Cu2) im Zentrum T2 und zwei (Cu3) im Zentrum T3 angeordnet sind verantwortlich (Abb. 6 und Abb. 7). Diese können aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften unterschieden werden. Das Cu1 ist dabei planar triangulär mit zwei His und einem Cys koordiniert, die mit dem Cu(II) einen

Charge-Transfer-Komplex bilden, der für die tiefe blaue Farbe (610 nm) der Laccasen verantwortlich ist (Lee *et al.* 2002). Das Cu1 bildet den primären Elektronenakzeptor, an dem die vier Ein-Elektronenübergänge von den Substraten katalysiert werden. Zwei weitere nicht- oder nur schwachkoordinierende Liganden liegen in unmittelbarer Umgebung des Cu1. Eines ist ein hochkonserviertes Ile, während das zweite (Phe, Leu, Met) variiert und vermutlich einen großen Einfluss auf das Redoxpotential der jeweiligen Laccase besitzt (Rodgers *et al.* 2010). Letzteres wurde lange Zeit für die Klassifizierung der Laccasen als *high-* (Phe), *middle-* (Leu) und *low-potential* (Met) Laccasen verwendet, wobei Laccasen mit einem Phe das höchste Redoxpotential (+0,73V) besitzen (Eggert *et al.* 1998). Jedoch gibt es noch weitere Strukturelemente, die wahrscheinlich für die Höhe des Redoxpotentials verantwortlich sind, weshalb eine alleinige Einteilung aufgrund der drei Aminosäuren nicht immer getätigt werden kann (Bonomo *et al.* 1998; Giardina *et al.* 2010; Xu *et al.* 1998).

Über ein hoch-konserviertes His-Cys-His-Motiv werden die Elektronen vom Cu1-Atom über einen LRET zum Cu2-Atom und den beiden Cu3-Atomen, welche in einem trinuklearen Kupfercluster angeordnet sind, übertragen. Zwischen den beiden Cu3-Atomen wird der molekulare Sauerstoff gebunden (Abb. 7) und anschließend, ohne die Freisetzung von Peroxointermediaten, zu Wasser reduziert (Rodgers *et al.* 2010).

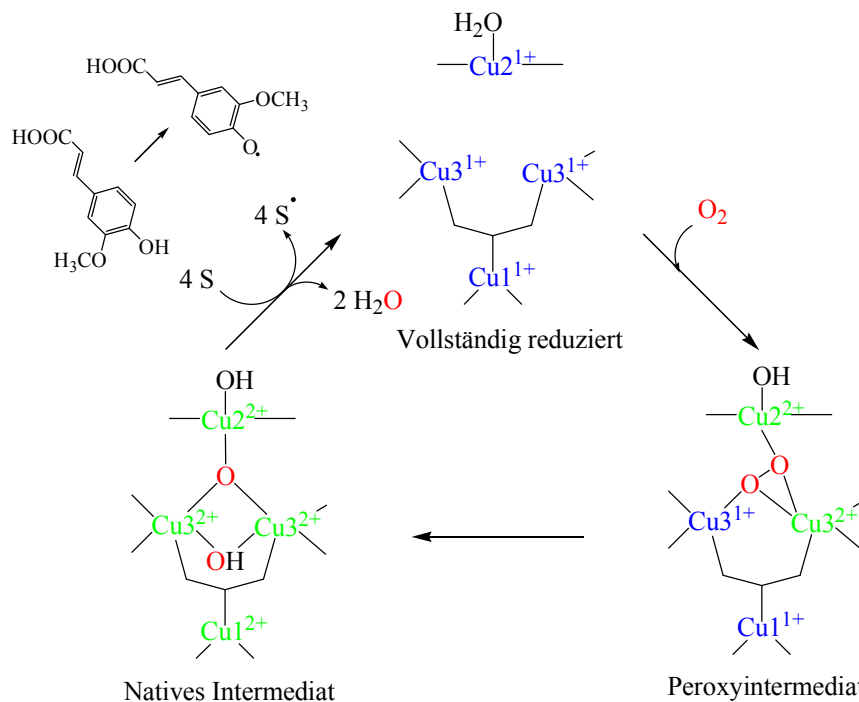


Abb. 7: Mechanismus der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser in Multikupferoxidasen, Cu1 (Zentrum 1), Cu2 (Zentrum 2), Cu3 (Zentrum 3), modifiziert nach Solomon *et al.* (2008)

Darüber hinaus gibt es Laccasen mit abweichenden spektroskopischen Eigenschaften. Die „gelben“ Laccasen besitzen aufgrund der Modifizierung ihres aktiven Zentrums mit Degradationsprodukten des Lignins (Pozdnyakova *et al.* 2006) keine charakteristische Absorptionsbande bei 610 nm sondern eine

„Schulter“ bei 320-340 nm (Leontievsky *et al.* 1997). Sie sind in der Lage, nicht-phenolische Substrate ohne Zusatz von Mediatoren zu oxidieren (Pozdnyakova *et al.* 2004). Daneben gibt es weitere Laccasen die statt der typischen Absorptionsbande bei 610 nm aufgrund eines teilweisen Austausches der Kupferatome durch Zink-, Mangan- oder Eisen-Atome eine breite Absorptionsbande um 400 nm zeigen (Schückel *et al.* 2011).

Laccasen sind wegen ihrem breiten Substratspektrum, der Unabhängigkeit von teuren Co-Faktoren und der Verwendung von O₂ als terminalem Elektronenakzeptor von hohem Interesse für Anwendungen in der „grünen“ Biokatalyse. Sie katalysieren eine breite Palette an Reaktionen, wie die Degradierung von Polymeren, Ringspaltung, Oxofunktionalisierung und Cross-links von aromatischen Verbindungen. Mit einem Redoxpotential von ca. +0,8 V besitzen sie einen entscheidenden Nachteil gegenüber den lignolytischen Peroxidasen, welcher aber durch Einsatz geeigneter Laccase-Mediatorsysteme (LMS) minimiert werden kann (Kunamneni *et al.* 2008a).

Ein Nachteil in der Anwendung in der Biotechnologie aller hier beschriebenen Oxidoreduktasen ist aber die geringe Verfügbarkeit an kostengünstigen Präparaten. Die heterologe Expression in geeigneten Wirten könnte für eine deutlich günstigere Produktion der Enzympräparate sorgen und damit in einer breiteren industriellen Anwendung von Oxidoreduktasen münden.

1.3 Biotechnologie

Laut Definition der *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) ist Biotechnologie „die Anwendung von Wissenschaft und Technik auf lebende Organismen, Teile von ihnen, ihre Produkte oder Modelle von ihnen zwecks Veränderung von lebender oder nichtlebender Materie zur Erweiterung des Wissenstandes, zur Herstellung von Gütern und zur Bereitstellung von Dienstleistungen“³. Sie ist eine interdisziplinäre und anwendungsbezogene Wissenschaft, in der Erkenntnisse und Verfahren aus den Gebieten Biochemie, Bioverfahrenstechnik, Gentechnik, Mikrobiologie und Zellbiologie angewandt werden⁴. Die Firma Röhm & Haas vertrieb 1913 als erste ein enzymhaltiges Waschmittel unter dem Handelsnamen „Burnus“, welches das Zeitalter der industriellen Biokatalyse einläutete (Antranikian 2006). Allein in Deutschland betrug der Umsatz der Biotechnologie-Unternehmen in 2011 über 2,37 Mrd. €⁵. Der globale Biotechnologiemarkt wuchs 2010 um 8,1% auf 250 Mrd. US \$ und bis 2015 wird ein Wachstum von 59% auf 400 Mrd. US \$ vorausgesagt. Dabei sind mehr als 130 Biotransformations-Prozesse im Industrie-Maßstab mit ca. 100 Enzymen dokumentiert (Faber 2011). Die Biotechnologie wird in drei verschiedene Hauptbereiche aufgeteilt, denen die

³ Definition der Biotechnologie laut OECD, <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Hintergrund/basiswissen.html>, Abruf der Seite 17.05.2012

⁴ Was ist Biotechnologie, <http://studiengang.beuth-hochschule.de/bt/was-ist-biotechnologie/>, Abruf der Seite 17.05.2012

⁵ biotechnologie.de, <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Hintergrund/studien-statistiken,did=123044.html>, Abruf der Seite 16.05.2012

Farben Rot für die medizinische Biotechnologie, Grün für die Agrobiotechnologie und Weiß für die industrielle Biotechnologie zugeordnet werden. In den letzten Jahren wurde versucht, weiteren biotechnologischen Anwendungsgebieten, wie z.B. der Meeresbiotechnologie (Blaue Biotechnologie) oder der Biotechnologie der Lebensmittel (Gelbe Biotechnologie), Farben zuzuordnen. In vielen Anwendungsgebieten verschwimmen jedoch die Grenzen, so dass oftmals eine eindeutige Klassifizierung nicht erfolgen kann. Den größten jährlichen Umsatz hat die Rote Biotechnologie mit einem Marktanteil von 67%⁶.

1.3.1 Rote Biotechnologie

Die Rote Biotechnologie, oder medizinische Biotechnologie genannt, beschäftigt sich mit der Erforschung und Entwicklung neuer Therapeutika und diagnostischer Verfahren. Zu den wichtigsten Disziplinen zählen die Genomics und Proteomics. Ein Meilenstein für die Rote Biotechnologie war die Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahr 2000. Beispiele für Anwendungen in der Roten Biotechnologie sind die Entwicklung neuer Antikörper für die Behandlung von Krebserkrankungen, neue Diagnostik von Krankheiten/Krankheitsverläufen, wie z.B. DNA-Chips für die Gendiagnostik und Tumormarker bei Krebspatienten, oder die Züchtung von Gewebe wie Knorpel, Knochen oder Haut aus Stammzellen (Tissue Engineering).

Eine Überschneidung von Weißer und Roter Biotechnologie tritt in der industriellen Herstellung von Therapeutika, wie Vitaminen, Aminosäuren, Steroiden und Proteinen (Enzymen, Hormone, Antibiotika, Cytokine, Vakzine), auf. In Deutschland waren nach Angaben des Verbandes der chemischen Industrie (VCI) 2011 insgesamt 198 biotechnologisch hergestellte Medikamente und Impfstoffe zugelassen⁷. Eines der umsatzstärksten Biopharmazeutika ist das Glykoprotein Epoetin/Darepoetin. Es ist als Wachstumshormon für die Bildung von roten Blutkörperchen von Bedeutung und wird in der Behandlung von Dialysepatienten und Krebspatienten verwendet. Nebenbei hat es auch im Hochleistungssport einen zweifelhaften Bekanntheitsgrad erreicht. Hergestellt wird Epoetin in tierischen Zelllinien, z.B. des chinesischen Streifenhamsters (Chinese Hamster Ovary, CHO) und des syrischen Goldhamsters (Baby Hamster Ovary, BHK-Zellen) (Bren *et al.* 2002).

Auch Oxidoreduktasen finden Anwendung in der Roten Biotechnologie. So kann beispielsweise die Bestimmung des Blutzuckerspiegels bei Diabetespatienten amperometrisch durch Verwendung von Glucoseoxidase in Blutzuckermessgeräten erfolgen. Ein interessanter Ansatz ist die Entwicklung einer elektrochemischen Zelle zur Stromerzeugung für medizinische Implantate. An der Anode ist hierfür eine Glucoseoxidase und an der Kathode eine Laccase immobilisiert. Die Stromerzeugung wird durch

⁶ Biotechnology: World Market Overview, MarketLine, <http://www.reportlinker.com/p0157576-summary/Biotechnology-Global-Industry-Guide.html>, abgerufen am 17.05.2012

⁷ Was ist Biotechnologie? <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Hintergrund/basiswissen.html>, Abruf der Seite 17.05.2012

Oxidation von Glucose auf der Oberfläche der Anode und die Reduktion des Sauerstoffs auf der Kathode realisiert (Choi 2005). Auch können Therapeutika, wie Antibiotika, mit Hilfe von Laccasen synthetisiert oder modifiziert werden (Schmid and Urlacher 2007).

1.3.2 Grüne Biotechnologie

Eine Alternative zu Nahrungsergänzungsmitteln, wie Vitaminpräparaten, ist die direkte und ausreichende Aufnahme über die Nahrung. Da durch die Verarbeitung von Reis, dem Polieren, die Aleuronschicht als nahezu einzige Quelle für β -Carotin im Reis entfernt wird, kann durch Verwendung von genetisch verändertem Reis (Golden Rice), welcher mit dem Provitamin β -Carotin angereichert ist, eine ausreichende Versorgung mit β -Carotin erreicht und somit eine Unterversorgung mit Vitamin A verhindert werden.

Allgemein beschreibt die Grüne Biotechnologie, oder Agrobiotechnologie, den Einsatz von Biotechnologie in der Landwirtschaft⁸. Dabei ist die Agrobiotechnologie keine neue Wissenschaft. Schon vor Jahrtausenden haben Bauern Pflanzen mit wünschenswerten Eigenschaften vermehrt und gekreuzt. Wo sich früher die Züchtung allein auf die Beobachtung und Analyse der äußerlichen Merkmale und ihre Erfahrung verlassen musste, können heutzutage gezielte Veränderungen vorgenommen werden. Ein Meilenstein hierfür war die vollständige Sequenzierung der Modellpflanze Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) im Jahr 2000 und des Reisgenoms 2002⁹.

Seitdem hat der Einsatz von biotechnologischen Verfahren in der Landwirtschaft immer mehr zugenommen. Durch den Eintrag von neuen Genen durch Transformation mit *Agrobacterium*-Stämmen, Beschuss durch Mikroprojekte („gene-gun“, z.B. mit Goldpartikel), Mikroinjektion von DNA oder durch direkte Transformation in Protoplasten (Murray 2011) in Nutzpflanzen können gezielt Veränderungen und Verbesserungen hervorgerufen werden. Die erste transgene Nutzpflanze war die „Flavr Savr™“-Tomate, bei der die Fruchtreife verzögert war, was zu einer längeren Haltbarkeit führte.

Infolge gentechnischer Veränderungen von Pflanzen kann die Herbizidtoleranz, die Resistenz gegenüber Krankheitserregern, wie Pilzen und Insekten, sowie die Toleranz gegenüber Trockenheit und Salzgehalt die Erträge deutlich verbessern und die Umwelt schonen. So wird eine Resistenz von Mais (Bt-Mais) gegenüber Schadinsekten, wie dem Maiszünsler, durch die Integration von Genen für Enterotoxine aus *Bacillus thuringiensis* ins Genom erreicht. Darüber hinaus können auch gezielt Eigenschaften von Pflanzen, wie das Fettsäurespektrum im Raps, die Anreicherung von Korn mit essentiellen Aminosäuren, wie Lysin, für die Futtermittelindustrie (Murray 2011) oder eine Kartoffel (Amflora) mit nur einer Stärkesorte für die Papierherstellung, für die unterschiedlichen industriellen Anforderun-

⁸ Grüne Biotechnologie: Landwirtschaft, <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Hintergrund/basiswissen.html>, abgerufen am 20.05.2012

⁹ Grüne Biotechnologie: Landwirtschaft, <http://www.biotechnologie.de/BIO/Navigation/DE/Hintergrund/basiswissen.html>, abgerufen am 20.05.2012

gen angepasst werden. Durch die geringe Verbraucherakzeptanz in Deutschland gegenüber gentechnisch veränderten Pflanzen ist ein Anbau in Deutschland jedoch schwierig¹⁰. Die Tatsache, dass 2011 weltweit 160 Millionen Hektar in 29 Ländern mit gentechnisch veränderten Nutzpflanzen bepflanzt wurden¹¹ und in Deutschland allenfalls Versuchsfelder existieren¹², verdeutlicht den Rückstand den die grüne Biotechnologie in Deutschland hat.

Da die Kosten für die Produktion von rek. Proteinen in Pflanzen um den Faktor 10-50 geringer sein können als durch Fermentation mit *E.coli* einschließlich nachfolgender Aufreinigung (Kusnadi *et al.* 1997), besitzt die Agrobiotechnologie in der Produktion von Vakzinen, Antikörpern und Biopharmazeutika in Pflanzen großes Potential (Klevenz 2002). Des Weiteren haben sich transgene Pflanzen als attraktive Systeme für die Produktion von humanen Proteinen durch die geringere Gefahr der Kontamination mit Säugetier-Viren, die Möglichkeit eines einfachen und kostengünstigen Scale-Ups und die geringen Anforderungen in der Unterhaltung (Klevenz 2002) herausgestellt. Als ein weiterer Vorteil wird auch die Möglichkeit der Kompartimentierung respektive der Speicherung der Produkte in Chloroplasten, Vakuolen, Mitochondrien und Samen (Murray 2011) herangeführt, welche eine einfachere Produktabtrennung und -aufarbeitung ermöglicht.

Eine Überschneidung der Grünen und Weißen Biotechnologie ergibt sich bei der Produktion von Biotreibstoffen aus Pflanzen, wie Raps, Mais und Zuckerrohr.

1.3.3 Weiße Biotechnologie

Laut Definition der Industrievereinigung EuropaBio verwendet die Weiße oder auch industrielle Biotechnologie Enzyme und Mikroorganismen für die Herstellung von Produkten, wie Chemikalien, Nahrungs- und Futtermitteln, Detergenzien, Papier und Zellstoffen, Textilien und Bioenergie, wie Biokraftstoff und Biogas¹³. Das heute in dieser Form nicht mehr existierende deutsche Unternehmen Röhm&Haas aus Darmstadt produzierte bereits 1909 das erste industriell verwendete Enzymprodukt OROPON[®], welches aus Peptidasen bestand und zur entscheidenden Verbesserung der Ledergerbung beitrug¹⁴. Die Haupteinsatzgebiete von Enzymen sind Waschmittel (32%), technische Prozesse (20%) und die Herstellung von Lebens- und Futtermitteln (33%). Der Anteil der beteiligten Enzyme bei der Erzeugung von Feinchemikalien und Pharmazeutika ist mit 4-5% vergleichsweise gering (Antranikian 2006). Jedoch werden viele Antibiotika, Vitamine, Hormone, Aminosäuren und weitere Biomoleküle,

¹⁰ Der Anbau der in mehreren Bundesländern kultivierten Bt-Maissorte MON810 wurde 2009 verboten und der Anbau von Amflora 2012 eingestellt

¹¹ Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011, <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/43/executivesummary/default.asp>, abgerufen 20.05.2012

¹² http://www.transgen.de/anbau/eu_international/643.doku.html, abgerufen 20.05.2012

¹³ What is industrial biotechnology?, <http://www.europabio.org/what-industrial-biotechnology/>, abgerufen am 21.05.2012

¹⁴ Broschüre: Weiße Biotechnologie- Chancen für neue Produkte und umweltschonende Prozesse, www.bmbf.de/pub/weisse_biotechnologie.pdf, abgerufen am 20.05.2012

deren chemische Synthese aufgrund ihrer chiralen Information nur schwer zugänglich ist, bereits im Kilotonnenmaßstab hergestellt (Heiden and Zinke 2006). Die am häufigsten in der Biokatalyse verwendeten Enzyme sind Hydrolasen, wie Peptidasen, Esterasen und Lipasen, die in Form von Waschmittelenzymen (Heiden and Zinke 2006) und zur Herstellung von optisch aktiven Carbonsäuren, Aminosäuren, Alkoholen und Aminen eingesetzt werden (Faber 2011). In der Klasse der Oxidoreduktasen werden zumeist Dehydrogenasen in isolierter Form oder als ganze Zellen (Bakterien und Pilze) für die stereo- und enantioselective Reduktion von Ketonen zu den entsprechenden sekundären Alkoholen im Industriemaßstab genutzt (Faber 2011).

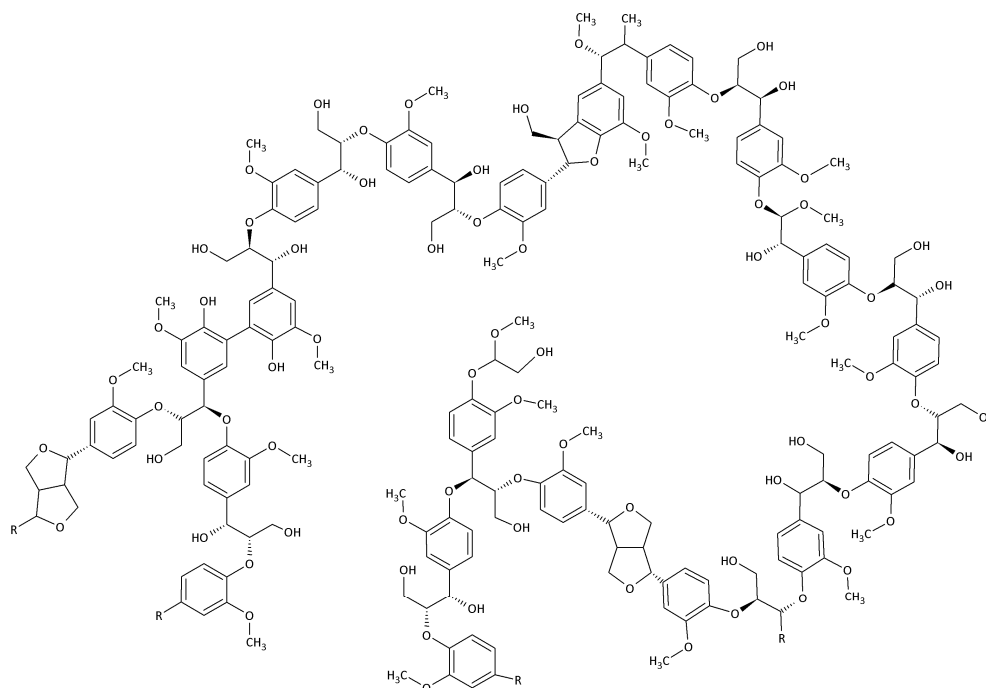


Abb. 8: Modell einer Ligninstruktur aus Weichholz (Arendt 2009)

Mit einem Produktvolumen von 55 Mrd. € stellt die industrielle Biotechnologie ca. 3% des Weltmarktes für Chemikalien biotechnologisch her. Den größten Anteil daran hat die Herstellung von Bioethanol¹⁵. Biokraftstoff aus Zuckerrüben, Rohrzucker und Mais gewonnen, steht durch den Verbrauch von Wasser und Land in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion. Zusätzlich führen die hohen Preise zu einer Suche nach alternativer nicht als Lebensmittel geeigneter Biomasse, wie Lignocellulose, als Ausgangsmaterial. Diese sogenannten Biokraftstoffe der „zweiten Generation“ können aus Abfallstoffen der Landwirtschaft, Holzindustrie und aus speziellen Gräsern wie z.B. *Miscanthus* (Chinaschilf), welches auf nährstoffarmen und trockenen Böden wachsen kann, gewonnen werden (Sims *et al.* 2008). Ein kritischer Schritt in der Produktion von Bioethanol ist die Aufspaltung des Lignins (Abb. 8), um eine optimale Verfügbarkeit der Cellulose zu gewährleisten. Laccasen können hierbei eine

¹⁵ http://www.schaumann-stiftung.de/deutsch/download/2_4_antranikian_pp.pdf, Abruf der Seite am 20.05.2012

signifikante Verbesserung in der Wertschöpfung erreichen, indem sie das Lignin depolymerisieren¹⁶. Weiterhin können auch die für eine weitere enzymatische Hydrolyse und Fermentation durch Hefen kritischen toxischen Produkte, wie Phenole, welche in alternativen Lignocellulose-Aufbereitungsverfahren, wie der Dampfexplosion (*steam explosion*), entstehen, durch Polymerisierung entfernt werden (Moreno *et al.* 2012).

Trotz ihrer Robustheit und Unabhängigkeit von Cofaktoren haben Laccasen und Peroxidasen bisher nur wenig Anwendung in der industriellen Produktion gefunden. Bisher sind zwei etablierte kommerzielle Verfahren in der Wein- und Textilindustrie bekannt (Schmid and Urlacher 2007). Die phenolischen Bestandteile von Weinkorken, im Besonderen 2,4,6-Trichloroanisol, welches einen intensiven schimmelig-muffigen Geruch hervorrufen kann (Sponholz and Muno 1994), werden für die Entstehung von unerwünschten Fehlparfums während der Lagerung des Weines verantwortlich gemacht. Durch das Waschen des Korkes mit einer hierfür entwickelten kommerziellen Laccasepräparation (Suberase[®], Novozymes) können die Phenole polymerisiert bzw. im Kork eingeschlossen oder ausgewaschen werden (Schmid and Urlacher 2007).

Eine zweite kommerzielle Anwendung von pilzlichen Laccasen besteht in der Bleichung von Jeansstoff. Dafür werden die Mediator-Laccase-Präparationen Denilite[®] und Denilite[®] II (Redoxmediator Methylsyringat und Laccase aus *M. thermophila*, Novozyme) eingesetzt, um den unlöslichen Farbstoff Indigoblau, der an der Baumwollfaser gebunden ist, zu dem farblosen Isatin zu oxidieren. Durch diesen Ansatz wurde es möglich, die traditionelle Bleichung durch Chlorverbindungen durch einen umweltfreundlicheren Prozess zu ersetzen (Schmid and Urlacher 2007).

Kurz vor der Markteinführung stehen Verfahren für die Aufbereitung von Abwässern von Papierfabriken durch Laccasen (Novozyme 51003), welche durch Polymerisation der Lignin-Bestandteile zu einer Verringerung der Färbung und des biochemischen und chemischen Sauerstoffbedarfs des Abwassers führen (Schmid and Urlacher 2007).

Darüber hinaus gibt es unzählige weitere Anwendungsgebiete von Laccasen in der industriellen Biotechnologie. So wurden weitere potentielle Anwendungsfelder in der Abwasserbehandlung von Färbereien (Cristóvão *et al.* 2009), Alkohol-Destillereien (Raghukumar *et al.* 2004) und Olivenmühlen (D'Annibale *et al.* 2000) durch Entfernung der toxischen Phenole, sowie die Bodensanierung durch Abbau von giftigen Xenobiotika, wie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) (Koschorreck *et al.* 2008b), Insektiziden (Amitai *et al.* 1998) und polychlorierten Biphenylen (PCBs) (Fujihira *et al.* 2009), untersucht. In der Zellstoff- und Papierindustrie können Laccasen zur Abtrennung und Abbau des Lignins (Bourbonnais *et al.* 1997) verwendet werden, was zu einer Verringerung des Einsatzes von umweltbelastender Chlorbleiche führen könnte (Kunamneni *et al.* 2008b). Auch der

¹⁶ The usage of laccase enzyme for degradation of ligno-cellulosic feedstock for bio-ethanol production, <http://www.bioenergiadlregionu.eu/pl/doktoranci/artykuly-doktorantow/art38,the-usage-of-laccase-enzyme-for-degradation-of-ligno-cellulosic-feedstock-for-bio-ethanol-production.html>, Abgerufen am 20.05.2012

Einsatz als Biosensoren für verschiedenste Phenole, als Katalysatoren in der organischen Synthese und in Formulierungen für Kosmetika scheint realisierbar (Kunamneni *et al.* 2008b; Piscitelli *et al.* 2010).

Eine potentielle industrielle Anwendung wird aber noch durch die zu hohen Kosten der Laccasepräparate und der eingesetzten Mediatoren, deren mögliche Umweltgefährdung sowie die Inaktivierung der Laccasen in der Anwendungsumgebung erschwert (Schmid and Urlacher 2007).

Für lignolytische Peroxidasen kann zum Beispiel der Einsatz in der Waschmittelindustrie ein mögliches Anwendungsgebiet sein. Eine erste kommerzielle Peroxidasepräparation aus dem Basidiomyceten *Coprinus cinerea* (Guardzyme[®]) konnte das Verfärben beim Waschen (*dye-transfer inhibition*) von Textilien mit unterschiedlichen Farben verhindern (Xu 2005).

Der Vorteil von lignolytischen Peroxidasen gegenüber Laccasen ist das deutlich höhere Redoxpotential, wodurch der Einsatz von Mediatoren obsolet wird und diese Enzyme ideale Kandidaten für die Entfernung oder den Abbau von Lignin und die Transformation von Stoffen mit hohem Redoxpotential wie PAHs und PCBs sein sollten (Polaina and MacCabe 2007). In Untersuchungen zum Einsatz von Peroxidasen in der industriellen Biotechnologie dominieren jedoch Peroxidasen, welche aus Pflanzen wie Meerrettich (HRP), Sojabohnen (SBP) und aus dem marinen Pilz *Caldaromyces fumago* (CPO, Chloroperoxidase) gewonnen werden.

Peroxidasen finden weiterhin einen möglichen Einsatz in der Synthese von chiralen Hydroperoxiden durch enantioselektive Reduktion von racemischen organischen Peroxiden durch Meerrettich-Peroxidase (Hoch *et al.* 1997). Des Weiteren können Peroxidasen (HRP und CPO) in der organischen Katalyse Reaktionen, wie Elektronentransfers, Disproportionierungen, Halogenierungen, Sulfoxidationen, Epoxidierungen, Demethylierungen, Dehydrogenierungen, Hydroxylierungen und α -Oxidationen, katalysieren (Adam *et al.* 1999).

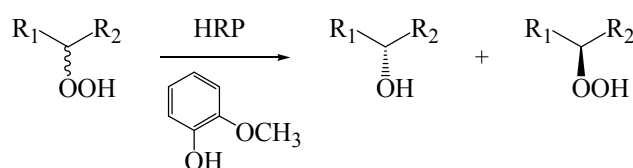


Abb. 9: Kinetische Auflösung von racemischen Peroxiden durch HRP (Hoch *et al.* 1997)

Für die Entfernung von phenolischen Verunreinigungen analog zur Anwendung von Laccasen wurden viele Untersuchungen, zumeist mit HRP und SBP, durchgeführt. Mögliche Anwendungen befinden sich jedoch noch immer im experimentellen Stadium (Hamid and Khalil-ur-Rehman 2009). In der Abwasserreinigung von Färbereien können ebenfalls Peroxidasen wie die HRP eingesetzt werden (De Souza *et al.* 2007). Der gewichtige Nachteil von Peroxidasen gegenüber Laccasen ist jedoch die rasche Inaktivierung durch ihr Co-Substrat H_2O_2 (Hiner *et al.* 2001). Verschiedene Lösungsansätze, wie Immobilisierung (Dalal and Gupta 2007), Zugabe von Polyethylenglykol (Cheng *et al.* 2006) oder Ni^{2+} -Ionen (Nazari *et al.* 2007), wurden beschrieben.

Weitere mögliche Anwendungsfelder sind die Synthese von Polymeren (Sakharov *et al.* 2003) und biokompatiblen Proteingelen (Miller *et al.* 2003) sowie der Einsatz als Biosensoren (Di *et al.* 2005). Gebunden an Antikörper hat die HRP weite Verbreitung in der Labor-Diagnostik, wie z.B. in ELISA-Tests, erfahren.

Trotz ihrer Robustheit und Unabhängigkeit von Cofaktoren haben Laccasen und Peroxidasen bisher nur wenig Anwendung in der industriellen Produktion finden können. Im folgenden Kapitel sollen mögliche Anwendung in der Lebensmittelchemie näher betrachtet werden.

1.3.4 Einsatz von Oxidoreduktasen in der Lebensmittelindustrie

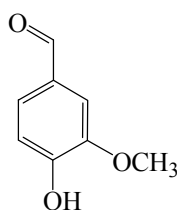
Die Stabilisierung von Wein ist eine der Hauptanwendungen von Laccasen in der Lebensmittelindustrie als Alternative zu physikalisch-chemischen Adsorbentien (Minussi *et al.* 2002). Most und Weine sind komplexe Gemische aus einer Vielzahl verschiedener chemischer Verbindungen, wie Ethanol, organischen Säuren, Salzen und Phenolen (Kunamneni *et al.* 2008b). Die Phenole, welche während der Lagerung und in der weiteren Verarbeitung zu Wein zur Beeinflussung der Farbe und des Geschmacks führen können (Minussi *et al.* 2007b), können durch Laccasen selektiv entfernt werden. Für eine effektive Abtrennung und Wiederverwendung der Laccase wird diese in immobilisierter Form eingesetzt (Minussi *et al.* 2002).

In analoger Weise können Laccasen auch zur Stabilisierung von Bier verwendet werden, um phenol- und proanthocyanidin-induzierte Trübungen durch Proteinpräzipitationen bei der Lagerung zu vermeiden (Mathiasen 1995). Des Weiteren wird ein kommerzielles Laccasepräparat (Flavourstar[®], Novozymes) zur Sauerstoffeliminierung in Bier beworben, um die Bildung eines Fehlaromas (off-flavor), wie z.B. trans-2-Nonenal, zu verhindern. Dabei wird die Laccase zur Maische hinzugegeben und durch Oxidierung der phenolischen Inhaltsstoffe bei gleichzeitiger Sauerstoffreduktion wird dem System Sauerstoff entzogen. Auf diese Weise kann eine weitere Reaktion des Sauerstoffs mit Fettsäuren (z.B. Linolsäure), Aminosäuren, Proteinen und Alkoholen, welche zur Bildung von Fehlaromen führen kann, verhindert werden (Olempska-Beer 2004). Eine ähnliche Stabilisierung in Getränken, wie Fruchtsäften, durch Laccasezusätze wurde ebenso untersucht (Minussi *et al.* 2002). Weitere Anwendungen von Laccasen in der Lebensmittelindustrie sind die Verlängerung der Haltbarkeit durch Sauerstoffeliminierung (Petersen *et al.* 1996), die Verbesserung der Farbe von auf Tee basierten Produkten (Bouwens *et al.* 1996) oder die Optimierung des Aromas und Geschmacks von Kakao (Takemori *et al.* 1992) sowie die Geruchsentfernung (Tsuchiya and Petersen 2005).

Für eine industrielle Anwendung von Peroxidasen in der Lebensmittelindustrie wurde die rek. MsP erfolgreich für die Bleichung (Abbau von β -Carotin) von Lebensmitteln patentiert und unter dem Namen MaxiBright™ lizenziert¹⁷.

Ein weiteres interessantes Anwendungsgebiet für Oxidoreduktasen ist die Synthese von natürlichen Aromastoffen. So konnte *N*-Methylantranilat, welches einen fruchtigen Geruch besitzt, aus Methyl-*N*-methylantranilat durch Peroxidase-katalysierte Demethylierung gebildet werden (van Haandel *et al.* 2000). Auch gelang die Gewinnung von geruchsaktiven Norisoprenoiden durch Degradierung von Carotinoiden durch eine Peroxidase aus *Lepista nuda* (Zorn *et al.* 2003) und einer DyP aus *Marasmius scorodoni* (Zelena *et al.* 2009a). Erst kürzlich konnte die Bildung des typischen Aromas der Grapefruit, (+)-Nootkatoon, aus dem Sequiterpen (+)-Valencen mittels einer Valencen-Oxygenase beschrieben werden (Zelena *et al.* 2011a).

Vanillin ist eine weitere sehr interessante Zielaromakomponente und ist gemessen am Marktwert und Marktvolumen der wichtigste Aroma- und Duftstoff weltweit. Natürliches Vanillearoma besteht aus einem Komplex verschiedener Komponenten, wobei das Aroma maßgeblich durch Vanillin bestimmt ist, und wird vorrangig aus den Schoten der tropischen Orchidee *Vanilla planifolia* extrahiert (Rao and Ravishankar 2000). Vanille und Vanillin besitzen in jeglicher Konzentration ein akzeptables Aroma, das von den meisten Menschen genossen wird, wodurch es zum populärsten Aroma geworden ist und breite Anwendung in Esswaren (z.B. Eiscreme, Schokolade, Gebäck), Getränken, Parfums, Kosmetika und Tabak findet (Berger 2007).



Vanillin

Abb. 10: Struktur von Vanillin

Die Weltproduktion für den Einsatz in Lebensmitteln beträgt mehr als 9000 t pro Jahr, von denen jedoch weniger als 1% aus der Vanille-Schote gewonnen werden (Converti *et al.* 2010). Naturidentisches Vanillin wird großtechnisch aus Coniferin, Eugenol, Safrol, Guaiacol und Lignin synthetisiert (Bedoukian 1986; Clark 1990; Hearon and Lo 1980; Wu *et al.* 1994). Der hohe Preisunterschied zwischen naturidentischem (< 15 \$/kg) und natürlichem Vanillin (< 4,000 \$/kg) führt zu der Suche nach neuen biotechnologischen Verfahren zur Bereitstellung von natürlichem Vanillin (Converti *et al.* 2010). Mögliche Verfahren sind die Biotransformation ausgehend von Kaffesäure und Veratryl-

¹⁷ DSM MaxiBright™, http://www.dsm.com/le/en_US/foodspecialties/html/Products_Maxibright.htm, abgerufen a, 24.05.12

Aldehyd (Suresh *et al.* 2003) oder die Fermentation von natürlichen Vorstufen, wie Ferulasäure, Eugenol, Isoeugenol, Coniferylalkohol, Vanillin-Alkohol und Stilben, durch Mikroorganismen (z.B. *Pseudomonas fluorescens*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Aspergillus niger*, *E.coli*, *Amycolatopsis sp.*, *Streptomyces setonii*) (Converti *et al.* 2010; Krings and Berger 1998; Muheim and Lerch 1999; Priefert *et al.* 2001; Rao and Ravishankar 2000; Schrader *et al.* 2004) zu Vanillin. Bisher bestehen zwei kommerzielle Verfahren: die Biotransformation von Ferulasäure (z.B. aus Reiskleie) durch das grampositive Bakterium *Amycolatopsis sp.* (Rabenhorst and Hopp 2000) und die Hydrolyse von Curcumin unter hohem Druck und Temperatur (Dolfini *et al.* 1990). In der Biosynthese durch *Amycolatopsis sp.* wird dem Medium kontinuierlich zugesetzte Ferulasäure zu Vanillin transformiert und ins Medium mit einer Konzentration von ca. 12 g L^{-1} abgegeben (Rabenhorst and Hopp 2000). Die beteiligten Enzyme konnten erfolgreich identifiziert und kloniert werden. Obwohl bereits sehr große Fortschritte in der biotechnologischen Produktion von Vanillin erreicht werden konnten, ist der Preis für biotechnologisch erzeugtes natürliches Vanillin mit ca. 600 € pro kg hoch (persönliche Mitteilung, Dr. G. Krammer, Symrise). Eine Verringerung der Produktionskosten könnte durch Verwendung von günstigeren ferulasäurehaltigen landwirtschaftlichen Nebenprodukten (Zheng *et al.* 2007) oder die Verwendung eines kostengünstigeren Ausgangssubstrates, wie Eugenol, erreicht werden. Für die Biokonversion von Eugenol zu Vanillin wurde ein *Pseudomonas*-Stamm genetisch so modifiziert, dass die normalerweise erfolgende weitere Konversion von Vanillin zu Vanillinsäure, durch Verhinderung der Expression einer Vanillindehydrogenase, unterbunden wurde. Da aber für diese Biotransformation ein genetisch modifizierter Stamm eingesetzt werden muss, ist der Einsatz in Europa aufgrund der geringen Verbraucherakzeptanz gegenüber „Gentechnik“ unwahrscheinlich.

In einer weiteren Anwendung zur biotechnologischen Herstellung von Vanillin wird natürliches Curcumin in Form einer 1%igen Kurkuma-Oleoresin-Lösung unter hohem Druck und Temperatur ohne Katalysator in einem kontinuierlichen Reaktor hydrolysiert. Nach 30 min Reaktionszeit können 20% Vanillin, 12% Guaiacol, 9% Feruloylmethan und 5% Vinylguaiacol erhalten werden (Dolfini *et al.* 1990).

Curcumin ist ein Inhaltsstoff des Kurkuma-Gewürzes, welches den Hauptbestandteil von Currypulver darstellt. Kurkuma wird in großen Mengen aus der Wurzel der Pflanze *Curcuma longa* industriell gewonnen und findet weltweit Anwendung in der Küche und als Lebensmittelfarbstoff (E100) (Epstein *et al.* 2010). Als chemoprotektiver Wirkstoff besitzt Curcumin antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften und kann in der Bekämpfung von Krebs eingesetzt werden (Agrawal and Mishra 2010; Epstein *et al.* 2010). Masuda *et al.* (1999) beschrieben, dass Curcumin ebenfalls durch einen Radikalmechanismus zu Vanillin, Ferulasäure und Feruloylmethan zerfallen kann (Abb. 11). Laccasen und Peroxidasen könnten als Radikalbildner ebenfalls diese Fragmentierung hervorrufen. Dies könnte zu einem neuen schonenden Prozess zur Synthese von natürlichem Vanillin durch Peroxidasen oder Laccasen führen und soll im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

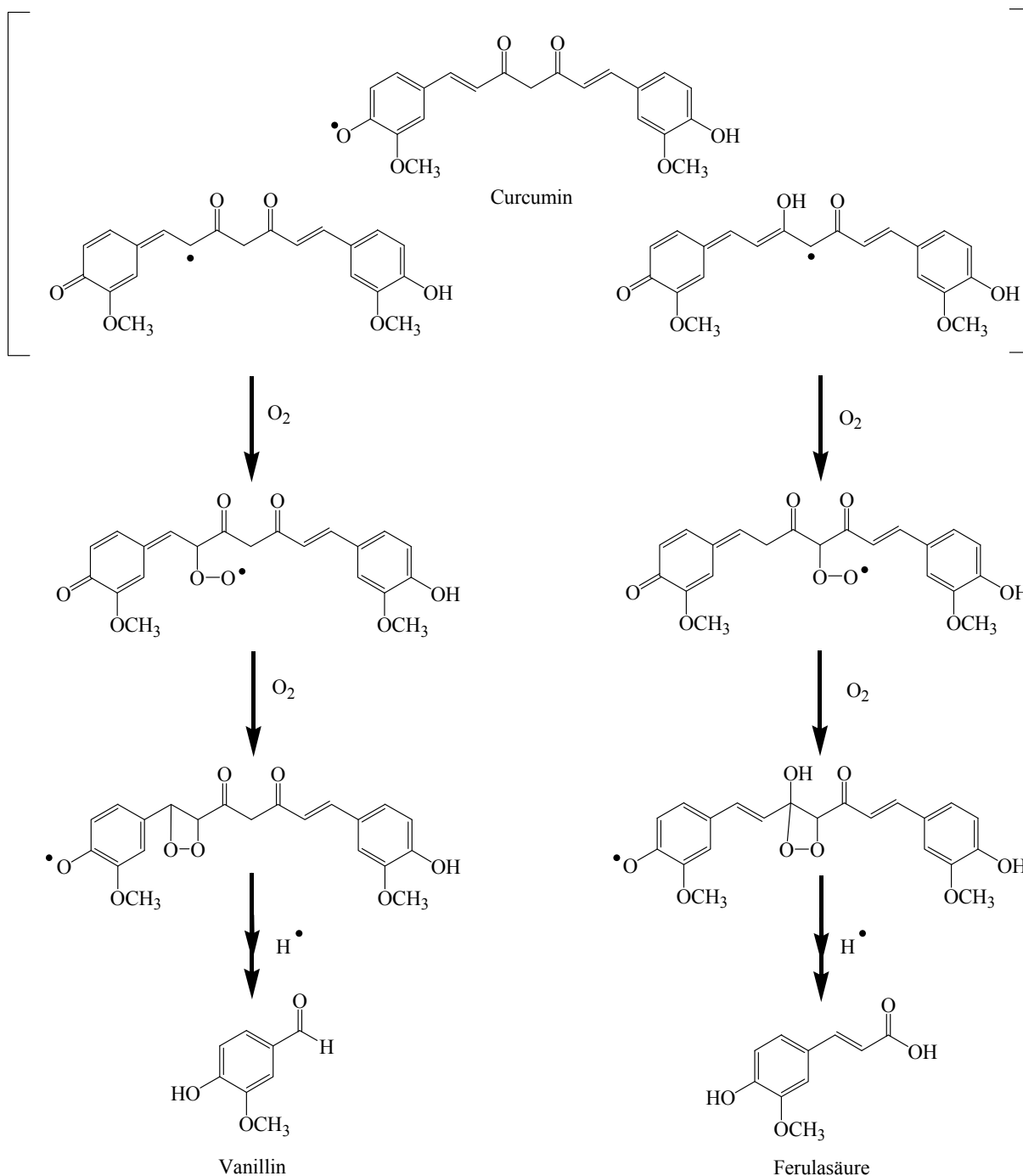


Abb. 11: Möglicher Mechanismus der Curcumindegradation durch Radikalkettenreaktion (Masuda *et al.* 1999)

Ein weiteres spannendes Anwendungsgebiet für lignolytische Enzyme ist die Backwarenindustrie. Brot und Backwaren gehören zu den bedeutendsten Nahrungsmitteln in Europa; sie stehen für etwa die Hälfte unserer Kohlenhydrat- und etwa ein Drittel der Proteinzufuhr (Uhlig 1998). Weltweit werden jährlich über 6×10^8 t Weizen geerntet (Aehle 2004), dessen chemische Zusammensetzung und damit Backfähigkeit von zahlreichen Standort-, Wetter-, Lager- und Sorteneinflüssen abhängt (Belitz *et al.* 2008). In den letzten Jahre wurden immer mehr mechanisierte Verarbeitungsschritte in der Backwa-

renindustrie eingeführt, was zu einer steigenden Nachfrage nach Weizenmehlen, deren Teig eine hohe Toleranz gegenüber der mechanischen Handhabung besitzen, geführt hat (Caballero *et al.* 2007). Um diese schwankenden Eigenschaften der Mehle auszugleichen, werden Zusatzstoffe, wie Ascorbinsäure, Emulgatoren (Weizenmehl) und bei Quellmehlen, Säuerungs- und Lockerungsmittel (Roggenmehl), eingesetzt. Im besonderen Fokus stehen dabei Zusätze, welche die Struktur des Weizenklebers so beeinflussen, dass die Teige sowohl einen erhöhten Dehnwiderstand als auch Dehnbarkeit aufweisen.

Weizenmehl ist ein Gemisch aus Kohlenhydraten (70-80%), Proteinen (8-19%) und Lipiden (1,5-2,5%) (Belitz *et al.* 2008). Hauptbestandteil der Proteinfraction sind Gliadine und Glutenine, welche nach dem Anteigen ein kohäsives viskoelastisches Netzwerk bilden, welches maßgeblich Einfluss auf die Qualität des Brotes hinsichtlich Krumenstruktur und Volumen des Brotleibes hat (Selinheimo *et al.* 2007). Eine weitere wichtige Inhaltsgruppe, hinsichtlich des Einflusses auf die rheologischen Eigenschaften des Teiges, sind mit Ferulasäure verknüpfte Arabinoxylane (Abb. 12), welche ein hohes Bindevermögen gegenüber Wasser haben und damit einen Beitrag zur Viskosität leisten (Aehle 2007). Mit entscheidend für die sich daraus ergebenden rheologischen Eigenschaften ist der Vernetzungsgrad dieser Makromoleküle im Mehl, welcher durch exogene Enzyme beeinflusst werden kann.

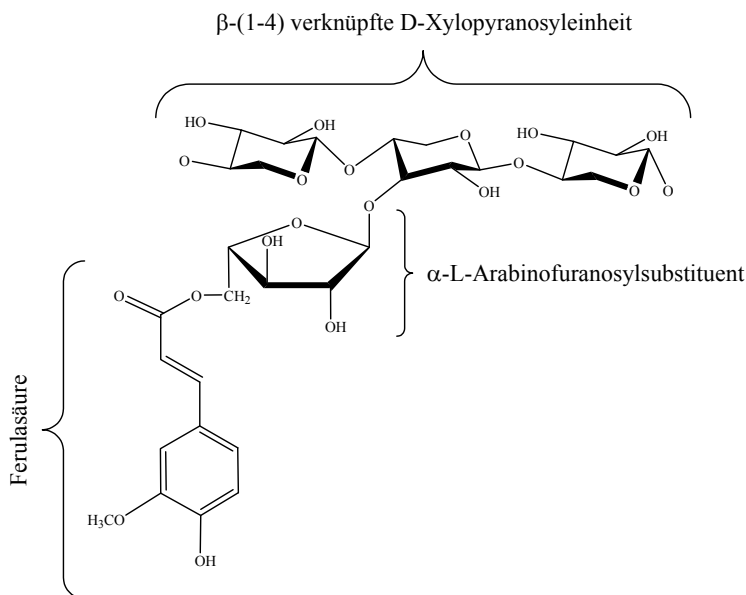


Abb. 12: Typische chemische Struktur eines Arabinoxylanferulats, modifiziert nach Niño-Medina *et al.* (2010)

In der Geschichte des Brotbackens haben Enzyme schon immer eine Rolle gespielt, um die backtechnischen Eigenschaften auszugleichen oder zu verbessern. Der erste Einsatz von Enzymen war die Verwendung exogener α -Amylase, um unterschiedliche Amylase-Gehalte von Mehl auszugleichen. Die Verwendung von chemischen Verbindungen, wie z.B. Natriummetabisulfat, Cystein, Azodicarboamid (ADA) und Kaliumbromat, kann ebenfalls zu einer Verbesserung der Teigeigenschaften führen, wird aber durch den Trend zu immer „grünere“ Produkten durch Enzyme verdrängt (Aehle 2007).

Ähnlich wie die Transglutaminase, welche die Proteine durch Bildung von kovalenten Bindungen zwischen Lysin- und Glutamin-Resten vernetzen kann (Larré *et al.* 2000), sind lignolytische Enzyme, wie Laccasen, Peroxidasen und Tyrosinasen, in der Lage, die Makromoleküle im Teig zu verknüpfen. Über die Bildung von Thiyl- und Feruloyl-Radikalen können komplexe Cross-links von Proteinen (Joye *et al.* 2009), Arabinoxylanen (Figueroa-Espinoza and Rouau 1998) und zwischen Proteinen und Arabinoxylanen (Selinheimo *et al.* 2007; Selinheimo *et al.* 2008) entstehen, welche die rheologischen Eigenschaften der Teige verbessern können. Der Nachteil einer nicht zulässigen exogenen Zudosierung von Wasserstoffperoxid beim Einsatz von Peroxidasen zur Teigverbesserung, kann durch gleichzeitige Verwendung von Glucoseoxidase umgangen werden.

Die Quervernetzung von Proteinen und mit Phenolen veresterten Zuckern kann auch für die Herstellung neuer Hydrokolloide, hinsichtlich der Anwendung in der Lebensmittelindustrie als Verdickungsmittel, Gelbildner oder Stabilisator für Schäume, Emulsionen und Dispersionen, genutzt werden. Bisher wird meist Transglutaminase verwendet, um durch Quervernetzung von Proteinen in Lebensmitteln, wie etwa in Joghurtprodukten (Lauber *et al.* 2000), die Textur zu verändern. Jedoch könnte auch hier die Verwendung lignolytischer Enzyme aus Basidiomyceten eine Alternative darstellen.

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neue Oxidoreduktasen aus Basidiomyceten identifiziert werden. Hierzu sollten verschiedene Basidiomyceten zunächst in einem Screening auf Peroxidase und Laccaseaktivität untersucht werden.

Um eine mögliche Expression an Oxidoreduktasen zu forcieren, sollten unterschiedliche Induktoren zur Erhöhung der Oxidoreduktaseproduktion eingesetzt werden.

Basidiomyceten, die einen hohen Laccase- oder Peroxidasetiter zeigten, sollten genauer untersucht und die entsprechenden Enzyme isoliert und proteinchemisch und molekularbiologisch charakterisiert werden.

Um eine Eignung für die Anwendung in der Backwarenindustrie zu untersuchen, sollte ferner das Vermögen zur Quervernetzung von Ferulasäure durch eine Laccase und Peroxidase näher betrachtet werden.

Für eine mögliche Synthese von natürlichem Vanillin sollte die oxidative Spaltung von Curcumin durch eine Laccase und Peroxidase und die Bildung von möglichen volatilen Reaktionsprodukten näher untersucht werden.

Da für eine industrielle Anwendung große Mengen an Laccase benötigt werden, sollte darüber hinaus die Möglichkeit der heterologen Expression einer Laccase in *E.coli* geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Chemikalien

Außer den in Tab. 1 aufgelisteten Substanzen wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien in der benötigten Reinheit von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), VWR (Hannover), Roth (Karlsruhe), Lancaster (Frankfurt am Main), LAT (Hannover) und der Bachem AG (Bubendorf, Schweiz) erworben.

Tab. 1: Chemikalienliste

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Curcumin	$\geq 90\%$, nat., pulv., öll.	Roth (Karlsruhe)
Ferulasäure	puriss	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Zimtsäure	$> 99\%$	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Zimtsäuremethylester	$> 99\%$	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Vanillin	99%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Vanillinacetat	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
n-Undecan	purum, 97% GC	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
n-Undecansäuremethylester	99%	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

2.1.2 Basidiomycetenstämme

Tab. 2: In der vorliegenden Arbeit verwendete Basidiomycetenstämme

Art	Abkürzung	Stamm	Art	Abkürzung	Stamm
<i>Cyathus earlei</i>	<i>Cea</i>	CBS 440.80	<i>Phellinus pini</i>	<i>Ppi</i>	DSMZ 5238
<i>Polyporus betulinus</i>	<i>Pbu</i>	Eigenisolat	<i>Pleurotus eryngii</i>	<i>Per</i>	CBS 458.79
<i>Hirneola auricula-judae</i>	<i>Haj</i>	DSMZ 11326	<i>Trametes sp.</i>	<i>Tra</i>	DSMZ 11309
<i>Meripilus giganteus</i>	<i>Mgi</i>	CBS 561.86	<i>Pleurotus sapidus</i>	<i>Psa</i>	DSMZ 8266
<i>Cyathus julietae</i>	<i>Cju</i>	CBS 373.80	<i>Pholiota populnea</i>	<i>Ppo</i>	CBS 264.32
<i>Cyathus helena</i>	<i>Che</i>	CBS 372.80	<i>Pholiota squarrosa</i>	<i>Psq</i>	DSMZ 5127
<i>Phellinus pini</i>	<i>Ppi</i>	DSMZ 5238	<i>Armillaria mellea</i>	<i>Ame</i>	CBS 100.12
<i>Grifola frondosa</i>	<i>Gfr</i>	CBS 480.63	<i>Flammulina velutipes</i>	<i>Fve</i>	DSMZ 1658
<i>Lepista nuda</i>	<i>Lnu</i>	CBS 300.58	<i>Lentinellus cochleatus</i>	<i>Lco</i>	FSU L 13-2

2.1.3 Puffer und Lösungen

100 mM Phosphatpuffer pH 7

14,42 g Dinatriumphosphat x 2 H₂O

2,62 g Natriumphosphat x H₂O

in 1 L dH₂O lösen, pH-Wert mit NaOH einstellen

50 mM Natrium-Acetatpuffer pH 5

1,08 g Essigsäure

4,36 g Natriumacetat x 3 H₂O

in 1 L dH₂O lösen, pH-Wert mit NaOH einstellen

50 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,2

3,00 g Essigsäure

zu 800 mL H₂O auffüllen

mit konz. NaOH auf pH 5,2 einstellen

auf 1 L mit H₂O auffüllen

Als Elutionspuffer wurden einem Liter der Lösung 58,44 g NaCl zugesetzt.

50 mM Tartrat-Succinat-Puffer

2,3 g Dinatriumtartrat × 2 H₂O

2,7 g Dinatriumsuccinat × 6 H₂O

80 mL H₂O zugeben

mit konz. HCl auf gewünschten pH (3,5-6,5) einstellen

auf 100 mL mit H₂O auffüllen

100 mM Lactat/Succinatpuffer pH 4,5

22,412 mL Natrium-D/L-Lactat-Lösung (50% w/v)

27,015 g Dinatriumsuccinat x 6 H₂O

pH-Wert mit NaOH einstellen, auf 1 L mit dH₂O auffüllen

200 mM Tartratpuffer pH 4,5

46,016 g Dinatriumtartrat

pH-Wert mit NaOH einstellen, auf 1 L mit dH₂O auffüllen

100 mM Phosphat-Citratpuffer

pH-Wert mit NaOH einstellen, auf 1 L mit dH₂O auffüllen

SNL-Medium (Sprecher and Hanssen 1982)

D-(+)-Glucose x H₂O 30,0 g L⁻¹

L-Asparagin x H₂O 4,5 g L⁻¹

Hefeextrakt 3,0 g L⁻¹

KH₂PO₄ 1,5 g L⁻¹

MgSO₄ 0,5 g L⁻¹

Spurenelementlösung (s.u.) 1,0 mL L⁻¹;

Einstellung auf pH 6,0 mit 1 M NaOH

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

Spurenelementlösung:

FeCl₃ x 6 H₂O 0,08 g L⁻¹

ZnSO₄ x 7 H₂O 0,09 g L⁻¹

MnSO₄ x H₂O 0,03 g L⁻¹

CuSO₄ x 5 H₂O 0,005 g L⁻¹

Titriplex III (EDTA) 0,4 g L⁻¹

Minimalmedium

D (+)-Glucose x H₂O 2 g L⁻¹

Hefeextrakt 4,0 g L⁻¹

KH₂PO₄ 2,0 g L⁻¹

MgSO₄ 0,5 g L⁻¹

Spurenelementlösung (s.u.) 1,0 ml L⁻¹

pH-Wert mit NaOH auf 5,5 einstellen, auf 1 L mit dH₂O auffüllen, bei 121°C und 2 bar autoklavieren

Luria-Bertani-Flüssigmedium (LB) (Luria et al. 1960)

1% (w/v) NaCl

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) Trypton

in dH₂O lösen, autoklavieren

Luria-Bertani/Ampicillin-Flüssigmedium (LB/Amp)

Zugabe $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin zu autoklaviertem LB-Flüssigmedium

LB-Kulturplatten

1,5% (m/v) Agar in LB-Flüssigmedium autoklavieren und in Kunststoffkulturplatten aushärten lassen

LB/Amp-Kulturplatten

1,5% (m/v) Agar in LB-Flüssigmedium autoklavieren und $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin Endkonzentration zugeben, in Kunststoffkulturplatten aushärten lassen, Lagerung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$

Kulturplatten für Blau-Weiß-Screening

1,5% (m/v) Agar in LB- Flüssigmedium autoklavieren, $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Ampicillin und $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ X-Gal Endkonzentration zugeben, in Kunststoffkulturplatten aushärten lassen, Lagerung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$

*Minimalmedium MDAG-135 (Studier 2005)*Für 10 mL

9,37 mL H_2O_2

20 μL 1 M MgSO_4

2 μL 1000x Spurenelementlösung

87,5 μL 40% (w/v) Glucose

40 μL 25% (w/v) L-Aspartat

200 μL 50xM

280 μL Aminosäurestocklösung 18

Stocklösungen:

50xM

1,25 M Na_2HPO_4

1,25 M KH_2PO_4

2,5 M NH_4Cl

0,25 M Na_2SO_4

der pH sollte ca. 6,7 betragen

100 mL 1000x Spurenelementlösung

50 mL 0,1 M FeCl₃ in 0,12 M HCl

2 mL 0,1 M CuCl₂

2 mL 1 M CaCl₂

1 mL 0,2 M NiCl₂

1 mL 1 M MnCl₂

2 mL 0,1 M Na₂MoO₄

1 mL 1 M ZnSO₄

2 mL 0,1 M Na₂SeO₃

1 mL 0,2 M CoCl₂

2 mL 0,1 H₃BO₃

Alle Metallstocklösungen bis auf FeCl₃ wurden vorher einzeln autoklaviert.

Aminosäurestocklösung 18

Je 1 g der L-Aminosäuren, Glu, Asp, Lys, Arg, His, Ala, Pro, Trp, Thr, Ser, Gln, Asn, Val, Leu, Ile, Phe und Gly wurden in 90 mL durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst und sterilfiltriert. Zu 10 mL dieser Lösung werden 4 mL autoklavierte L-Met-Lösung (25mg mL⁻¹) hinzugegeben, um die Aminosäurestocklösung 18 zu erhalten.

Denaturierender Probenpuffer

2 mL Tris-HCl-Puffer (1,5 M pH 6,8)

4 mL 1 M DTT

10 mL Glycerol-Stammlösung (8% SDS, 20 mg Bromphenolblau)

auf 4 mL mit ddH₂O auffüllen

Nativer Probenpuffer

2 mL Tris-HCl-Puffer (1,5 M pH 6,8)

10 mL Glycerol-Stammlösung (8% SDS, 20 mg Bromphenolblau)

auf 8 mL mit ddH₂O auffüllen

Single Gel Puffer

18,42 g L⁻¹ Tris Base

21,02 g L⁻¹ L-Serin

15,02 g L⁻¹ Glycin

30,02 g L⁻¹ L-Asparagin

pH-Wert auf 7,4 einstellen, mit dH₂O auf 500 mL auffüllen, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern

CBB-Färbelösung

80 mg Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250

auf 1 L mit dH₂O auffüllen, 2-3 h bei Raumtemperatur rühren, Zugabe von 3 mL konz. HCl

10 × Laufpuffer

30,2 g Tris

144,2 g Glycin

10,0 g SDS

auf 1 L mit dH₂O auffüllen, Puffer 1:10 verdünnt für die SDS-PAGE verwendet

Tris-HCl (pH 8,8)

9,21 g Tris Base

10,51 g L-Serin

7,51 g Glycin

15,01 g L-Asparagin

auf 500 mL mit ddH₂O auffüllen

*Lösungen für die Silberfärbung*Lösung I

Methanol 50% (v/v)

Eisessig 10% (v/v)

Formaldehyd (37% (v/v)) 0,5 mL L⁻¹

Lösung II

Ethanol 30% (v/v)

Lösung III

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g L⁻¹

Die Lösung wurde frisch hergestellt.

Lösung IV

AgNO_3 2,0 g L⁻¹

Formaldehyd (37% (v/v)) 0,75 mL L⁻¹

Die Lösung wurde frisch hergestellt.

Lösung V

Na_2CO_3 60 g L⁻¹

Formaldehyd (37% (v/v)) 0,5 mL L⁻¹

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ 1,0 mg L⁻¹

Die Lösung wurde frisch hergestellt.

Lösung VI

Methanol 10% (v/v)

Eisessig 12% (v/v)

*Agarosegelelektrophorese*50x TAE-Puffer

242 g Tris

57,1 g Essigsäure

0,5 M EDTA,

auf pH 8,0 mit NaOH einstellen, mit dH₂O auf 1 L auffüllen

Agarosegel (0,8% (w/v))

0,8% (w/v) Agarose

in 1x TAE-Puffer

6x DNA-Auftragspuffer

30% (w/v) Glycerol

0,2% (w/v) Bromphenolblau

25 mM EDTA, pH 7,5

2.1.4 Allgemeine Geräte

Tab. 3 Allgemeine Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav 75S	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
	5075 ELV	Systemec (Wettenberg)
IEF-Flachbettssystem	Multiphor II Multidrive XL	Pharmacia LKB (Schweden)
Inkubator	Certomat HK	B. Braun (Melsungen)
	BE 500	Memmert (Schwabach)
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph (Kelheim)
	Variomag [®]	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
pH-Meter	UB-5	Denver Instruments (Denver, USA)
	GPHR 1400	NeoLab (Heidelberg)
Photometer	UV 1650 PC	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Pipetten	Transferpette [®]	Brand (Wertheim)
Schüttler	Multitron	Infors (Einsbach)
SDS-PAGE	Minigel-Twin System	Biometra (Göttingen)
Sterile Werkbank	Safeflow 1.2	Nunc (Wiesbaden)
Sterile Werkbank	Clean Air CA RE 4	Clean Air (Hilden)
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburg)
	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)

Gerät	Typ	Hersteller
	MHR 13	HLC Biotech (Bovenden)
Ultraschallbad	RK 100 H	Bandelin electronic (Berlin)
Ultraturrax	TP-18/10	IKA Labortechnik (Staufen)
Vortex	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waage	SI-234	Denver Instruments (Denver, USA)
Wasseraufbereiter	GenPure UC-TOC/UF	TKA (Niederelbert)
Wasserbad	SW22	Julabo (Seelbach)
Zentrifuge	Sorval RT7-Plus	Kendro (Langenselbold)
	Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
	Mikro R200 R	Hettich (Tuttlingen)
	Rotina R380 R	Hettich (Tuttlingen)

2.1.5 Lösungsmittel

Tab. 4: Verwendete Lösungsmittel

Lösungsmittel	Qualität	Hersteller
Acetonitril	HPLC	SDS Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich)
Acetonitril	HPLC-MS	Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich)
Diethylether	HPLC, redestilliert	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	96%, redestilliert	KWST (Hannover)
n-Hexan	HPLC-MS, redestilliert	SDS Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich)
Methanol	HPLC	SDS Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich)
MTBE	HPLC, redestilliert	Sigma-Aldrich (Taufkirchen),
Wasser	HPLC-MS	J.T.Baker (Deventer, Niederlande)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung

2.2.1.1 Sterilisation der Kulturmedien

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

2.2.1.2 Kulturmedien für Basidiomyceten

Die Medienbestandteile wurden in dH₂O gelöst, die Nährlösung auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und in 300 mL (125 mL Füllmenge), 500 mL Erlenmeyerkolben (250 mL Füllmenge), 2 L (1 L Füllmenge) überführt. Die Kolben wurden mit Cellulosestopfen verschlossen, mit Alufolie abgedeckt und anschließend autoklaviert.

2.2.1.3 Stammkulturen auf SNL-Agarplatten

Von jedem verwendeten Organismus wurden Stammkulturen in Petrischalen auf SNL-Agar 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 bei 4 °C gelagert.

2.2.1.4 Submerskultur

Von den Stammkulturen wurde ein 1 cm² großes gut bewachsenes Stück ausgestochen und in 125 mL SNL überführt und mit einem Ultraturrax homogenisiert. Nach einer Inkubation bei 24 °C und 150 rpm im Inkubator für 6 Tage wurde ein neues Medium mit 10% des Gesamtvolumens inokuliert und bei 24 °C weiter inkubiert. Von diesen Kulturen wurden 2 mL Kulturüberstand für die entsprechenden Enzymassays abgenommen.

2.2.1.5 Submerskultur mit Induktoren

Ferulasäure und Xylidin wurden als Stocklösungen in Ethanol vorbereitet. Direkt vor der Inokulation wurde 1 mL dieser Stocklösung zum Medium hinzugegeben. Die Konzentration der Stocklösung wurde entsprechend der zu erreichenden Endkonzentration gewählt. Bei der Induktion mit Ethanol wurde dieses direkt zum Medium vor der Inokulation bis zur gewünschten Konzentration hinzugegeben. Lösungen von Tween 80 und CuSO₄ wurden sterilfiltriert und zu einer Konzentration von 0,4% (w/v) und 300 µM hinzugegeben. 250 mg Lignin-Organosolv wurden in 3 mL Ethanol suspendiert und der Kultur direkt hinzugegeben.

2.2.1.6 Submerskulturen mit Holzspänen

Kulturen wurden in einem sterilen 500 mL Kolben inokuliert, in die je 6,75 g getrocknete Eichenholzspäne und 100 mL Medium gefüllt wurden. Für jeden Pilz wurden je ein Kolben mit SNL-Medium und ein Kolben mit Minimalmedium kultiviert.

2.2.1.7 Kultivierung im Bioreaktor

Für die Kultivierung im Bioreaktor wurde ein Rührkessel-Bioreaktor (Meredos) mit Schrägblattrührer (100 rpm) mit einem Arbeitsvolumen von 2,5 L verwendet. Das SNL Medium (2,5 L) wurde mit dem Reaktor autoklaviert und nach Abkühlen wurden Ethanol und CuSO_4 zu einer Konzentration von 4% (v/v) und 300 μM zugegeben. Die Kultivierung wurde durch Inokulation mit 250 mL Vorkultur gestartet und erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 24 °C mit einer Belüftungsrate von 1 L min^{-1} über einen Ringsparger. In regelmäßigen Abständen wurde eine Probe steril abgenommen und die Aktivität gemessen oder für eine mRNA-Isolierung zurückgestellt. Am Tag der höchsten Aktivität wurde die Kultur geerntet.

Für Kultivierungen im 5 L Maßstab wurde ein Infors ISF 100 Rührkesselreaktor mit Propellerrührer (120 rpm) ohne Leitrohr bei einer Temperatur von 24 °C und einer Belüftungsrate von 1 L min^{-1} verwendet. Für die Inokulation wurde 500 mL Vorkultur verwendet. Alle weiteren Schritte wurden wie bei der Kultivierung im 2,5 L Maßstab ausgeführt.

2.2.1.8 LB-Übernachtskulturen

Um Übernachtskulturen mit *E.coli* zu inokulieren, wurden je 3 mL LB/Amp-Medium mit Hilfe von sterilen Zahnstochern mit Einzelkolonien von Agarplatten angeimpft. Die Inkubation der Kulturen erfolgt bei 37 °C und 250 U m^{-1} über Nacht.

2.2.2 Proteinchemische Assays

2.2.2.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Proteinbestimmung nach Lowry wurde ein kommerzielles Kit der Firma Bio-Rad verwendet. Folgender Ansatz wurde direkt in Einmal-Halbmikroküvetten pipettiert:

- 100 μL DC Protein Assay Reagenz A
- 20 μL Probe
- anschließend mit einem Vortexer mixen
- 800 μL DC Protein Assay Reagenz B

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend die Extinktion bei 750 nm gegen H_2O gemessen. Es wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe von 0,2-1,2 mg mL^{-1} mit Schritten von 0,2 mg mL^{-1} BSA angefertigt und eine Kalibriergerade erstellt.

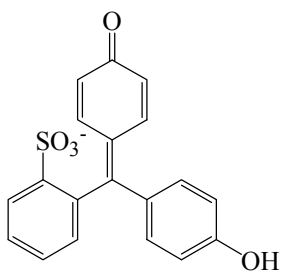
2.2.2.2 ABTS-Assay

Die Laccaseaktivität wurde über die Messung der Aktivität gegenüber ABTS (Majcherczyk *et al.* 1999) bestimmt. Diese wurde wie folgt durchgeführt:

- 150 μL Puffer
- 105 μL dH_2O
- 15 μL Probe

Nach Inkubation für 10 min bei 30 °C im Schüttler wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 μL 5 mM ABTS (in ddH_2O) gestartet und die Änderung der Extinktion bei 420 nm verfolgt. Für die Bestimmung der Aktivität der rek. Lcc1 sowie die Messung der Lcc1-Aktivität für die Umsetzung der Curcuminoide und Vanillin wurde 100 mM NaPhosphat-Puffer pH 3,0 verwendet. Bei Untersuchungen der DyP aus *Haj* wurden statt 105 μl dH_2O 30 μl H_2O_2 und 75 μl dH_2O eingesetzt. Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde ein 100 mM Phosphat-Citratpuffer pH 1,5-7,0 verwendet. Sämtliche Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die prozentuale Standardabweichung lag jeweils unter 10%.

2.2.2.3 Phenolrot-Assay



Phenolsulfonphthalein

Abb. 13: Struktur von Phenolsulfonphthalein

Der Assay (Stajić *et al.* 2006) basiert auf der Oxidation des Phenolrots und das dadurch veränderte Absorptionsspektrum in alkalischer Umgebung. Der Test wurde in modifizierter Form zur Identifizierung von Peroxidasen wie folgt durchgeführt.

Folgende Lösungen wurden pipettiert:

- 150 μL Lactat/Succinat-Puffer (200 mM, pH 4,5)
- 30 μL 1 mM MnSO_4
- 60 μL 2 mM H_2O_2
- 30 μL 6 mM Phenolrot
- 30 μL Probe

Der Ansatz wurde bei 30 °C im Thermomixer für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µL von diesem Ansatz zu 75 µL 1 N NaOH und 40 µL ddH₂O in eine neue Mikrotiterplatte pipettiert und die Absorption bei 610 nm gemessen. Sämtliche Messungen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.2.2.4 Azure B-Assay

Als Nachweis von Ligninperoxidase wurde der Azure B-Assay verwendet (Archibald 1992). Folgender Ansatz wurde in einen Well einer Mikrotiterplatte pipettiert:

- 150 µL Natriumtartrat-Puffer (100 mM pH 4,5)
- 60 µL 2 mM H₂O₂
- 30 µL Probe

Die Mikrotiterplatte wurde für 10 min bei 30 °C und 700 min⁻¹ im Schüttler inkubiert. Zum Starten der Reaktion wurden 60 µL 0,16 mM Azure B-Lösung hinzugegeben. Die Aufzeichnung der Extinktionsänderung erfolgte bei 351 nm und 30 °C.

2.2.2.5 Veratrylalkohol-Assay

Der Veratrylalkohol-Assay (Tariq and Irvine 1995) basiert auf der Oxidation von Veratrylalkohol (3,4-Dimethoxybenzylalkohol) zu Veratryl-Aldehyd und ist ebenfalls eine Nachweismethode für Ligninperoxidase. Dafür wurde folgender Ansatz verwendet:

- 150 µL Natriumtartrat-Puffer (100 mM pH 4,5)
- 75 µL H₂O
- 30 µL 4 mM H₂O₂
- 15 µL Probe

Der Ansatz wurde für 10 min bei 30 °C und 700 min⁻¹ im Schüttler inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 30 µL 20 mM Veratrylalkohol gestartet. Die Änderung der Extinktion wurde bei 310 nm und 30 °C verfolgt.

2.2.2.6 DMP-Assay

Der DMP-Assay erfolgte leicht abgewandelt nach Shuttleworth *et al.* (1986) zur weiteren Charakterisierung von Peroxidase und Laccasen. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

- 150 µL Citrat-Puffer (50 mM, pH 4)
- 105 µL H₂O
- 15 µL Probe

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µL 5 mM 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) nach 10 min Inkubation bei 30 °C und 700 min⁻¹ im Schüttler gestartet und die Änderung der Extinktion bei 469 nm und 30 °C verfolgt. Der Test auf Peroxidaseaktivität erfolgte mit einer Endkonzentration von 0,4 mM

H₂O₂. Manganperoxidasen wurden durch Zusatz von 0,1 mM MnSO₄ detektiert. Entsprechend wurde das Volumen an H₂O reduziert.

Für die Bestimmung der Inhibierung durch Ethanol wurde der Assay leicht abgewandelt. Es wurden 100 µL Citrat-Puffer (50 mM, pH 4) verwendet und das Restvolumen entsprechend der gewünschten Ethanol-Konzentration mit Ethanol und H₂O ergänzt.

2.3 Enzymkatalyse

2.3.1 Quervernetzung von Ferulasäure mit Lcc1 und HjP

Die Umsetzung von Ferulasäure durch Lcc1 wurde im 1 mL Maßstab in 1,4 mL Glasvials durchgeführt. Folgende Lösungen wurden pipettiert:

- 500 µL Ferulasäure 2 mM
- 400 µL NaAcetat-Puffer 50 mM pH 5
- 100 µL Enzymlösung-Lösung 0,1 bis 1 U mL⁻¹

Für die Umsetzung mit HjP wurden 350 µL Puffer und 50 µL H₂O₂ (4 mM) verwendet. Anschließend wurde der Ansatz bei 24 bzw. 30 °C inkubiert und die Reaktion mit 50 µL konz. HCl gestoppt. Die gebildeten Oxidationsprodukte wurden drei Mal mit Diethylether extrahiert, unter einem N₂-Strom zur Trockne eingengt und in Methanol/H₂O (50/50 (v/v)) aufgenommen. Die Bestimmung des pH-Optimums wurde im 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer durchgeführt, welcher mit NaOH eingestellt wurde. Die Quantifizierung des Umsatzes erfolgte bei einem durch eine regelmäßige Probenahme, der Extraktion der Proben und Detektion der vorhandenen Ferulasäure bei 325 nm durch HPLC-UV/Vis. Die Berechnung beruhte auf einer externen Kalibrierung mit Standardlösungen von Ferulasäure. Als interner Standard wurde vor der Extraktion Zimtsäure (10% (v/v) DMF) zu einer Endkonzentration von 0,5 mM hinzugegeben. Die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit wurde am jeweiligen pH-Optimum der Enzyme durchgeführt.

2.3.2 Umsetzung von Curcumin in 30% Ethanol

Es wurde ein 10 mL Reaktionsansatz mit 0,034 U mL⁻¹ Lcc1 (ABTS, pH 3, 30 °C) in einem 12 mL Glasvial angesetzt und in regelmäßigen Abständen 1 mL Probe genommen. Der Reaktionsansatz wurde mit 50 µL HCl angesäuert, drei Mal mit Diethylether extrahiert, unter N₂ zur Trockne eingengt und in H₂O/Acetonitril (60/40 (v/v)) aufgenommen. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgte mittels HPLC-DAD. Für die Aufnahme einer Kinetik wurde in einem 10 mL Glasvial, 1,5 mL einer Curcumin-Stocklösung, 1 mL NaAcetat-Puffer (50 mM, pH 5,5) und 2,5 mL Enzymlösung in NaAcetat-Puffer (50 mM, pH 5,5) pipettiert. Die Curcumin-Stocklösung wurde wie folgt hergestellt: 3 mL

einer 1,25 mM Curcumin-Lösung gelöst in Diethylether wurden in ein 10 mL Glasvial pipettiert, der Diethylether wurde unter einem N₂-Strom zur Trockne eingeengt und das Curcumin in 4,5 mL Ethanol aufgenommen. In regelmäßigen Intervallen wurden 500 µL Proben genommen, die Reaktion mit 25 µL HCl gestoppt, 50 µL einer 5 mM Zimtsäure-Standardlösung (10% (v/v) DMF) hinzugegeben und drei Mal mit Diethylether extrahiert. Der Extrakt wurde unter einem N₂-Strom zur Trockne eingedampft und in 500 µL Acetonitril aufgenommen. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym. Die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard Zimtsäure und eine externe Kalibrierung mit einer Standardlösung von Curcumin (HPLC-DAD). Die Zimtsäure wurde bei 280 nm und das Curcumin bei 425 nm quantifiziert. Die Aktivität der eingesetzten Enzymlösung wurde per ABTS-Assay bestimmt.

2.3.3 Umsetzung von Curcumin in Diethylether mit Lcc1

In einem 1,4 mL Glasvial wurde 500 µL einer 1 mM Curcuminlösung gelöst in Diethylether zu 500 µL einer in NaAcetat-Puffer (50 mM, pH 5,5) verdünnten Enzymlösung pipettiert und bei 40 °C inkubiert. Die Enzymaktivität im gesamten Ansatz betrug 0,34 U mL⁻¹. Die Reaktion wurde mit 50 µL HCl gestoppt, die organische Phase abgenommen und die wässrige Phase drei Mal mit Diethylether extrahiert und der Extrakt mit der zuvor abgenommenen organischen Phase vereinigt. Als interner Standard wurde vor der Extraktion 50 µL einer 5 mM Zimtsäuremethylester (10% (v/v) DMF) hinzu pipettiert. Anschließend wurden die vereinigten Phasen unter einem N₂-Strom zur Trockne eingedampft und in 500 µL Acetonitril wieder aufgenommen. Die Berechnung des Umsatzes erfolgte über den internen Standard Zimtsäuremethylester und eine Curcumin Standardreihe. Für die Aufnahme einer Umsatzkinetik wurden mehrere Ansätze präpariert und jeweils nach 0,5, 1, 2, 3 und 22 h, wie oben beschrieben, analysiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym. Die Aktivität der eingesetzten Enzymlösung wurde per ABTS-Assay bestimmt.

Für die Detektion von flüchtigen Reaktionsprodukten wurde der Ansatz auf 10 mL vergrößert und wie weiter oben beschrieben angesetzt. Statt 0,34 U mL⁻¹ wurden 1,9 U mL⁻¹ Lcc1 eingesetzt und über Nacht bei 24 °C inkubiert. Nach dreimaliger Extraktion mit Diethylether und Dichlormethan wurde 1 mL Undecansäuremethylester (80 ng µL⁻¹, Diethylether) als interner Standard zugesetzt, über Na₂SO₄ getrocknet und der Extrakt durch fraktionierte Destillation (Vigreuxkolonne) auf ca. 1 mL eingeengt. Nach Zugabe von 100 µL Undecan (800 ng µL⁻¹, Diethylether) als internen Standard wurde die Lösung nochmals über Na₂SO₄ getrocknet und per GC-FID und GC-MS analysiert. Für die Abschätzung des Curcuminumsatzes wurden von dieser Lösung 100 µL abgenommen, unter einem N₂-Strom zur Trockne eingedampft, in Acetonitril aufgenommen und 10 µL Zimtsäure (5 mM, 10% (v/v) DMF) zur Quantifizierung hinzugegeben. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym.

2.3.4 Umsetzung der O-Acetylcurcuminoide mit Lcc1

Die Synthese der O-Acetylcurcuminoide erfolgte aus den Curcuminoiden nach Jiang *et al.* (2006). Über eine Aufreinigung mittels Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Fluka, 20% Ethylacetat in Hexan) wurden die O-Acetylcurcuminoide abgetrennt und an einem Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Analyse der Umsetzungsprodukte erfolgte durch LC-MS nach Verdünnung in Acetonitril. Für die ersten Untersuchungen zum Umsatz der O-Acetylcurcuminoide wurden in einem 1,4 mL Glasvial 500 μL verdünnte Enzymlösung (15 U mL^{-1} , 50 mM NaAcetat-Puffer, pH 5,5) mit 450 μL Diethylether und 50 μL verdünnter O-Acetylcurcuminlösung (1:10 in Diethylether verdünnt) unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Nach Ansäuern mit HCl, dreimaliger Extraktion mit Diethylether, Eindampfen unter einem N_2 -Strom und Resolubilisierung in Acetonitril/ H_2O (50/50 (v/v)) wurden die Proben per LC-MS analysiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Enzym.

2.3.5 Umsetzung der O-Monoacetylcurcumine mit Lcc1

Es wurden definierte Lösungen der isolierten O-Monoacetylcurcumine (2.4) im Konzentrationsbereich von 36 bis 144 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in Acetonitril/ H_2O (50/50 (v/v)) hergestellt. Nach Zugabe von Curcumin (0,5 mM Endkonzentration) als interner Standard wurde die Lösungen über HPLC-UV/Vis analysiert und eine Kalibriergerade erstellt. Für die Umsetzung der Monoacetylcurcumine wurden in einem 20 mL Glasvial 5 mL einer O-Monoacetylcurcumin-Lösung (verdünnt in Diethylether, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mit 5 mL verdünnter Lcc1-Lösung (50 mM NaAcetat-Puffer, pH 5,5) mit einer Aktivität von 2,2 U mL^{-1} (ABTS, 30 °C, pH 3) vermischt und unter Schütteln bei 30 °C für 19 h inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit Puffer ohne Lcc1. Die Reaktion wurde mit konz. HCL gestoppt drei Mal mit Diethylether und Dichlormethan extrahiert, die Extrakte vereinigt und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wurde der kombinierte Extrakt durch fraktionierte Destillation (Vigreuxkolonne) eingeeengt und Diethylether bis zu einem Volumen von 1 mL hinzugegeben. Nach Zugabe von 100 μL Undecan (800 ng μL^{-1} in Diethylether) als interner Standard wurde die Lösung per GC-MS analysiert. Die Quantifizierung des gebildeten Acetylvanillins erfolgte über eine externe Kalibration mit Acetylvanillin-Standards. Für die Abschätzung des Umsatzes der O-Monoacetylcurcumine wurden von dieser Lösung 100 μL abgenommen, unter einem N_2 -Strom zur Trockne eingedampft, in 100 μL Acetonitril aufgenommen und 100 μL Curcumin (1 mM in Acetonitril) zur Quantifizierung hinzugegeben.

2.3.6 Umsetzung von Vanillin durch Lcc1 und H₂O₂

In einem 4 mL Glasvial wurden zu 1 mL Vanillin (2 mM in 50 mM NaAcetat-Puffer pH 5) 0,5 mL NaAcetat-Puffer (50 mM, pH 5), 400 μL H_2O_2 -Lösung (2 mM) oder entsprechend Wasser bei Einsatz von Lcc1 und 100 μL Enzymlösung (50 U mL^{-1}) pipettiert und unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Als

Kontrolle wurde ein Ansatz mit H₂O anstatt Enzymlösung angesetzt. Bei Reaktionsansätzen mit Peroxidase wurden in regelmäßigen Zeitabständen zusätzlich 400 µL H₂O₂ (2 mM) zugesetzt. Zum Stoppen der Reaktion wurde mit 100 µL HCl angesäuert und je drei Mal mit Diethylether und Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt, unter einem N₂-Strom zur Trockne eingengt und in Acetonitril/H₂O (50/50 (v/v)) aufgenommen. Für die präparative Gewinnung von Divanillin wurden 5 mL einer 10 mg mL⁻¹ Vanillinlösung in NaAcetat-Puffer (pH 5, 5% Acetonitril, 10% Ethanol) mit einer Endkonzentration an HjP von 1 U mL⁻¹ und einer H₂O₂ Konzentration von 1 mM bei 30 °C für 5 h transformiert. In regelmäßigen Abständen wurden 400 µL H₂O₂ (2 mM) zur Reaktion hinzugegeben. Der gebildete Rückstand wurde in Acetonitril verdünnt und über HPLC-UV/Vis analysiert.

2.4 Isolierung von O-Monoacetylbisdemethoxycurcumin (5*) und O-Monoacetylcurcumin (6)

2 µL der nach Kapitel 2.3.4 hergestellten O-Acetylcurcuminoide und eine 0,5 mM Curcuminlösung wurden auf eine Kieselgelplatte (Kieselgel 60 F₂₅₆, Merck) aufgetragen und in einer mit Dichlormethan:Methanol 9:1 gesättigten Kammer entwickelt. Die getrennten Spots wurden mit einem Spatel von der Platte geschabt und in ein 1,4 mL Vial überführt. Die O-Acetylcurcuminoide wurden mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, bei 15.000 x g zentrifugiert und mit LC-MS analysiert. Für die präparative Isolierung des O-Monoacetylbisdemethoxycurcumin (5*) und O-Monoacetylcurcumin (6) wurde die O-Acetylcurcuminoidlösung über die komplette Breite einer Kieselgelplatte aufgetragen und die entsprechende Bande nach der Trennung mit einem Spatel ausgeschabt. Dies wurde mehrmals wiederholt. Nach Extraktion mit Methanol und Abtrennung des Kieselgels wurde die Reinheit mit LC-ESI(-)-MS überprüft. Der Extrakt wurde in ein zuvor ausgewogenes 8 mL Glasvial überführt, lyophilisiert, ausgewogen und mit einer definierten Menge Acetonitril aufgenommen. Es wurden insgesamt 18 mg O-Monoacetyl(bisdemethoxy)curcumin isoliert.

2.5 HPLC

Die Analyse der Oxidationsprodukte von Vanillin, Ferulasäure und den Degradationsprodukten des Curcumins und O-Acetylcurcumins durch Lcc1 und HjP erfolgte mittels HPLC unter Verwendung einer RP-18 HD Säule (Eurosphere 100-C18-5-HD, Macherey & Nagel). Für die Untersuchung der Umsetzungsprodukte wurde ein System bestehend aus einer PU-980 Pumpe (Jasco), einem LG-980-02 Gradientenmischer (Jasco), einem 4-Kanal-Degaser (Rheodyne), einem Säulenofen (Techlab) und einem Dioden-Array-Detektor (DAD, 1200 Series, Agilent Technologies) verwendet. Die Datenaufzeichnung und -auswertung erfolgte mit der Agilent ChemStation Software für LC und LC-MS Systeme. Als Fließmittel wurde Wasser mit 0,05% (v/v) Ameisensäure und Acetonitril mit einem Gra-

dientensystem (Tab. 5) bei 35 °C und einer Flußrate von 1,5 mL min⁻¹ verwendet. Zur Detektion wurde die Absorption bei den Wellenlängen 280, 350 und 425 nm aufgezeichnet. Zusätzlich wurde die Absorption im Wellenlängenbereich von 200-800 nm detektiert. Zur Bestimmung des Gehaltes an internem Standard (Zimtsäure) wurde das 280 nm Signal verwendet. Der Abbau an Curcumin wurde bei 425 nm verfolgt und quantifiziert.

Tab. 5: HPLC-Gradientenprogramm für die Trennung von Curcumin und dessen Abbauprodukten

Zeit [min]	0,05% (v/v) Ameisensäure [%]	Acetonitril[%]
0	40	60
17	40	60
20	0	100
25	0	100
30	40	60

Die Bestimmung des Umsatzes der O-Monoacetylcurcumine (**5*** und **6**) durch die Lcc1 wurde an einem LC-MS-QP8000 System (Shimadzu, Japan) bestehend aus Degaser-, Pumpen-, Steuereinheit ohne angeschlossenen Massendetektor unter Verwendung einer RP-18 HD Säule (Eurosphere 100-C18-5-HD, Macherey & Nagel) durchgeführt. Die Detektion der O-Monoacetylcurcumine (**5*** und **6**) und des internen Standards Curcumin (Gemisch aus den drei Curcuminoiden) erfolgte bei einer Wellenlänge von 425 nm. Die Datenaufzeichnung und -aufnahme erfolgte mit dem vom Hersteller mitgelieferten Programm (LCMSsolution, Shimadzu). Als Fließmittel wurde Wasser mit 0,05% (v/v) Ameisensäure und Acetonitril in einem Gradientensystem (Tab. 6) und einer Flussrate von 1 mL min⁻¹ verwendet.

Tab. 6: HPLC-Gradientenprogramm für die Quantifizierung der O-Monoacetylcurcuminoide (**5***, **6**)

Zeit [min]	0,05% (v/v) Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
0	40	60
20	0	100
25	0	100
30	40	60

Die Analyse des Umsatzes von Ferulasäure zur Bestimmung des pH-Optimums von Lcc1 und HjP erfolgte mittels HPLC an einer Chromolith Performance RP-18-Endcapped-Säule (Merck, 100 mm x 4,6 mm). Verwendet wurde eine Hewlett-Packard Ti-Series 1050 Anlage bestehend aus Degaser-, Pumpen-, Autosampler- und Multi-Wavelength-Detektor-Einheit (MWD). Die Datenaufzeichnung und -auswertung erfolgte mit der Agilent ChemStation Software für LC und LC-MS Systeme. Als Fließmittel wurde Wasser mit 0,05% (v/v) Ameisensäure und Acetonitril in einer Gradientenmischung verwendet (Tab. 7).

Tab. 7: HPLC-Gradientenprogramm für die Bestimmung des pH-Optimums von Lcc1 und HjP gegenüber Ferulasäure

Zeit [min]	0,05% (v/v) Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
0	90	10
0,1	90	10
7,5	64	36
9,2	34	66
9,5	4	96
12	1	99
12,5	85	15
13,5	90	10

2.6 LC-ESI(-)-MS

Die Bestimmung der Molekülmassen und zur Identifizierung von Oxidationsprodukten von Vanillin und Curcumin/Acetylcurcumin mittels HPLC-MS/MS-Kopplung (Varian 212-LC Pump, ProStar 325 UV-Vis Detector, 320-MS TQ Mass Spectrometer) wurde ein Elutionssystem bestehend aus 0,05% Ameisensäure und Acetonitril (Lösungsmittel in MS-Qualität) verwendet. Die Trennung erfolgte auf einer RP-18 HD Säule (Eurosphere 100-C18-5-HD, Macherey & Nagel) bei einem Fluss von 0,5 mL min⁻¹. Die Trennprogramme wurden den jeweiligen Analyten angepasst (Tab. 8 und Tab. 9). Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 280 und 425 nm. Die Detektion der Molekülmassen wurde mittels Quadrupol Massenspektrometer im ESI(-)Modus mit folgenden Systemparametern durchgeführt:

ESI Nadel Spannung: -4500 Volt
 ESI Abschirmspannung: -600 Volt

Kapillarspannung:	-40 Volt wenn nicht anders angegeben
Trockengastemperatur:	350 °C
API Gehäusetemperatur:	50 °C
Zerstäuber Gasdruck:	55 psi
Trocknungsgasdruck:	25 psi
Gas:	N ₂
Massenbereich (m/z):	50-1200 (wurde je nach zu erwartenden Produkten variiert)

Tab. 8: HPLC-MS-Gradientenprogramm zur Bestimmung des Umsatzes von Vanillin mit Lcc1 und HjP

Zeit [min]	0,05% Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
0	80	20
15	80	20
30	70	30
40	60	40
60	0	100
70	0	100
75	80	20
77	80	20

Tab. 9: HPLC-MS-Gradientenprogramm für die Analyse des Curcumin-, Acetyl- und Monoacetylcurcuminumsatzes mit Lcc1

Zeit [min]	0,05% Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
0	60	40
10	60	40
30	0	100
35	0	100
40	60	40
45	60	40

MS-MS Versuche zur Identifizierung der gebildeten Produkte während der Vanillinoxidation durch HjP wurden bei einer Kapillarspannung von -40 Volt durchgeführt. Als Kollisionsgas wurde Argon (267 mPa) verwendet. Die Kollisionsenergie betrug, wenn nicht anders beschrieben, 15 V. Die Detektion von Ferulasäureoligomeren erfolgte mittels LC-ESI(-)-MS (LCMS-QP8000, Shimadzu, Japan) und einer Eurosphere 100-C18-5-HD Säule (Macherey&Nagel) mit einem Fluss von 0,6 mL min⁻¹.

ESI Nadel Spannung:	- 3500 Volt
Curved desolvation line (CDL) Spannung:	-140 Volt
CDL Temperatur:	230 °C
Trockengastemperatur:	300 °C
Trocknungsgasfluss:	5 mL min ⁻¹
Trocknungsgasdruck:	19 psi
API Gehäusetemperatur:	50 °C
Zerstäuber Gasdruck:	55 psi
Gas:	N ₂
Massenbereich (m/z):	150 - 1200 m/z (wurde je nach zu erwartenden Produkten variiert)

Tab. 10: Verwendeter Gradient für die Analyse der Quervernetzungsprodukte von Ferulasäure

Zeit [min]	0,05% Ameisensäure [%]	MeOH [%]
0	90	10
15	60	40
20	60	40
35	50	50
45	50	50
60	30	70
70	30	70
85	20	80
100	0	100
105	0	100
120	90	10
150	90	10

2.7 Identifizierung von Peptidfragmenten¹⁸

Peroxidasebanden wurden nach erfolgter denaturierender SDS-PAGE aus dem Gel ausgeschnitten, getrocknet und mit Trypsin verdaut. Die tryptischen Peptide wurden extrahiert und nach einem Standardprotokoll aufgereinigt. Für die ESI-MS Analyse der Peptide wurde ein QToF II Massenspektrometer (Micromass, UK) ausgerüstet mit einer Nanosprayionenquelle und goldbeschichteten Kapillaren (Protona) verwendet. Für MS/MS-Experimente wurden mehrfachgeladene Mutter-Ionen selektiv vom Quadrupol-Massenanalysator in die Kollisionzelle (25-30 eV) überführt. Die dissoziierten Tochter-Ionen wurden durch einen orthogonalen *time-of-flight* (TOF) Massenanalysator getrennt. Peptid-Fingerprints, welche durch die ESI-MS/MS erhalten wurden, wurden de novo sequenziert und für die Identifizierung mittels öffentlichen Sequenzdatenbanken (GenBank, BLAST) herangezogen.

2.8 GC-MS

Die Identifizierung der flüchtigen Reaktionsprodukte der enzymatischen Umsetzung der Curcuminoiden, O-Acetylcurcuminoiden oder O-Monoacetyl(bisdemethoxy)curcumine wurde mittels GC-MS (CP-3800 mit Massenspektrometer 1200, Varian, Palo Alto, Kalifornien, USA) mit folgenden Parametern durchgeführt:

Injektion:	250 °C, Split 1:10, 1 µL
Gas:	Helium
Gasfluss:	1,2 mL min ⁻¹
MS:	Quelle 200 °C, EI -70 eV, Massenbereich 33-500
Säule:	DB5-MS, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm df (Agilent Technologies)
Software:	Varian MS Workstation 6.9.1 (Varian)
Temperaturprogramm:	60 °C 2 min, 5 °C min ⁻¹ 250 °C, 5 °C min ⁻¹ 320 °C, 320 °C 10 min, 5 °C min ⁻¹ 340 °C, 340 °C 3 min

2.9 FPLC

Zur Isolierung der *dye-decolorizing* Peroxidase aus Kulturüberständen des *Haj* wurde eine Biologic-Duo-Flow Anlage gekoppelt mit einem Fraktionssammler Modell 2128 eingesetzt. Für die Isolierung der Oxidoreduktase wurde ein Zweistufenprozess verwendet. Dieser bestand aus einer HIC als erste Reinigungsstufe mit einer nachfolgenden Trennung über eine IEX. Die Durchführung fand bei 4 °C statt und die Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit der Software Bio Duo Flow Workstation.

¹⁸ Die Identifizierung wurde von Herrn Dr. Manfred Nimtz am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig durchgeführt.

2.9.1 HIC

Mit 4% (v/v) EtOH induzierte Submerskulturen von *Haj* wurden am höchsten Tag der Aktivität geerntet, bei -20 °C eingefroren und nach Auftauen bei 16.000 x g für 30 min zentrifugiert. Zu drei Teilen Überstand wurde ein Teil Auftragspuffer (100 mM Citratpuffer pH 5, 4 M (NH₄)₂SO₄) hinzugegeben und durch einen 45 µM Cellulose Acetat Filter (Sartorius Stedim Biotech) filtriert. Anschließend wurden bis zu 4 L auf eine mit Equilibrierungspuffer (50 mM Citratpuffer pH 5, 1 M (NH₄)₂SO₄) konditionierte HiPrep™ Phenyl FF-Säule (high sub, 200 mL Gelbett, GE Healthcare) mit einem Fluß von 4 mL min⁻¹ geladen. Nach weiterem Waschen mit Equilibrierungspuffer erfolgte die Elution der Zielaktivität mit Citratpuffer (50 mM, pH 5). In Tab. 11 ist das verwendete Programm dargestellt.

Tab. 11: FPLC-Gradientenprogramm für die hydrophobe Interaktionschromatographie

Volumen [mL]	Equilibrierungspuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	100	0
2	100	0
2	Probe	
4002	Probe	
4002	100	0
4902	100	0
4902	0	100
5902	0	100

2.9.2 Ionenaustauschchromatographie

Aktive Fraktionen nach der HIC wurden vereinigt, über ein Centrikon (10 kDa, Sartorius) konzentriert und mit Equilibrierungspuffer (20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5) gewaschen. Bis zu 25 mL wurden anschließend auf einen starken Anionentauscher (Q-Sepharose, 20 mL Gelbett, GE Healthcare) unter einem Fluss von 5 mL min⁻¹ aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Elutionspuffer (1 M NaCl, 20 mM Phosphatpuffer, pH 6,5) unter Verwendung des in Tab. 12 dargestellten Programms.

Tab. 12: FPLC-Gradientenprogramm für die Ionenaustauschchromatographie

Volumen [mL]	Equilibrierungspuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	100	0
2	100	0
2		Probe
27		Probe
27	100	0
47	100	0
50	89	11
130	89	11
135	78	22
195	78	22
200	0	100
260	0	100
260	100	0
320	100	0

2.9.3 Affinitätschromatographie

Rek. Lcc1 wurde über IMAC, basierend auf der Interaktion des 6 x His-Tags des Fusionsproteins mit auf der Säulenmatrix gebundenen Ni²⁺-Ionen, gereinigt. Die lösliche Aufschlussfraktion einer 250 mL *E.coli*-Kultur wurde auf Equilibrierungspuffer (100 mM Kaliumphosphat-Puffer, 300 mM KCl, pH 8) umgepuffert (Centrikon, 10 kDa, Sartorius) und auf eine IMAC-Säule (Bio-Rad), welche mit dem gleichen Puffer equilibriert wurde, bei einem Fluss von 0,5 mL min⁻¹ aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Equilibrierungspuffer, welchem 500 mM Imidazol zugesetzt wurde, bei einem Fluss von 5 mL min⁻¹ mit folgendem Programm (Tab. 13).

Tab. 13: FPLC-Gradientenprogramm für die IMAC

Volumen [mL]	Equilibrierungspuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	100	0
14	100	0
14	Probe	
60	Probe	
60	100	0
88	100	0
88	98	2
108	98	2
109	95	5
160	95	5
161	0	100
188	0	100
189	100	0
219	100	0

2.10 Elektrophorese

2.10.1 IEF

Für die IEF wurden Fertiggele (Servalyte Precotes pH 3-10, 300 μm , 125 mm x 125 mm, Serva) verwendet. Als Proteinstandard wurde der pI 3-10 IEF-Marker Liquid Mix (Serva) verwendet (Auftragsvolumen 5 μL). Die Anlage wurde mit 0,2 mL Kerosin benetzt und das Fertiggel luftblasenfrei mit der Gelseite nach unten und dem rotem Markierungsstreifen zur Anode zeigend aufgelegt. Je ein Docht wurde mit 0,1 mL cm^{-1} Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt und an die vorgesehenen Plätze der Gelkarte gelegt. 8 μL Probe wurden mittels Applikatorstreifen in der Gelmitte aufgetragen. Die Proteintrennung wurde bei 5 °C für 3500 Vh bei 2000 V und 6 mA/Gel durchgeführt. Für eine parallele Detektion mit unterschiedlichen Färbemethoden, wurde das IEF-Gel in der Mitte zerschnitten.

2.10.2 SDS-PAGE

Zum Auftrennen von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli 1970) verwendet. Es wurde nur ein Trenngel (12,5%ig: 3,5 mL 40% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid, 3 mL Single Gel Puffer, 30 μ L APS, 15 μ L TEMED, 5,2 mL H₂O) ohne Sammelgel verwendet. Das Trenngel wurde in Gießkassetten aus Glas gegossen und ein Kamm aufgesetzt. Die Polymerisierung erfolgte für 30 min (Gelmaße: 8,6 cm x 7,7 cm x 0,1 cm) bei 37 °C. Zur Probenvorbereitung wurden 20 μ L Probe mit 20 μ L Auftragspuffer (denaturierend oder nativ) versetzt und für die Denaturierung bei 95 °C für 10 min inkubiert. Die Elektrophorese wurde mit dem Biometra Minigel-Twin-System durchgeführt. Hierzu wurden je 10 μ L Probe bzw. 2 μ L Standard aufgetragen. Für den Lauf wurden 15 mA (nativ 10 mA) pro Gel verwendet. Die Proteintrennung erfolgte bei RT. Die native Elektrophorese wurde bei 4 °C durchgeführt. Als Größenstandard diente ein rekombinanter Proteinmix.

2.10.3 CBB-Färbung

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel dreimal in ca. 60 °C heißem Wasser für 5 min gewaschen. Anschließend wurde das Gel mit CBB-Lösung überschichtet und für 10 sec in der Mikrowelle erhitzt. Die Entwicklung erfolgte dann für 1-15 min bei langsamen Schütteln bis eine zufriedenstellende Anfärbung erreicht wurde. Zur Verbesserung des Kontrastes wurde der Hintergrund in ddH₂O entfärbt.

2.10.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Gel 20 min in Lösung I fixieren
- 2 × 10 min in Lösung II waschen
- 1 min in Lösung III inkubieren
- 3 × 20 sec mit Wasser waschen
- 20 min in Lösung IV inkubieren
- 2 × 20 sec mit Wasser waschen
- in Lösung V entwickeln
- 15 min in Lösung VI fixieren
- 3 × 5 min mit Wasser waschen

2.10.5 Westernblot

Westernblots wurden nach Anleitung für das His-Tag purification Kit (Quiagen) mit dem Antikörper 6xNi-NTA-Konjugates (HRP) durchgeführt. Der Transfer der Proteine nach SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran erfolgte bei einer Stromstärke von 1 mA cm^2 .

2.10.6 Aktivitätsfärbung

Für den Nachweis von Laccasen und Peroxidasen nach einer nativen SDS-PAGE bzw. IEF wurde eine Aktivitätsfärbung mit ABTS durchgeführt. Dabei wurde das Gel so lange mit ABTS-Lösung (5 mM ABTS in 10 mL 50 mM Natriumtartrat-Puffer pH 4,5, für den Nachweis von Peroxidasen zusätzlich mit 0,4 mM H_2O_2) inkubiert, bis eine deutliche Färbung zu erkennen war. Anschließend wurde die überflüssige ABTS-Lösung mit einem Papiertuch aufgenommen, um eindeutige Banden zu erhalten. Die TMBZ-Färbung wurde mit 5 mM TMBZ-Lösung (50 mM Citrat-Puffer pH 5, 5% (v/v) DMF) durchgeführt. Nach erfolgter Färbung wurde einmal mit ddH_2O gewaschen. Die DMP-Färbung erfolgte mit und ohne $400 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ mit einer 5 mM DMP-Lösung (50 mM NaAcetat-Puffer, pH 4).

2.10.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde wie folgt durchgeführt. Eine Agaroselösung (1% (w/v)) wurde mit Ethidiumbromid oder SYBR[®] Safe versetzt (7,5 μL auf 150 mL) und die Elektrophorese erfolgte bei 100 V und 400 mA bis die Bromphenolblau-Bande das Gel durchlaufen hatte. Die Auswertung erfolgte mittels eines Vilber Lourmat Bio Vision 3020 Kamerasystems.

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Primer Design

Ableitung spezifischer Primer aus bekannten Nukleotidsequenzen

Bei der Ableitung spezifischer Primer aus einer bekannten Nukleotidsequenz sollten, wenn möglich, folgende Kriterien erfüllt werden:

- Die Länge des Primers sollte zwischen 18 und 25 Basen liegen.
- Der GC-Anteil sollte maximal 65% betragen.
- Die Schmelztemperatur sollte mindestens $55 \text{ }^\circ\text{C}$ betragen.
- Am 3'-Ende sollte mindestens ein G oder C liegen, maximal jedoch drei in Folge.

- Die Komplementarität zu sich selbst oder dem korrespondierenden Primer sollte möglichst gering sein.

Ableitung degenerierter Primer aus Peptidsequenzen

Hierfür wurde das Programm Reverse Translate¹⁹ verwendet, welches die Peptide in die Nukleotidsequenz rückübersetzt. Als *codon usage* wurde die des *Auricularia auricula-judae*²⁰ verwendet. Um auch Primer für Bereiche zu synthetisieren in denen Leucin (Leu)/Isoleucin (Ile) (Differenzierung über die verwendete MS-Methode nicht möglich) vorkommen, wurden Primer mit den kodierenden Basen für Leucin oder Isoleucin synthetisiert. Verwendete Wobble: R –A,G; Y –C,T; K –G,T; N –A,T,C,G; D –A,G,T; H –A,C,T

Verwendete Primer

Tab. 14: Von Peptidsequenzen P1-P3 abgeleitete *forward* (for) und *reverse* (rev) Primer für die Amplifizierung der DyP aus *Haj*

Bezeichnung	Sequenz	Bezeichnung	Sequenz
P1.1forHAj	5'-AAY GAY CCN GCA TTC AC-3'	P2.1revHAj	5'-GCN GGR TCR TCN GCR GTA GG-3'
P1.2forHAj	5'-AAY GAY CCN GCT TTC AC-3'	P2.2revHAj	5'-GCN GGR TCR TCN GCR GTT GG-3'
P1.3forHAj	5'-AAY GAY CCN GCC TTC AC-3'	P2.3revHAj	5'-GCN GGR TCR TCN GCR GTC GG-3'
P1.3forHAj	5'-AAY GAY CCN GCG TTC AC-3'	P2.4revHAj	5'-GCN GGR TCR TCN GCR GTG GG-3'
P1.5forHAj	5'-AAY GAY CCN GCR TTC ACA AA-3'	P2.5revHAj	5'-GCN GGR TCR TCN GCY GTA GG-3'
P1.6forHAj	5'-AAY GAY CCN GCR TTC ACT AA-3'	P2.6revHAj	5'-GCN GGR TCR TCN GCY GTT GG-3'
P1.7forHAj	5'-AAY GAY CCN GCR TTC ACC AA-3'	P2.7revHAj	5'-GCN GGR TCR TCN GCY GTC GG-3'
P1.8forHAj	5'-AAY GAY CCN GCR TTC ACG AA-3'	P2.8revHAj	5'-GCN GGR TCR TCN GCY GTG GG-3'
P1.9forHAj	5'-AAY GAY CCN GCY TTC ACA AA-3'	P3.1revHAj	5'-CKY TGN GCR TCR GCA CC-3'
P1.10forHAj	5'-AAY GAY CCN GCY TTC ACT AA-3'	P3.2revHAj	5'-CKY TGN GCR TCR GCT CC-3'
P1.11forHAj	5'-AAY GAY CCN GCY TTC ACC AA-3'	P3.3revHAj	5'-CKY TGN GCR TCR GCG CC-3'
P1.12forHAj	5'-AAY GAY CCN GCY TTC ACG AA-3'	P3.4revHAj	5'-CKY TGN GCR TCR GCC CC-3'
P2.1forHAj	5'-ACN GCN GAY GAC CCA GC-3'	P3.5revHAj	5'-CKY TGN GCR TCY GCA CC-3'
P2.2forHAj	5'-ACN GCN GAY GAC CCT GC-3'	P3.6revHAj	5'-CKY TGN GCR TCY GCT CC-3'
P2.3forHAj	5'-ACN GCN GAY GAC CCC GC-3'	P3.7revHAj	5'-CKY TGN GCR TCY GCG CC-3'

¹⁹ http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html

²⁰ <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=29892&aa=1&style=GCG>

Bezeichnung	Sequenz	Bezeichnung	Sequenz
P2.4forHAj	5'-ACN GCN GAY GAC CCG GC-3'	P3.8revHAj	5'-CKY TGN GCR TCY GCC CC-3'
P2.5forHAj	5'-ACN GCN GAY GAT CCA GC-3'	P4.1revHAj	5'-GGY TGN CCR TTA TTT TG-3'
P2.6forHAj	5'-ACN GCN GAY GAT CCT GC-3'	P4.2revHAj	5'-GGY TGN CCR TTA TTC TG-3'
P2.7forHAj	5'-ACN GCN GAY GAT CCC GC-3'	P4.3revHAj	5'-GGY TGN CCR TTG TTT TG-3'
P2.8forHAj	5'-ACN GCN GAY GAT CCG GC-3'	P4.4revHAj	5'-GGY TGN CCR TTG TTC TG-3'
P3.1forHAj	5'-GGN GCN GAY GCN CAA CG-3'	P4revleu1HAj	5'-TCN ARN CCN ACN GTA GC-3'
P3.1forHAj	5'-GGN GCN GAY GCN CAG CG-3'	P4revleu2HAj	5'-TCN ARN CCN ACN GTT GC-3'
P3.1forHAj	5'-GGN GCN GAY GCN CAA AG-3'	P4revleu3HAj	5'-TCN ARN CCN ACN GTG GC-3'
P3.1forHAj	5'-GGN GCN GAY GCN CAG AG-3'	P4revleu4HAj	5'-TCN ARN CCN ACN GTC GC-3'
		P4revile1HAj	5'-GRT CDA TNC CNA CNG TAG C-3'
		P4revile2HAj	5'-GRT CDA TNC CNA CNG TTG C-3'
		P4revile3HAj	5'-RTC DAT NCC NAC NGT GGC-3'
		P4revile4HAj	5'-RTC DAT NCC NAC NGT CGC-3'

Tab. 15: Ausgehend von den publizierten *Auricularia auricula-judae* DyP Peptidfragmenten (Liers *et al.* 2010) der Isoenzyme 1 und 2 abgeleitete Primer

Bezeichnung	Sequenz	Bezeichnung	Sequenz
Iso1for1	5'-GAY GAY ATH CAA GGA GAC AT-3'	Iso1rev1	5'-ATG TCN CCT TGD ATA TCA TC-3'
Iso1for2	5'-GAY GAY ATH CAA GGT GAC AT-3'	Iso1rev2	5'-ATG TCN CCT TGD ATA TCG TC-3'
Iso1for3	5'-GAY GAY ATH CAA GGG GAC AT-3'	Iso1rev3	5'-ATG TCN CCT TGD ATG TCA TC-3'
Iso1for4	5'-GAY GAY ATH CAA GGC GAC AT-3'	Iso1rev4	5'-ATG TCN CCT TGD ATG TCG TC-3'
Iso1ile1for	5'-AAY ACN GAY GAY ATH CAA GG-3'	Iso2ile1	5'-GGN ACN GGN ATH CAC GG-3'
Iso1ile2for	5'-AAY ACN GAY GAY ATH CAG GG-3'	Iso2ile2	5'-GGN ACN GGN ATH CAT GG-3'
Iso1leu1for	5'-AAY ACN GAY GAY YTN CAA GG-3'	Iso2leu1	5'-GGN ACN GGN YTN CAC GG-3'
Iso1leu2for	5'-AAY ACN GAY GAY YTN CAG GG-3'	Iso2leu2	5'-GGN ACN GGN YTN CAT GG-3'

Tab. 16: Verwendete Primer zum Fischen einer DyP aus *Pleurotus sapidus*

Bezeichnung	Sequenz	GC [%]	T _m [°C]
Psa1for	5'-TCA AGG AGA CAT CAT GAT TGG GA-3'	43,5	58,9
Psa2for	5'-GGT AAA GAA CAC TTT GGT TGG C-3'	58,4	58,4
Psa3for	5'-CTG GAA GAG CGG TAC TCC-3'	61,1	58,2
Psa4for	5'-TGT CCC TTC TCC GCA CAC-3'	61,1	58,2
Psa1rev	5'-CTG AAG AAG TAG TCA CCT CC-3'	50,0	57,3
Psa2rev	5'-GTG TGC GGA GAA GGG AC-3'	64,7	57,6
Psa3rev	5'-GTA CCG CTC TTC CAG CG-3'	64,7	57,6
Psa4rev	5'-GCC AAC CAA AGT GTT CTT TAC C-3'	45,5	58,4

Tab. 17: Verwendete Primer für die *lcc1*-Punktmutation, ITS-Sequenzierung und cDNA-Synthese

Bezeichnung	Sequenz	GC [%]	T _m [°C]
ITS-1 for	5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'	63,0	61,0
ITS-4 rev	5'-CTC CGC TTA TTG ATA TGC T-3'	42,0	52,4
CDSIII/3'PCR	5'-ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG-3'	63,0	71,0
SmartIV	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT ACG GCC GGG-3'	59,0	76,8
5' PCR	5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3'	48,0	60,6

Tab. 18: Primer für die heterologe Expression von *lcc1* in *E.coli*

Bezeichnung	Sequenz	GC [%]	T _m [°C]
<i>lcc1_punkt_for</i>	5'-GAT CGA CCA ACT CAC AGA CGC-3'	57,1	61,8
<i>lcc1_punkt_rev</i>	5'-TCT GTG AGT TGG TCG ATC ACG-3'	52,4	59,8
<i>lcc1_NdeI</i>	5'- GGC ATA TGT CTT CTT TCT CGA CT -3'	43,5	58,9
<i>lcc1_EcoRI</i>	5'- TGC AGA ATT CGG CTT GTT TAA TG -3'	41,7	59,3
pCOLDI fw	5'- CGT AGT GCA CAT TCC TTT AAC GC -3'	47,8	60,6
pCOLDI rev	5'- ATG GCA GGG ATC TTA GAT TCT GTG -3'	45,8	61,0
<i>lcc1_intern</i>	5'- CAG TCG GCT AGT GTG ATC ACG -3'	57,1	61,8

2.11.2 PCR

2.11.2.1 Standard-PCR

Eine Standard-PCR wurde angewandt, wenn die Amplifizierung eines Fragments bereits etabliert wurde bzw. die optimale Annealing-Temperatur bekannt war. Die PCR wurde mit DreamTaq[®] DNA Polymerase durchgeführt. Da es sich um eine *Hot Start Taq*-Polymerase handelt, wurde der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur pipettiert. Die Zyklenzahl wurde der Templatemenge angepasst; in der Regel wurde mit 35 Zyklen eine gute Ausbeute erzielt. Reaktionsansatz und Programm sind in Tab. 19 und Tab. 20 aufgeführt.

Tab. 19: Programm für die Standard-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initiation	95	3
Denaturierung	94	30-60 sec
Annealing	variabel	1
Elongation	72	1 je kb
Finale Elongation	72	10

Tab. 20: Reaktionsansatz einer Standard-PCR mit DreamTaq[®] Polymerase

Komponenten	Endkonzentration	Volumen [μL]
10 x DreamTaq [®] Puffer	1x	2
40 mM dNTPS (je 10 mM)	0,8 mM	0,4
10 μM Primer for	1	1
10 μM Primer rev	1	1
DreamTaq [®]	5 U μL^{-1}	0,2
Template	-	1
ddH ₂ O	-	14,4

2.11.2.2 Gradienten-PCR

Die Gradienten-PCR wurde genutzt, um bei problematischen PCRs die optimale Annealing-Temperatur zu ermitteln. Die Reaktion wurde in einem Mastercycler[®] Gradient von Eppendorf durchgeführt. Der Ansatz wurde analog zur Standard-PCR durchgeführt und folgendes PCR-Programm verwendet.

Tab. 21: Programm für Gradienten-PCR

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Zeit [min]	
Initiation	95	5	
Denaturierung	94	1	
Annealing	55-70 $^{\circ}\text{C}$ (60 $^{\circ}\text{C}$ G=10)	1	23 Zyklen
Elongation	72	1	
Finale Elongation	72	10	

2.11.2.3 Touch Down-PCR

Die Touch Down-PCR (Hecker and Roux 1996) wurde bei PCR-Screenings mit degenerierten Primern verwendet. Aufgrund des hohen Probenaufkommens wurde dieser Methode der Vorzug gegeben. Die Touch Down-PCR beginnt mit einer Annealing-Temperatur, die 5 $^{\circ}\text{C}$ über der Schmelztemperatur T_m liegt. Die Annealing-Temperatur wurde über 12 Zyklen um jeweils 1 $^{\circ}\text{C}$ gesenkt, um dann die PCR weitere 28 Zyklen bei einer konstanten Annealing-Temperatur durchzuführen.

Tab. 22: Programm für die *Touch Down*-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	
Initiation	95	5	
Denaturierung	94	0,5	
Annealing	$T_m + 5\text{ °C}$	1	13 Zyklen (-1 °C/Zyklus)
Elongation	72	1	
Denaturierung	94	1	
Annealing	$T_m - 7\text{ °C}$	1	25 Zyklen
Elongation	72	1,5	
Finale Elongation	72	10	

2.11.2.4 Kolonien-PCR

Um nach erfolgter Ligation und Transformation positive Klone zu identifizieren, wurde eine Kolonien-PCR durchgeführt. Hierbei wurden das Programm und der Reaktionsansatz der Standard-PCR verwendet. Als Primer wurden die für den pCR[®]2.1 spezifischen M13 uni (-21) und M13 rev (-29) verwendet. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde Probenmaterial einer weißen Kolonie aufgenommen und durch Reiben im Reaktionsansatz an der Gefäßwand resuspendiert. Mit demselben Zahnstocher wurde eine Masterplatte angeimpft, um die getesteten Klone auf einer LB-Agarplatte zu bündeln. Die Initiation wurde auf 10 min verlängert, um das Probenmaterial besser aufzuschließen.

2.11.2.5 Rückmutation des *lccI* Gens

Nach Vergleich der amplifizierten *lccI*-Sequenzen, ausgehend von genomischer oder cDNA, wurde ein Klon ausgewählt. Dieser enthielt eine Punktmutation, welche über das Prinzip des *rolling circles* behoben wurde. Die Punktmutation wurde nach Herstellerangaben (Fermentas, DpnI-Manual) und die PCR mit den Primern *lccI_punkt_for* und *lccI_punkt_rev* (Tab. 18) durchgeführt.

2.11.3 Klonierung von DNA-Sequenzen

2.11.3.1 Aufreinigung und Elution des zu klonierenden DNA-Fragmentes

Das durch PCR erhaltene Fragment wurde per Agarosegelelektrophorese (2.10.7) aufgetrennt, anschließend mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mit einem NucleoSpin[®] Extract II-Kit von

MACHEREY-NAGEL nach Herstellerangaben aus dem Gelstück extrahiert. Eluiert wurde mit 40 μL sterilem ddH_2O .

2.11.3.2 Ligation

Für die Ligation wurde das pCR[®]2.1-TOPO[®]-Cloning Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Ligation erfolgte bei 24 °C innerhalb von 3 h oder über Nacht bei 14 °C in den pCR[®]2.1 TOPO[®]-Vektor.

2.11.3.3 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* für die Transformation

E.coli TOP10 Zellen wurden in einer 3 mL Übernachtskultur ohne Ampicillin kultiviert. Anschließend wurden 250 mL LB-Medium zu einer OD von 0,1 angeimpft und bis zu einer OD von 0,8-0,9 bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde 15 min auf Eis gekühlt und die Zellen bei 4000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 10 mL Lösung 1 (0,1 M CaCl_2 und 2 mM Tris-HCl) resuspendiert und wiederum bei 4000 x g für 10 min und bei 4 °C pelletiert. Mit 10 mL Lösung 2 (Lösung 1 mit 10% (v/v) Glycerol) wurde das Pellet resuspendiert, anschließend aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.11.3.4 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* für die Chaperon-Co-Expression

Für die Herstellung von *E.coli*-Zellen zur Co-Expression mit den Chaperonvektoren (pGro7groES-groEL, pG-Tf2 groES-groEL-tig, pTf16 tig) wurden kompetente BL21 DE3 Star Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit entsprechenden Chaperon-Plasmiden transformiert und auf LB-Platten mit 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol selektiert. Rekombinante Klone wurden wiederum für die Produktion chemisch kompetenter Zellen unter Verwendung von 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol eingesetzt.

2.11.3.5 Transformation

Kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-5 μL des Ligationsansatzes oder 0,1 μL Plasmidisolates erfolgte eine Inkubation von 20 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen für 45 sec bei 42 °C einem Hitzeschock unterworfen, auf Eis kurz abgekühlt, 300 μL auf 37 °C vortemperierte SOC-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden definierte Mengen auf vorgewärmte LB/Amp-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Stämme BL21 pLysE, *Rosetta gami* B, Shuffle C3026 und BL21 mit Chaperonen wurde zusätzlich zum Ampicillin 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Chloramphenicol als Selektionsmarker verwendet. Für ein Blau-Weiß-Screening wurden LB/Amp-Agarplatten mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) verwendet.

2.11.3.6 *Ermittlung positiver Klone*

Eine Vorselektierung der Klone erfolgte auf Basis der Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agarplatten mit den erforderlichen Antibiotika. Klone, welche nach erfolgreicher Ligation das transformierte Plasmid inklusive Insert trugen, erscheinen weiß. Klone mit religiertem Vektor (ohne Insert) färben sich blau. Einige zufällig ausgewählte Klone wurden auf einer Masterplatte vereinzelt und mittels Kolonien-PCR (2.11.2.4) und anschließender Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.11.3.7 *Plasmid-Präparation*

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurde eine Übernachtskultur (2.2.1.8) mit einem positiven *E. coli*-Klon angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (15 min, 2000 x g) und die Plasmid-DNA gemäß Anleitung mit dem NucleoSpin[®] Extract II-Kit von Macherey und Nagel isoliert. Die Elution erfolgte mit 40 µL sterilem ddH₂O.

2.11.3.8 *Sequenzierung*

Nach Identifizierung positiver Klone wurden von der Masterplatte Übernachtskulturen angeimpft, um eine Plasmid-Präparation durchzuführen. Die Plasmide mit den klonierten Fragmenten wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) sequenziert.

2.11.3.9 *Herstellung von Glycerolstocks*

Für die langfristige Lagerung von Klonen wurden von diesen Übernachtskulturen angeimpft. Nach erfolgter Kultivierung wurde die gesamte Kultur bei 4000 x g für 15 min zentrifugiert in 800 µL LB/Amp respektive LB/Amp-Cam resuspendiert, mit 200 µL Glycerol versetzt und bei -70 °C eingefroren.

2.11.4 Identifizierung von Basidiomyceten über die ITS-Sequenz

Die ITS-Region wurde durch die ITS-1 for und ITS-4 rev (Tab. 17) in einer Standard-PCR über 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 55 °C aus genomischer DNA (2.11.6) amplifiziert. Das Fragment wurde kloniert und sequenziert. Die so erhaltene Sequenz wurde zur Stammbestimmung einer BLAST-Recherche unterzogen.

2.11.5 cDNA-Synthese

Die Isolierung frischer mRNA wurde aus induzierten (EtOH) *Haj*-Hauptkulturen mit Hilfe des NucleoSpin[®] RNA Plant Kits von Macherey und Nagel nach Anleitung durchgeführt. Der Aufschluss des Myzels erfolgte dabei durch Mörsern (Mörser, Pistill und Spatel bei 200°C 4 h sterilisiert) unter flüs-

sigem N₂. Für die Erststrangsynthese der cDNA wurden die Primer CDSIII/3'PCR und SmartIV verwendet (Tab. 17). Folgendes Protokoll wurde verwendet (Tab. 23).

Tab. 23: Erststrangsynthese der cDNA

1. Denaturierung	2. Ergänzung des Ansatzes	3. Reverse Transkription
3 µL isolierte Gesamt-RNA	4 µL 5x RT-Puffer	200 U Reverse Transkriptase
2,5 µL CDSIII/3'PCR (25 pmol)	2 µL 10 mM dNTPs	
5,5 µL RNase freies H ₂ O	0,5 µL RiboLock™	
	2 µL Smart IV (20 pmol)	
70 °C für 5 min; auf Eis 2 min	37 °C 5 min	42 °C 60 min; 70 °C 5 min

Die Zweitstrangsynthese wurde mit den Adapterprimern 5'PCR und CDSIII/3'PCR (Tab. 17) nach folgendem Reaktionsansatz und PCR-Programm durchgeführt.

Tab. 24: Zweitstrangsynthese der cDNA

Komponenten	Endkonzentration	Volumen [µL]
10 x Long PCR Puffer mit MgCl ₂	1x	2,5
10 mM dNTPs (je 2,5 mM)	0,8 mM	2,0
10 µM 5'PCR	1,0 mM	2,5
10 µM CDSIII/3'PCR	1,0 mM	2,5
100% (v/v) DMSO	4% (v/v)	1,0
Long PCR Enzyme Mix 5 U µL ⁻¹	1 U	0,2
ss cDNA	-	3,0
ddH ₂ O	-	11,3

Für eine erneute cDNA Synthese wurde direkt nach der mRNA-Isolierung die rRNA mit dem NucleoTrap[®] mRNA-Kit von Macherey & Nagel abgetrennt.

2.11.6 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Basidiomyceten wurde nach Herstellerangaben mit dem Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt.

2.12 Heterologe Expression der *lcc1* in *E.coli*

2.12.1 Klonierung in den pCOLDI Expressionsvektor

Das gesamte *lcc1*-Gen, welches in dem Vektor pCR.2.1 vorlag, wurde mit den Primern *lcc1*_NdeI und *lcc1*_EcoRI mittels Standard-PCR unter Verwendung der Taq-Polymerase (Fermentas, St Leon-Rot) mit flankierenden Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *EcoRI* amplifiziert. Nach anschließender Isolierung des Amplifikates (2.11.3.1) wurde dieses wie auch der Expressionsvektor pCOLDI (Takara) mit den Restriktionsenzymen FastDigest® *NdeI* und FastDigest® *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach Herstellerangaben geschnitten. Nach erfolgter Aufreinigung der entsprechenden Fragmente (2.11.3.1) wurden diese mit einer T4-Ligase (Invitrogen) nach Herstellerangaben bei 14 °C ligiert, um das Konstrukt pCOLDI-*Lcc1* zu erhalten. Um sicherzustellen, dass das Insert korrekt im pCOLDI-Vektor vorlag, wurde nach erfolgter Transformation (2.11.3.5) in *E.coli* TOP10 Zellen von positiven Klonen (2.11.3.6) die Plasmide isoliert (2.11.3.7) und mit den Primern pCOLDI_fw, pCOLDI_rev, *lcc1*_intern (Tab. 18) sequenziert (2.11.3.8). Von Klonen mit einem fehlerfreien *lcc1*-Insert wurden Glycerolstocks (2.11.3.9) angefertigt.

2.12.2 Protein Expression

Für die Enzymproduktion wurden die *E.coli*-Stämme BL21 (DE3), BL21 Star (DE3), BL21 pLysE, Rosetta gami B (Novagen, Madison, WI, USA) Shuffle C3026H (NEW ENGLAND BioLabs® Inc.) sowie hergestellte kompetente BL21 DE3 Stämme, welche plasmidkodiert Chaperone tragen, mit dem Expressionsvektor pCOLDI-*lcc1* transformiert (2.11.3.5). Über eine Kolonien-PCR mit den Primern pCOLDI_fw, pCOLDI_rev (Tab. 18) wurde geprüft, ob die Transformation erfolgreich war. Von positiven Klonen wurden Glycerolstocks (2.11.3.9) hergestellt. Für die intrazelluläre Expression wurde eine Übernachtskultur in Minimalmedium (MDAG-135 (Studier 2005)) und den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurde frisches Minimalmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert und zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5-0,8 bei 37 °C inkubiert. Die Induktion der Chaperone erfolgte durch Tetrazyklin (pTf16 tig, 5 ng mL⁻¹) und L-Arabinose (pGro7groES-groEL, pG-Tf2 groES-groEL-tig, 1 mg mL⁻¹) direkt nach der Inokulation. Nach einem Kälteschock bei 15 °C für 30 min im Wasserbad wurden die Kulturen mit 0 bis 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 0,1 mM CuSO₄ induziert und bei 8 °C für 48 h inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentri-

fugation bei 4800 x g für 30 min geerntet und in Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 4 mM MgCl₂, 5 U mL⁻¹ Benzonase[®] (Sigma-Aldrich[®]), 0,2 mg mL⁻¹ Lysozym (Sigma-Aldrich[®])) über Nacht bei 4 °C aufgeschlossen. Die Trennung der löslichen und unlöslichen Fraktion wurde durch Zentrifugation bei 16000 x g für 30 min erreicht.

2.12.3 *In silico* Verfahren

Die Ermittlung homologer Gene und Proteine wurde mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST)²¹ durchgeführt. Als Datenbank wurde die GenBank des National Center for Biotechnology (NCBI) verwendet. Die Translation der DNA in die Aminosäuresequenz und die Berechnung des pI-Wertes erfolgte über ExPasy²². Die Berechnung der Introns in der genomischen LacI-Sequenz wurde mit Wise2²³ durchgeführt.

²¹ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

²² <http://www.expasy.org/tools/dna.html>, http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html

²³ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/Wise2/index.html>

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Screening nach Oxidoreduktasen in Basidiomycetenkulturen

3.1.1 Verwendung der Induktoren Xylidin und Lignin

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Oxidoreduktasen aus Basidiomyceten für den Einsatz in der Lebensmittelindustrie zu identifizieren. Die Basidiomyceten (Tab. 2), bei denen es sich zumeist um Weißfäulepilze wie z.B. *Meripilus giganteus* und *Hirneola auricula-judae* (Abb. 14) handelte, wurden auf Basis von Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe (Peters 2004) ausgewählt.



Abb. 14: *Meripilus giganteus*²⁴ und *Hirneola auricula-judae*²⁵

Durch Verwendung von unterschiedlichen Medien sollte das Expressionsmuster dahingehend verändert werden, dass neue, bisher unbekannte Oxidoreduktaseaktivitäten generiert werden. Hierzu wurden die Pilze in drei verschiedenen Medien kultiviert: Ein Grundmedium ohne weitere Induktoren (SNL), Grundmedium mit Xylidin (2,5- Dimethylanilin) (Xyl) und ein Grundmedium ohne Glucose, aber mit Tween 80 als C-Quelle sowie Lignin als Induktor (Lig).

Zu allen Kulturen wurde CuSO_4 als genereller Laccaseinduktor (Collins and Dobson 1997; Galhaup and Haltrich 2001), welcher auf transkriptioneller Ebene wirkt (Palmieri *et al.* 2000), hinzugegeben. Von den Kulturen wurden regelmäßig Proben genommen und diese auf Laccase- und Peroxidaseaktivität untersucht. Aufgrund des hohen Probenaufkommens wurden die Enzymassays im 96-well Mikrotiterplattenformat ausgeführt. Der bereits in der Literatur beschriebene Laccaseproduzent *Trametes sp.*

²⁴ http://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?Topic_id=10234, abgerufen 15.05.2012

²⁵ http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Hirneola_auricula-judae_%28xndr%29_cropped.jpg, abgerufen 15.05.2012

(Xiao *et al.* 2004) und ein ebenfalls als Peroxidaseproduzent bekannter *Pleurotus eryngii*-Stamm (Gómez-Toribio *et al.* 2001; Martínez *et al.* 1996) wurden als Referenz zusätzlich untersucht. Dabei ist jedoch zu beachten, dass durch die unterschiedliche Herkunft der Basidiomycetenstämmen (oft auch Eigenisolate oder verschiedene Stammsammlungen) und die Schwierigkeiten der eindeutigen Zuordnung der einzelnen Arten (siehe ITS-Sequenzierung) es sich durchaus auch um abweichende Arten bzw. Unterarten handeln könnte, welche verschiedene Laccase- und Peroxidasen exprimieren. Nach einem Vorscreening (Daten nicht gezeigt) wurden die Kombinationen von Basidiomyceten und Medium mit den höchsten Laccase- und Peroxidasetitern nochmals genauer untersucht. Im Folgenden (Abb. 15) sind die Ergebnisse dieses Screening dargestellt.

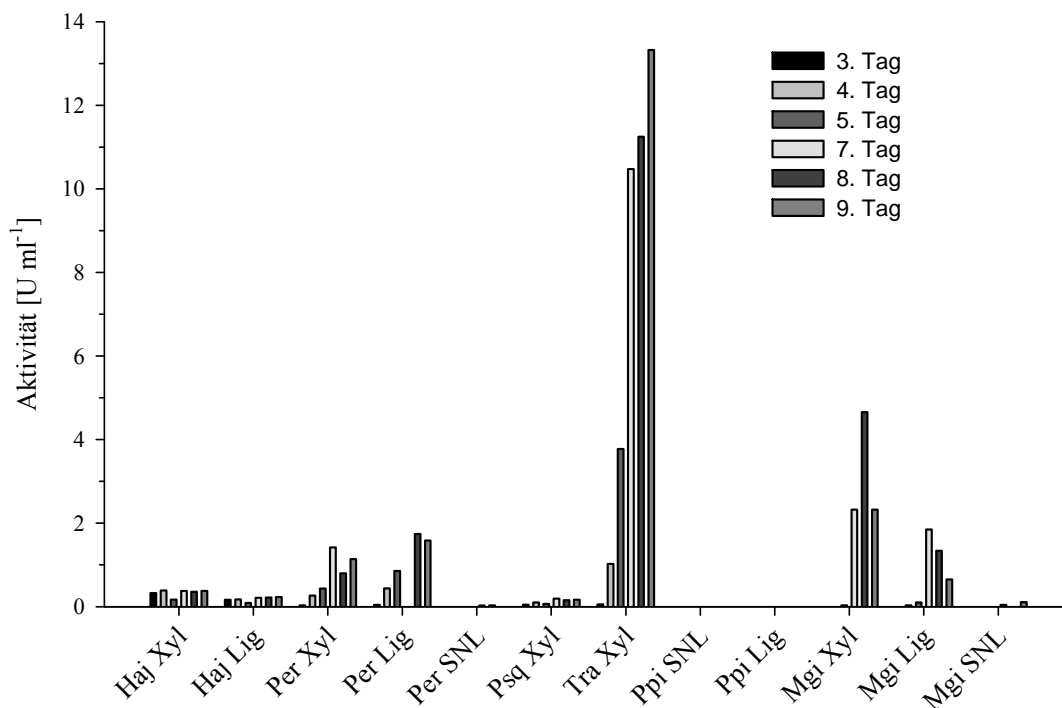


Abb. 15: Verlauf der Laccaseaktivität (ABTS, 2.2.2.2) in den Überständen von ausgewählten Basidiomyceten im Grundmedium (SNL) und mit den Induktoren Xylidin (Xyl) sowie Lignin (Lig)

Wie in Abb. 15 dargestellt, konnten die höchsten Laccaseaktivitäten in den Kulturüberständen von *Per* (Lig, 8. Tag, $1,7 \text{ U mL}^{-1}$), *Mgi* (Xyl, 8. Tag, $4,7 \text{ U mL}^{-1}$) und *Tra* (Xyl, 9. Tag, $13,3 \text{ U mL}^{-1}$) detektiert werden. Geringe Laccaseaktivität zeigten *Haj* (Xyl, 7. Tag, $0,4 \text{ U mL}^{-1}$) und *Psq* (Xyl, 7. Tag, $0,2 \text{ U mL}^{-1}$). Wie wichtig der Einsatz von Induktoren zur Steigerung der Aktivität bzw. überhaupt zur Initiierung der Synthese von Laccasen ist, verdeutlicht die nahezu fehlende Laccaseaktivität in den uninduzierten Kulturen von *Per* und *Mgi* im Vergleich zu den mit Lig und Xyl induzierten.

Der verwendete Induktor Xylidin wird in der Literatur als sehr potenter Induktor von Laccasen unter anderem in *Trametes villosa* (Minussi *et al.* 2007a), *Pycnoporus sanguineus* (Garcia *et al.* 2006) und

Pleurotus sajor-caju (Soden and Dobson 2001) beschrieben. Die Induktion durch aromatische Amine und Phenole wirkt auf der Ebene der Transkription und könnte eine Antwort des Pilzes auf toxische Verbindungen sein, wie sie z.B. beim Abbau des Lignins entstehen. Mittels sekretierter Laccasen oder Peroxidasen werden diese monomeren Phenole durch Polymerisierung detoxifiziert (Piscitelli *et al.* 2011).

Die Induktionswirkung von Lignin-Organosolv (Methanolextrakt) kann auf die Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat des Pilzes, dem Holz, zurückgeführt werden. In *Phlebia radiata* (Rogalski *et al.* 1991) konnte die Verwendung von Lignosulphonat und synthetischen Lignin ebenfalls die Laccaseexpression stimulieren.

Lignin und Tween 80 wurden zusammen in einer Kulturführung eingesetzt, da dies bereits erfolgreich für die Laccaseproduktion mit *Pleurotus sapidus* eingesetzt werden konnte (Linke *et al.* 2007). Die Wirkung des vorhandenen Tween 80 ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt. Eventuell wird durch Zugabe von Detergenzien eine Veränderung der Zellmembran induziert, welche das Ein- und Ausschleusen von Stoffen bzw. Enzymen vereinfacht (Reese and Maguire 1969; Takao *et al.* 1984).

Für die Art und Konzentration der exprimierten Peroxidasen war die Wahl des Induktors von entscheidendem Einfluss (Abb. 16). Von einer Verwendung des ABTS-Assays wurde abgesehen, da ohne eine Abtrennung der Laccaseaktivität die Peroxidaseaktivität überdeckt werden kann. Stattdessen wurde Phenolrot als Substrat verwendet. In Vorversuchen konnte beobachtet werden, dass auch Laccasen in der Lage sind, Phenolrot, wenn auch deutlich schlechter als ABTS, zu oxidieren. Für eine eindeutige Identifizierung von Peroxidasen wurde der Phenolrot-Assay wie folgt modifiziert durchgeführt: a) Mn^{2+} und H_2O_2 für eine mögliche Klassifizierung als manganabhängige Peroxidase, b) H_2O_2 ohne Mn^{2+} für die Klassifizierung als manganunabhängige Peroxidase, c) ohne H_2O_2 und ohne Mn^{2+} , um Kreuzreaktion durch Laccasen zu bestimmen. Da der gewählte Phenolrot-Assay nur als Endpunktbestimmung verwendet werden konnte, wurden die Aktivitäten als die Absorption angegeben, welche bei einer Wellenlänge von 610 nm nach einer 60 minütigen Inkubationszeit vorliegt.

Als beste Peroxidaseproduzenten konnten *Ppi* (SNL und Lig) und *Haj* (Xyl und Lig) identifiziert werden. Dass durch Zugabe von Induktoren auch die Bildung von Enzymen gänzlich unterdrückt werden kann, ist am Beispiel der Peroxidase vom *Per* ersichtlich, deren Expression bei Vorhandensein von Xylidin vollständig gehemmt wurde (Abb. 16).

Durch Zugabe von Tween 80 konnte ebenfalls in Kulturen von *Phanerochaete chrysosporium* die Lignin- und Mn-Peroxidaseaktivität deutlich gesteigert werden (Asther *et al.* 1987; Rodríguez *et al.* 1998). Für eine Variante des *Ppi* (FP-53236, *Phellinus pini* (Brot.) Bondartsev & Singer) wurden bereits sehr geringe Lignin- und Mn-Peroxidaseaktivitäten von $0,02 \text{ U mL}^{-1}$ respektive $0,09 \text{ U mL}^{-1}$ beschrieben (Bonnarme and Jeffries 1990) und die beiden Enzyme für eine Untersuchung zur Umsetzung von phenolischem und nicht-phenolischem β -O-4 Lignin verwendet (Yokota *et al.* 1998). Da keine Informationen hinsichtlich ITS-Sequenz zur eindeutigen Identifizierung der genauen Art bzw.

Unterart vorliegen, kann jedoch kein eindeutiger Vergleich mit dem in dieser Arbeit verwendeten *Phellinus pini* gezogen werden.

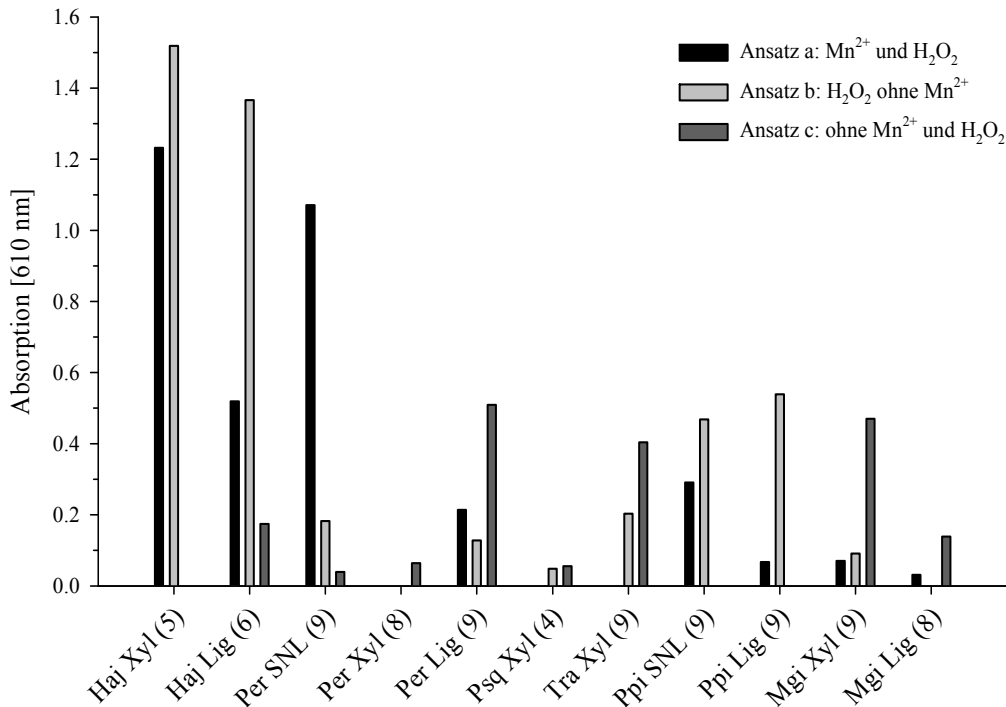


Abb. 16: Für die Messung der Peroxidaseaktivität (Absorption nach 60 min) in den Kulturüberständen ausgewählter Pilze wurden drei verschiedenen Versuchsansätzen verwendet: Ansatz a) Mn²⁺ und H₂O₂, Manganperoxidasen, Ansatz b) H₂O₂ und ohne Mn²⁺, manganunabhängige Peroxidasen, Ansatz c) ohne H₂O₂ und ohne Mn²⁺, Kreuzreaktion mit Laccasen. Die Zahlen in Klammern geben den Tag der höchsten Aktivität an.

Die in SNL gebildete Peroxidase von *Per* (SNL) kann, da die Oxidation von Phenolrot bei Vorhandensein von Mn²⁺ deutlich erhöht ist, in die Klasse der manganabhängigen Peroxidasen eingeordnet werden. Die höchsten Peroxidasetiter konnten bei der Induktion von *Haj* mit Xyl und Lig detektiert werden. Unabhängig von den hier geschilderten Arbeiten wurden zeitgleich im selben Basidiomyceten *Auricularia auricula-judae* (synonym für *Haj*, DSMZ 11326), welcher in einem auf Tomatensaft basierendem Medium kultiviert wurde, von einer anderen Arbeitsgruppe zwei DyPs isoliert (Liers *et al.* 2010). Um die Frage zu klären, ob und inwieweit sich die in dieser Arbeit entdeckten Peroxidasen von denen von Liers *et al.* beschriebenen unterscheiden, wurden erstere genauer charakterisiert (3.4).

Bei einem Vergleich der Laccase- und Peroxidaseaktivitäten bei Verwendung unterschiedlicher Induktoren lässt sich ersehen, dass die Wahl des Induktors entscheidenden Einfluss auf die Art und Konzentration der exprimierten Oxidoreduktasen hat. So zeigte z.B. der *Mgi* nur bei Induktion mit Lignin

und Tween 80 sowie mit Xylidin Laccaseaktivität. Im SNL-Medium konnte demgegenüber keinerlei Oxidoreduktaseaktivität detektiert werden.

Da die Verwendung von Xylidin aufgrund seiner Toxizität problematisch ist, wurde nach alternativen Induktoren gesucht. Diese Versuche wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit am Institut für Lebensmittelchemie durchgeführt (Wagner 2008).

3.1.2 Alternative Induktoren Ferulasäure, Ethanol und Eichenholzspäne

Als potenzielle Induktoren wurden Ethanol in den Konzentrationen von 2% (v/v) und 4% (v/v) bzw. ca. 0,3 M und 0,6 M sowie Ferulasäure in einer Konzentration von 0,25 und 0,50 mM ausgewählt. In einem weiteren Ansatz wurde das für Weißfäulepilze natürliche Substrat Eichenholz in Form von Spänen verwendet, welches die natürlichen Bedingungen für den Pilz, unter denen hunderte verschiedene Inhaltsstoffe und potentielle Induktoren auftreten können, eher abbildet (Liers *et al.* 2010) und somit eine breite Induktion von verschiedenen Oxidoreduktasen ermöglichen könnte.

Für diese Versuche wurden die drei bisher aktivsten Basidiomyceten *Haj*, *Ppi* und *Mgi* ausgewählt. Diese wurden erst in Vorkultur angezogen und anschließend in einer SNL-Hauptkultur mit Ethanol, Ferulasäure und Eichenholzspänen inkubiert. Für die Kultivierung mit Eichenholzspänen wurde zusätzlich eine Kultur in Minimalmedium (MM) durchgeführt, um den Effekt von Cellulose aus dem Eichenholz als einzige C- und Energiequelle nicht durch Glucose zu überdecken. Zum Vergleich wurde eine Hauptkultur mit 1 mM Xylidin als Induktor mitgeführt. Als universeller Induktor für Laccasen wurden 300 μM CuSO_4 zu jeder Kultur hinzugegeben und der Verlauf der Laccaseaktivität verfolgt. In Tab. 25 sind die maximalen Laccaseaktivitäten für die verwendeten Pilze dargestellt. *Phellinus pini* zeigte über die gesamte Kultivierung keine Laccaseaktivität.

Tab. 25: Maximale Laccaseaktivitäten in U mL^{-1} der untersuchten Kulturen mit verschiedenen Induktoren

Stamm	Xylidin (1 mM)	Ferulasäure (0,5 mM)	Ethanol	Eichenholz- späne in SNL	Eichenholzspäne in Minimalmedium
<i>Haj</i>	0,3	0,1	0,2 (4% (v/v))	0,5	0,3
<i>Mgi</i>	2,3	3,8	0,6 (2% (v/v))	1,8	0,9

Wie in der obigen Tabelle zu sehen, konnte durch Einsatz von Ferulasäure in einer Konzentration von 0,5 mM (Endkonzentration) als Induktor die Laccaseaktivität vom *Meripilus giganteus* nochmals gesteigert werden. Bei Verringerung der Ferulasäure auf 0,25 mM wurde nur ein leichter Rückgang der Aktivität festgestellt (ca. 8%, Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu Xylidin und Ferulasäure wurden unter Verwendung von Ethanol und Eichenholzspänen deutlich geringere Aktivitäten gemessen.

Aufgrund der geringeren Kosten des Ethanol könnte es gegenüber Xylidin und Ferulasäure eine Alternative zur Induktion von Laccasen darstellen. Bei der Induktion mit Ferulasäure oder Xylidin muss berücksichtigt werden, dass immer 1 mL Ethanol (Endkonzentration ca. 0,35% (v/v)) zur Kultur hinzugegeben wurde, was bereits in geringem Maße zu einer zusätzlichen Induktion geführt haben könnte.



Abb. 17: *Haj*-Kulturen in SNL-Medium mit 1 mM Xylidin (links), 0,5 M Ferulasäure (mitte) und 40 mL L⁻¹ Ethanol (rechts) nach 10 Tagen (Wagner 2008)

Der genaue Induktionsmechanismus von Ethanol, welches bereits erfolgreich zur deutlichen Verbesserung der Expression von Laccasen verwendet wurde (Lee *et al.* 1999; Lomascolo *et al.* 2003; Valeriano *et al.* 2009), ist noch nicht ausreichend geklärt. Folgende Hypothesen wurden dazu aufgestellt: (I) eine Erhöhung der Proteinsekretion durch Permeabilisierung der Membran, (II) Inhibierung der Melaninbildung und dadurch Erhöhung von phenolischen Monomeren, welches zu einer Induktion der Laccasen führt, (III) Antwort auf oxidativen Stress, welcher eine indirekte Induktion generiert (Lee *et al.* 1999; Meza *et al.* 2007). Durch Zudosierung von Ethanol zu einer *Pycnoporus cinnabarinus*-Kultur konnte eine Erhöhung der Laccaseaktivität bei gleichzeitiger Erniedrigung der Peptidaseaktivität detektiert werden. Da extrazelluläre Peptidasen in der Lage sind, Laccasen spezifisch zu degradieren, ist eine Hemmung der Peptidaseexpression durch Ethanol ein möglicher weiterer Faktor in der Erhöhung der Laccaseaktivität bei Induktion mit Ethanol (Meza *et al.* 2007). Des Weiteren wurde bei der homologen Expression einer Laccase in *Pycnoporus cinnabarinus* ohne nativen Promotor eine Induktion bei Zugabe von Ethanol beobachtet (Alves *et al.* 2004), was die Hypothese (II) einer indirekten Induktion durch eine Stressantwort bekräftigen würde. Phenolische Stoffe wie die Ferulasäure, welche eine ähnliche Struktur wie das natürliche Substrat Lignin bzw. deren Derivate besitzt, wurden erfolgreich zur Laccaseinduktion eingesetzt (De Souza *et al.* 2004; Leonowicz and Trojanowski 1978). Jedoch variierte die Induktion von Organismus zu Organismus, und es scheint für viele Stämme spezifische phenolische Induktoren zu geben (Piscitelli *et al.* 2011).

Bei Verwendung von Eichenholzspänen als Induktor konnte nur bei *Hirneola auricula-judae* eine Erhöhung der Laccaseaktivität auf 0,51 U mL⁻¹ beobachtet werden. Diese ist deutlich höher als die erhaltene Laccaseaktivität (0,02 U mL⁻¹) bei Induktion mit Buchenholzspänen (Liers *et al.* 2010). In

starkem Kontrast dazu konnten Morisaki *et al.* (2001) eine mit $4,99 \text{ U mL}^{-1}$ außerordentlich hohe Laccaseaktivität bei *Auricularia auricula-judae* durch Kultivierung in einem „potato dextrose“-Medium mit Hefeextrakt erzielen. Da jedoch nicht die gleichen Stämme (DSMZ 11326 gegenüber IFO 5949) verwendet wurden, kann keine definitive Aussage getroffen werden, ob ein anderer Stamm oder das Medium für die starke Abweichung in der Laccaseaktivität verantwortlich ist.

Bei der Untersuchung zur Peroxidaseinduktion wurden zusätzlich die Pilze *Pleurotus sapidus* und *Trametes sp.* mitgeführt. Zur Induktion wurden jedoch nur Eichenholzspäne verwendet, da beide Pilze in Vorversuchen mit Ethanol und Ferulasäure keine Peroxidaseaktivität zeigten. *Mgi* generierte in keinem Versuchsaufbau Peroxidaseaktivität. In Tab. 26 sind die maximal erreichten Aktivitäten während der Kultivierung dargestellt.

Tab. 26: Maximale Peroxidaseaktivität von Kulturüberständen von *Haj*, *Ppi*, *Psa* und *Tra*, induziert mit alternativen Induktoren

Stamm	Xylidin (1 mM)	Ferulasäure (0,5 mM)	Ethanol	Eichenholzspäne in SNL	Eichenholzspäne in Minimalmedium
<i>Haj</i>	28,44	1,86	10,17 (4% (v/v))	3,58	0,93
<i>Ppi</i>	0,87	0,21	0,31 (2% (v/v))	n.d.	n.d.
<i>Psa</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,03
<i>Tra</i>	n.d.	n.d.	n.d.	0,27	n.d.

Mit den alternativen Induktoren konnte bei *Haj* und *Ppi* keine Verbesserung der Peroxidaseaktivität detektiert werden. Gegenüber der Induktion von *Haj* mit Xylidin wurden nur wenig mehr als 30% der Aktivität erhalten. Dessen ungeachtet kann Ethanol als kostengünstige und lebensmitteltaugliche Alternative zur Induktion mit Xylidin angesehen werden. Durch Verwendung von Eichenholzspänen wurde erstmals bei dem Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* eine Expression von Peroxidasen nachgewiesen. Die geringe Aktivität des *Trametes sp.* könnte auch schon bei der Kultivierung mit den anderen Induktoren vorgelegen haben. Durch die sehr hohe Laccaseaktivität (Kreuzreaktion mit Phenolrot) könnte diese jedoch maskiert worden sein. Die Ergebnisse zeigen, dass Eichenholz ein vielseitiger Induktor für Peroxidase- und Laccaseaktivität ist, was sowohl den phenolischen Inhaltsstoffen des Holzes als auch der Tatsache geschuldet ist, dass der Pilz im Minimalmedium gezwungen wird, Oxidoreduktasen zu bilden, um die im Holz vorkommende Cellulose als C- und Energiequelle zu erschließen. Die Versuche mit den Basidiomyceten *Trichophyton rubrum* LKY-7 (Shin *et al.* 2010) und *Lentinus edodes* (Hatvani and Mács 2001) zeigten ebenfalls, dass durch Einsatz von Eichenholz eine Induktion von Laccasen und Peroxidasen erreicht werden kann.

Zusätzlich wurde versucht, durch Aktivitätsbestimmung gegenüber Veratryl-Alkohol und Azur B eine weitere Einteilung der Peroxidasen zu den Ligninperoxidasen und den versatilen Peroxidasen zu erreichen. Außer für den *Per*, welcher bereits als Produzent einer versatilen Peroxidase bekannt ist (Camarero *et al.* 1999), konnten jedoch keine Aktivitäten gegenüber den Substraten beobachtet werden, was an einer zu geringen Peroxidasekonzentration oder an störenden Inhaltsstoffen aus den induzierten Kulturen gelegen haben könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit Ethanol, Ferulasäure und Eichenholzspänen nicht nur neue oder deutlich höhere Laccase- und Peroxidaseaktivitäten generiert werden konnten, sondern diese auch als lebensmitteltauglichere und kostengünstigere Alternativen zum toxischen Xylidin angesehen werden können.

Mit den Pilzen *Meripilus giganteus* und *Hirneola auricula-judae* konnten gute Laccase- bzw. Peroxidaseproduzenten identifiziert werden, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit genauer charakterisiert wurden.

3.1.3 ITS-Sequenzierung *Mgi* und *Haj*

Die Basidiomyceten *Mgi* und *Haj* wurden über die ITS-Sequenz molekularbiologisch klassifiziert. Mit Hilfe dieser Sequenzen ist es möglich, Pilze eindeutig zu identifizieren, wenn die entsprechende Sequenz in einer Datenbank hinterlegt ist. Die Datenbanksuche erfolgte mittels BLAST. Die identische Sequenz wurde als „*uncultured fungus clone S41 18S ribosomal RNA gene*“ (GenBank: FJ820529.1) beschrieben. Eine in der Datenbank vorhandene ITS-Sequenz von einer anderen *Meripilus giganteus* Unterart (CBS 116.142) besitzt als fünftbester Treffer nur eine 85%ige Übereinstimmung. Somit konnte eine eindeutige Identifizierung noch nicht abschließend erfolgen.

Für *Haj* wurden nach Datenbanksuche zwei identische Sequenzen (100%ige Übereinstimmung, GenBank: HQ388368.1 und HQ388365.1) von zwei *Auricularia auricula-judae* (Synonym für *Hirneola auricula-judae*) Subspezies identifiziert. Somit kann dieser eindeutig als *Haj* klassifiziert werden.

Im nachfolgenden Kapitel wird die Aufreinigung und biochemische sowie molekularbiologische Charakterisierung der durch *Mgi* exprimierten Laccase in Form einer Veröffentlichung im *World Journal of Microbiology and Biotechnology* beschrieben.

3.2 A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus*

Gunnar Schmidt¹ · Ulrich Krings¹ · Manfred Nimtz² · Ralf G. Berger¹

Reprinted from World Journal of Microbiology and Biotechnology

Volume 28, Number 4 (2012), 1623-1632, DOI: 10.1007/s11274-011-0968-z

With kind permission from Springer Science+Business Media

¹Institut für Lebensmittelchemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Callinstraße 5, 30167 Hannover, Germany

²Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Germany

Abstract

A laccase (Lcc1) from the white-rot fungus *Meripilus giganteus* was purified with superior yields of 34% and 90% by conventional chromatography or by foam separation, respectively. Size exclusion chromatography (SEC) and sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) yielded a molecular mass of 55 kDa. The enzyme possessed an isoelectric point of 3.1 and was able to oxidize the common laccase substrate 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) at a pH of 2.0, whereas the enzyme was still able to oxidize ABTS and 2,6-dimethoxyphenol (DMP) at pH 6.0. Lcc1 exhibited low K_m values of 8 μM (ABTS) and 80 μM (DMP) and remarkable catalytic efficiency towards the non-phenolic substrate ABTS of 37,437 $\text{k}_{\text{cat}}/\text{k}_m$ ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$). The laccase showed a high stability towards high concentrations of various metal ions, EDTA and surfactants indicating a considerable biotechnological potential. Furthermore, Lcc1 exhibited an increased activity as well as a striking boost of stability in the presence of surfactants. Degenerated primers were deduced from peptide fragments. The complete coding sequence of *lcc1* was determined to 1,551 bp and confirmed *via* amplification of the 2,214 bp genomic sequence which included 12 introns. The deduced 516 amino acid (aa) sequence of the *lcc1* gene shared 82% identity and 90% similarity with a laccase from *Rigidoporus microporus*. The sequence data may aid theoretical studies and enzyme engineering efforts to create laccases with an improved stability towards metal ions and bipolar compounds.

Key words: Foam separation, Surfactants, Metal ions, Laccase, Basidiomycete

3.2.1 Introduction

Laccases (benzendiol: oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) represent the largest subgroup of blue multi-copper oxidases and have been described in plants (Bao *et al.* 1993), insects (Dittmer and Kanost 2010), archaee (Uthandi *et al.* 2010), bacteria (Sharma *et al.* 2007) and fungi (Baldrian 2006). Their wide-spread occurrence in fungi reflects diverse physiological roles including morphogenesis, fungal plant pathogen/host interaction, stress defense, and lignin degradation. Laccases from white rot fungi are the largest group with more than 100 representatives studied in more detail (Baldrian 2006). Fungal laccases are usually highly glycosylated monomeric, dimeric or tetrameric proteins (typically 55-85 kDa) with an isoelectric point around pH 4.0 (Baldrian 2006). Laccases catalyze the single-electron substrate oxidation coupled to the four-electron reduction of molecular oxygen to water. Four differently coordinated copper ions distributed over three copper centers are essential for the transfer of electrons.

Laccases are of interest for green chemistry because of their pronounced and rather non-specific oxidation capacity, the lack of a requirement for expensive cofactors and the use of O₂ as electron acceptor. They catalyze a wide range of reactions such as degradation of polymers, ring cleavage, oxyfunctionalization and cross-linking of aromatic compounds. The substrate range can be extended in the presence of mediators such as 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), or phenolic acids (Camarero *et al.* 2008). Potential industrial applications are the detoxification of waste streams, paper and pulp processing, bioremediation, dye decoloration, biosensors, and chemoenzymatic syntheses (Couto and Herrera 2006). In the food industry, laccases have been shown to improve sensory parameters, to stabilize beer and wine, and to strengthen dough structure in baked goods (Couto and Herrera 2006).

Surfactants are often used in low concentrations to increase the availability of substrates, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (Pozdnyakova *et al.* 2004), phenolic pollutants (Ji *et al.* 2009; Tonegawa *et al.* 2003) or pesticides (Hirai *et al.* 2004) to oxidative degradation by lignolytic enzymes. Another use of surfactants is the protection of enzymes from the reaction products during the oxidative degradation/polymerization of phenolic pollutants (Sakurai *et al.* 2003). Kim *et al.* (2007) showed that the non-ionic surfactant Tween 80 was able to protect horseradish peroxidase from free radical attack and adsorption by precipitated products during conversion of pentachlorophenol (PCP). However, there is no systematic study dealing with the influence of surfactants on laccase activity and/or stability.

The aim of the present study was the isolation, purification as well as the biochemical and molecular characterization of a laccase (Lcc1) from *Meripilus giganteus* (*M. giganteus*) which showed a high activity towards ABTS. Furthermore, the impact of ionic, non-ionic surfactants and the stability

towards various metals ions and inhibitors on the activity of Lcc1 was comparatively studied. To the best of our knowledge this is the first report of an oxidoreductase from *M. giganteus*.

3.2.2 Materials and Methods

Organism and cultivation

M. giganteus 561.86 an agaricomycetous fungus, was obtained from Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Netherlands). Mycelia were maintained on 1.5% agar plates with standard nutrient liquid medium (SNM) (Linke *et al.* 2005).

Production of laccase

Precultures of *M. giganteus* were prepared from a mycelial block (1 cm²) of a densely overgrown agar plate piece which was inoculated into a 300 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL SNM. After treatment with an Ultraturrax homogenizer (IKA-Werke, Staufen, Germany) the fungal culture was incubated for seven days at 150 rpm and 24°C. For the production of laccases, main cultures were prepared in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 250 mL SNM medium by transferring 25 mL of the pre-culture into each flask. The expression of laccases was induced by the addition of 0.5 mM ferulic acid and 300 µM CuSO₄ to the main cultures, which were then incubated at 150 rpm and 24°C. At the time of maximum laccase activity (ABTS, pH 4.5), cultivation was stopped and the culture supernatant was harvested for further purification. Media and equipment were autoclaved prior to use and sterile techniques were applied throughout the procedures.

Enzyme assays

Laccase activity was determined at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in a microtiter plate at 30°C using ABTS (Majcherczyk *et al.* 1999) as the substrate. The reaction mixture contained 0.5 mM substrate in 50 mM phosphate buffer at pH 3.0 and the enzyme solution in a total volume of 300 µL. The increase of absorbance was monitored over 5 min in a Biotek Synergy 2 Microplate reader (Biotek, Winooski, United States). One unit of enzyme activity was defined as 1 µmol of substrate oxidized per minute under the experimental conditions used. The protein concentration was estimated using Bradford Reagent (Sigma-Aldrich[®], Steinheim, Germany) and bovine serum albumin as a standard. All assays were performed in triplicate, and standard deviation was found below 10% if not stated otherwise.

Purification and gel electrophoresis

Culture supernatant was frozen at -20°C, thawed and centrifuged at 25,000g. The supernatant was filtered (0.45 µM, Chromafil[®] PET-45/25, Macherey-Nagel, Dueren, Germany), concentrated using cross-flow filtration (30 kDa cut-off, PES, Sartorius, Goettingen, Germany) and subjected to fast protein liquid chromatography (Biologic Duoflow[™], Bio-Rad, Hercules, United States) at 4°C. Aliquots of the concentrated solution were loaded on a HiPrep 16/10 diethylaminoethyl (DEAE) fast

flow column (GE Healthcare, Munich, Germany) pre-equilibrated with buffer A (acetate buffer, 50 mM, pH 5.0), and laccase was eluted with 15% buffer B (buffer A with 1 M NaCl). Laccase active fractions were pooled, concentrated using ultrafiltration (30 kDa cut off, Millipore, Billerica, United States) and loaded on a Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) column equilibrated with buffer A. Elution was performed with buffer A and laccase active fractions were pooled and used for laccase characterization. Determination of molecular mass was achieved after calibrating the Superdex 75 10/300 GL with LMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare). In addition, foaming of whole *M. giganteus* cultures was carried out as described previously (Linke *et al.* 2007) with slight modifications. In brief: pH 5.0, 60 mL min⁻¹ N₂-flow and 3 mM cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) for cross-flow filtrates and pH 3.6, 60 mL min⁻¹ N₂-flow and 5 mM CTAB for the submerged cultures. The resulting foam with the enriched laccase was broken under reduced pressure, diluted with buffer A, filtered (0.45 µM, Chromafil® PET-45/25) and subjected to further separation using anion exchange chromatography as described above.

SDS-PAGE was conducted in a Minigel-Twin (Biometra, Goettingen Germany) on a 12% polyacrylamide separation gel (Ahn *et al.* 2001). Samples were diluted in SDS-sample buffer (0.1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris/HCl) pH 6.8, 0.2 M dithiothreitol (DTT), 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue) and boiled for 10 min. For native-SDS-PAGE, samples were diluted in native loading buffer (0.05 M Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue) and directly applied to electrophoresis at 8°C. Proteins were stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg, Germany). Marker proteins from 10 to 250 kDa (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad) were used for molecular mass determination. Laccase activity staining was performed after native SDS-PAGE directly on the gel using an overlay of ABTS (5 mM in 100 mM sodium tartrate buffer pH 4.5). Isoelectric focusing (IEF) polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a Multiphor II system (GE Healthcare) using Servalyt™ Precotes™ precast gels with an immobilized pH gradient from 3.0 to 10.0 (Serva) for 3,500 V h (2,000 V, 6 mA, 12 W). The isoelectric point of Lcc1 was estimated using a protein test mixture from pI 3.0 to 10.0 (Serva). Gels were stained either with Coomassie, or an activity staining was carried out as described above.

Temperature and pH-Optima, enzyme kinetics, stability and inhibition

The pH dependence of the purified laccase was determined with ABTS or 2,6-dimethoxyphenol (DMP, $\epsilon_{469} = 27,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Shuttleworth *et al.* 1986) as substrates in 50 mM citric acid buffer (pH 2.0-7.0) over 5 min at 30°C. Incubation of the enzyme in 50 mM phosphate/tartrate/succinate buffers at 24°C was used to monitor pH stability. Temperature stability was tested in 50 mM phosphate/tartrate/succinate buffers at pH 6. Temperature optimum was determined using a spectrophotometer (UV-1650 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan). The temperature was controlled with a cryostat attached. Activity measurements were performed in 50 mM succinate buffer pH 5.5 and 0.5

mM DMP. Kinetic parameters were calculated from the initial oxidation rates of 2.0-50 μM ABTS and 10-500 μM DMP at 30°C and pH 3.0 and 5.5, respectively. K_m and V_{\max} values were calculated using Hanes-Woolf-transformation of the Michaelis-Menten equation. For calculation of k_{cat} the molecular mass was determined using denatured SDS-PAGE. The effect of potential inhibitors and surfactants on laccase activity in the ABTS-assay was evaluated after incubation of Lcc1 for 15 min in 50 mM phosphate buffer pH 3.0 and 30°C with various concentrations ranging from 10 μM to 333 μM depending on the respective substrate. For all measurements controls were carried out under identical conditions omitting substrate or enzyme, respectively.

Sequence fishing

The isolation of genomic DNA and total RNA from mycelium of *M. giganteus* as well as cDNA synthesis were carried out as described previously (Eisele *et al.* 2011). Degenerated primers LacP2_fw (GGCACBTTCCCNGGTCC) and LacP3_rev (GCRTCNGCNGTAGGGAA) were deduced from the known peptide sequences obtained from electrospray-tandem-MSⁿ (Eisele *et al.* 2011); wobbled bases were translated as follows: B=G,T,C; R=A,G; N=A,T,G,C. Polymerase chain reactions (PCR) were performed by mixing 2 μl 10x DreamTaqTM-buffer, 0.4 μl deoxyribonucleotides (dNTP) mix (10 mM each), 25 pmol forward primer, 25 pmol reverse primer, 1 U DreamTaqTM DNA Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), 1 μl ds cDNA and ddH₂O to 20 μl . Gradient PCR was performed in a MasterCycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) by incubating the reaction mixture at 95°C for 5 min, then for 23 cycles at 94°C for 60 s, (55-70°C, 60°C G = 10) for 60 s and 72°C for 60 s. Final elongation was performed at 72°C for 20 min. Cloning and sequencing of PCR fragments were performed as previously described (Eisele *et al.* 2011). In order to complete the sequence, specific primers *lcc1_rev* (ACACAACCATCGGGCCACGTA) and *lcc1_fw* (CACTTTCCTGGTCCCCTGGT) were derived from identified *lcc1* DNA fragments and paired with primers 5'PCR or 3'PCR, respectively. PCR's were carried out as stated above with an annealing temperature of 55°C and an elongation step of 1 min kb⁻¹ at 72°C.

Amplification of the complete genomic and *lcc1* sequence from genomic DNA and cDNA was achieved with primers *lcc1_5'* (ATGTCT TCTTTCTCGACTCTTTCTGTC) and *lcc1_3'* (GTTTAATGGTTCGGAATCAGCAAGAGC) and an annealing temperature of 58°C and an elongation step of 1 min kb⁻¹ at 72°C. The complete *lcc1* sequence was amplified, cloned and sequenced.

Analysis of DNA and amino acid sequences

Identification of the N-terminal signal sequence was carried out by analysis with Signal P 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Sequence homology was investigated through a GenBank data base search using BLAST (Eisele *et al.* 2011). Putative N and O-glycosylation sites were predicted by NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) and NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>), respectively. Molecular mass was calculated by Compute

pI/Mw (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html). Alignments of multiple amino acid sequences of Lcc1 and other laccase proteins were generated with ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Nucleotide sequence data deposition

The complete genomic DNA and mRNA sequences of the *lcc1* gene from *M. giganteus* were deposited in the GenBank database under the accession number FR668033.1.

3.2.3 Results

Production and purification of Lcc1

During an extended screening of white rot fungi, *M. giganteus* was found to produce high laccase activity when grown submerged in shake flasks containing SNM. Lignin, ferulic acid, 2,5-xylydine or ethanol increased the expression of Lcc1 compared to SNM medium containing the common laccase inducer copper sulfate (Table 1). Under all cultivation conditions no further isoenzymes were detected (Fig. 1c).

Table 1 Effect of various additives on Lcc1 production by *Meripilus giganteus* cultivated in SNM at 24°

Media (SNM and additives)*	Day of maximum activity [d]	Maximum activity [U mL ⁻¹]	Increased laccase production [fold]
None	9	0.11	1.00
Ethanol [2%]	13	0.30	3.00
Ethanol [4%]	13	0.54	5.00
Ferulic acid [0.25 mM]	11	3.18	28.00
Ferulic acid [0.50 mM]	11	3.76	33.00
2,5 Xylydine [1.00 mM]	7	2.29	20.00
Lignin [0.1%]	8	1.85	16.00

*all cultured were additionally induced with 300 µM copper sulfate

Ferulic acid at a concentration of 0.5 mM increased the laccase activity by a factor of 33 to result in a total of 3.8 U mL⁻¹. The laccase activity peaked after 8 days of cultivation. At this time the culture broth was harvested, filtered and concentrated *via* cross-flow filtration with a loss of 35% of total activity. Table 2 summarizes the purification process using anion exchange chromatography (IEX) and SEC as well as foam separation.

Active laccase was purified to electrophoretic purity using IEX and SEC (Fig. 1a). Lcc1 was enriched 75 times with an overall yield of 34% and a specific activity of 440 U mg⁻¹. Foam fractionation, another method for the separation of active laccases (Linke and Berger 2011), was applied to a concentrated cell-free culture liquid of *M. giganteus*. After addition of 3 mM CTAB to 140 mL concentrate, Lcc1 was exhaustively foamed using N₂ at a flow of 60 mL min⁻¹ under maintenance of 95% of the activity (data not shown). Through this purification step, the majority of foreign protein was removed (Fig. 1b). Additionally, a direct foaming of Lcc1 out of the crude culture solution (pH 3.6) was performed. With the CTAB concentration increased to 5 mM, Lcc1 was enriched within 1 h with a recovery rate of 95% of the initial activity. Removal of residual CTAB and impurities (polyphenols and foreign protein) was achieved by IEX of the foamate. Lcc1 with a specific activity of 305 U mg⁻¹ and a recovery of 90% of the initial activity was obtained with an overall purification factor of 52. Due to the interference of CTAB with the determination of the protein content, specific activity had to be calculated for the combined foaming plus IEX.

Table 2 Purification of the laccase from *Meripilus giganteus*

Purification step	Protein (mg mL ⁻¹)	Activity (U mL ⁻¹)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Yield (%)	Purification factor (fold)
Supernatant	0.23	1.37	5.88	100.00	1.0
Cross-flow filtration	0.16	7.15	44.75	65.21	7.6
IEX	0.02	5.16	258.04	51.79	43.9
SEC	0.17	72.98	440.10	33.56	74.9
Foam separation plus IEX*	0.01	2.89	304.90	89.91	51.9

* Lcc1 was directly foamed out of the pellet culture

Characterization of Lcc1

The following investigations were carried out with a purified Lcc1 (IEX and SEC) stored at 4°C. The molecular mass of Lcc1 was determined to be 55 kDa by denaturated SDS-PAGE, and 56 kDa by SEC, respectively. IEF showed an isoelectric point of 3.1 for the native laccase (Fig. 1c).

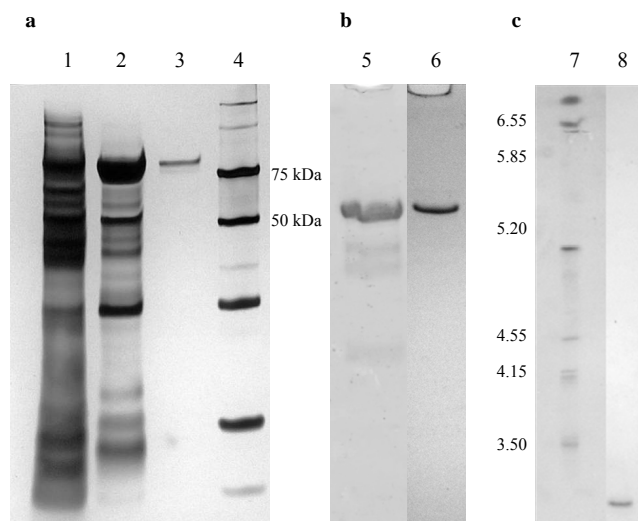


Fig. 1 Purification steps of Lcc1 of *Meripilus giganteus*. Coomassie stained denatured (a) or native (b) SDS-PAGE and IEF gel (c): concentrated culture broth (1), (1) after IEX (2), purified Lcc1 after IEX and SEC (3), Precision Plus Protein™ Standards (4), foam fraction of concentrated culture broth (5), IEX of foam fraction (6), IEF Marker pI 3-10 (7), culture broth activity stained with ABTS (8). Numbers refer to molecular masses (kDa, a and b) or the pH (c)

Lcc1 oxidized ABTS and DMP over a broad pH range from 2.0 to 6.5. Maximum activity was obtained for ABTS at pH 2.0 (lowest pH tested) and 4.0-4.5 for DMP, respectively (Fig. 2).

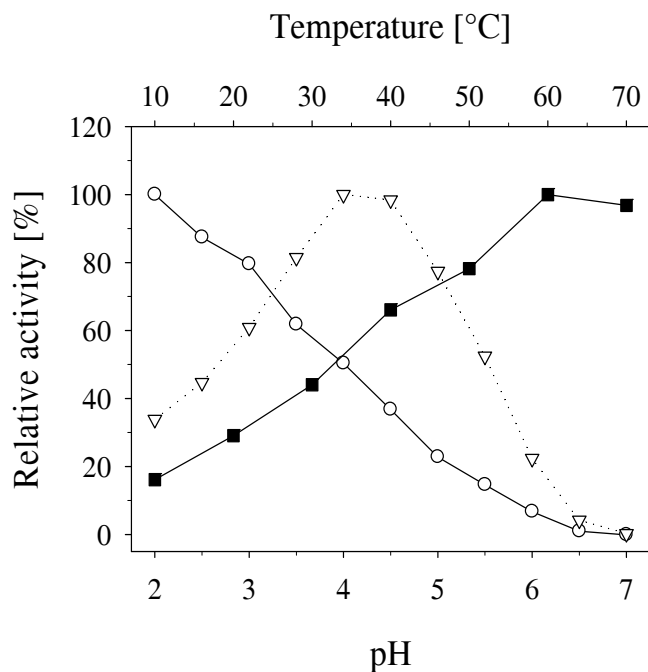


Fig. 2 Temperature optimum of Lcc1 (pH 3.0, ABTS, filled square) and effect of pH at 30°C on the oxidation of ABTS (open circle) and DMP (open inverted triangle), respectively

At pH 6.0, about 7.0% or 22% of the maximum oxidation rate was observed for ABTS or DMP. For both substrates the dependence of substrate concentration on the reaction rate showed Michaelis-Menten kinetics. Kinetic parameters were compared to literature data (Table 3). Lcc1 showed a high activity towards both tested substrates with a higher K_m value for DMP. ABTS was the most efficiently converted substrate with a k_{cat}/K_m ratio of $37,437 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

At 24°C Lcc1 was most stable at pH 7.0, retaining 40% of residual activity after 24.5 h of incubation, less stable at pH 6.0 and 5.0 with about 32 and 12% of the initial activity, and was completely inactivated within 24.5 h at $\text{pH} \leq 4.0$. A temperature optimum of $60\text{--}65^\circ\text{C}$ at pH 5.5 was determined (Fig. 2). After incubation of Lcc1 at 24, 30 and 45°C for 24.5 h at pH 6, residual activities of 32, 21 and 9% were recovered. Lcc1 was completely inactivated after 24.5 h at 60°C . Approximately half of the initial activity was recovered after 90, 60, 30 and 20 min at 24, 30, 45°C and 60°C , respectively (data not shown).

Effects of inhibitors on the activity of Lcc1

Inhibition of Lcc1 by metal ions (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}), EDTA, NaCl and the common laccase inhibitor sodium azide was examined. For concentrations up to 50 mM, none of the metal ions (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) showed significant inhibitory effects; only Cu^{2+} gave a 21% increase of Lcc1 activity at a concentration of 10 mM. Exemplarily, the weak effect of Mn^{2+} (MnSO_4) on laccase activity is shown in Fig. 3.

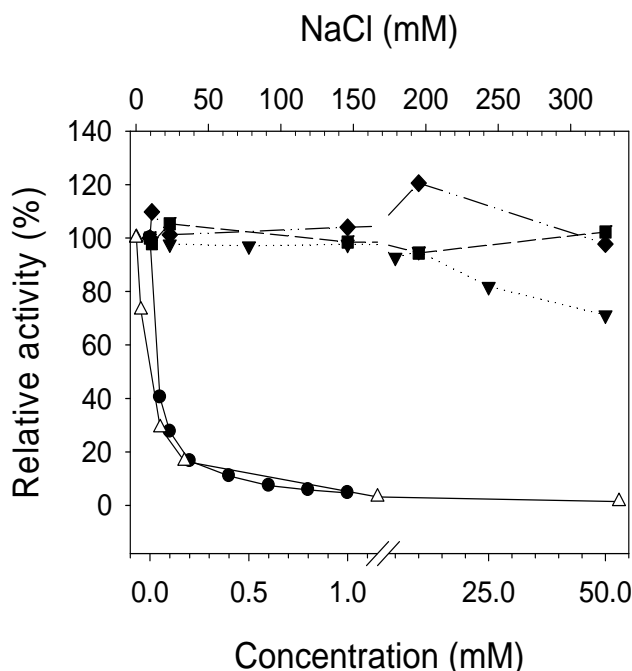


Fig. 3 Inhibition of Lcc1 at pH 3 and 30°C with NaN_3 (filled circle), EDTA (filled inverted triangle), MnSO_4 (filled square), CuSO_4 (filled diamond) and NaCl (open triangle). All concentrations except for NaCl (secondary axes) refer to the primary axes

Sodium azide proved to be an efficient inhibitor of Lcc1 lowering the activity by 60% at 50 μ M and inhibiting Lcc1 activity at 1 mM completely (Fig. 3). In contrast, Lcc1 tolerated elevated concentrations of EDTA and retained 71% of the initial activity at 50 mM. Chloride ions had a strong inhibitory effect; only 73% of the initial activity remained at 3.3 mM (Fig. 3).

Effects of surfactants on the activity of Lcc1

The effect of the presence of Tween 20, Tween 80, Triton X-100, *N*-lauroylsarcosin (NLS), CTAB, desoxycholic acid (DOC) and SDS was investigated. To calculate relative activities, the actual activity without surfactant under the same experimental conditions (15 min, pH 3.0, 30°C) was set to 100%. Among all surfactants tested, solely SDS at concentrations higher than 0.1 mM showed an inhibition of Lcc1, whereas non-ionic surfactants, such as Tween 20, Tween 80 or Triton-X-100, significantly increased the activity, up to 210% in the case of Tween 20 (Fig. 4). The addition of CTAB and DOC was limited to a maximal concentration of 0.1 mM due to their low solubility under the conditions used. Even at these low concentrations, CTAB (0.01-0.1 mM), the foaming agent, DOC (0.01 mM) and NLS (0.1-10 mM) were found to increase the residual activity of Lcc1 up to 200, 174 and 176%, respectively (Fig. 4).

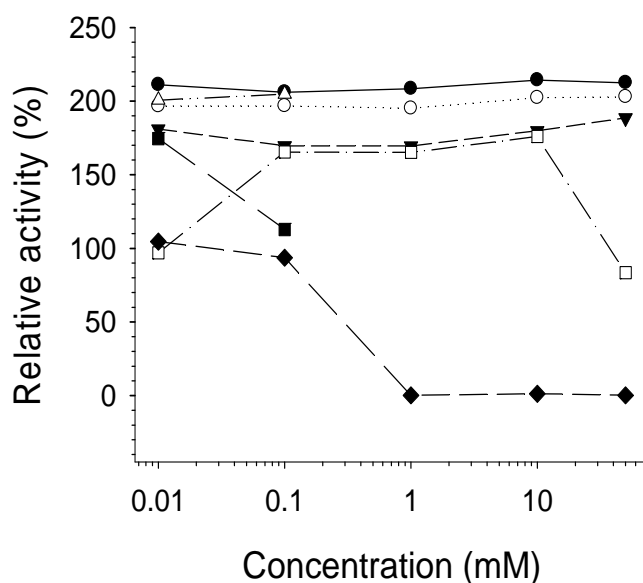


Fig. 4 Impact of the surfactants Tween 20 (filled circle), Tween 80 (open circle), Triton-X100 (filled inverted triangle), CTAB (open triangle), DOC (filled square), NLS (open square) and SDS (filled diamond) on Lcc1 activity at pH 3 and 30°C. Activity was normalized to the activity without surfactant

Furthermore, the stability of Lcc1 over time in the presence of the respective surfactant (0.01 mM) was investigated at 30°C and pH 3.0 or pH 5.0 (Fig. 5a and 5b). Whereas SDS and NLS were inactive,

a dramatic improvement of the stability of Lcc1 was observed in the presence of Tween 20, Tween 80, Triton X-100, DOC and CTAB. The half life of enzyme activity was increased approximately five or 24 times at pH 3.0 and pH 5.0, respectively. While 20% and 50% of the residual activity was still observed after incubation for 7 h at pH 3.0 or 24 h at pH 5.0 in the presence of surfactants, Lcc1 was completely inactivated after 5 h (pH 3.0) and 7.5 h (pH 5.0) when incubated without surfactant or with SDS. A weak effect of NLS on the stability of Lcc1 was observed at 0.01 mM.

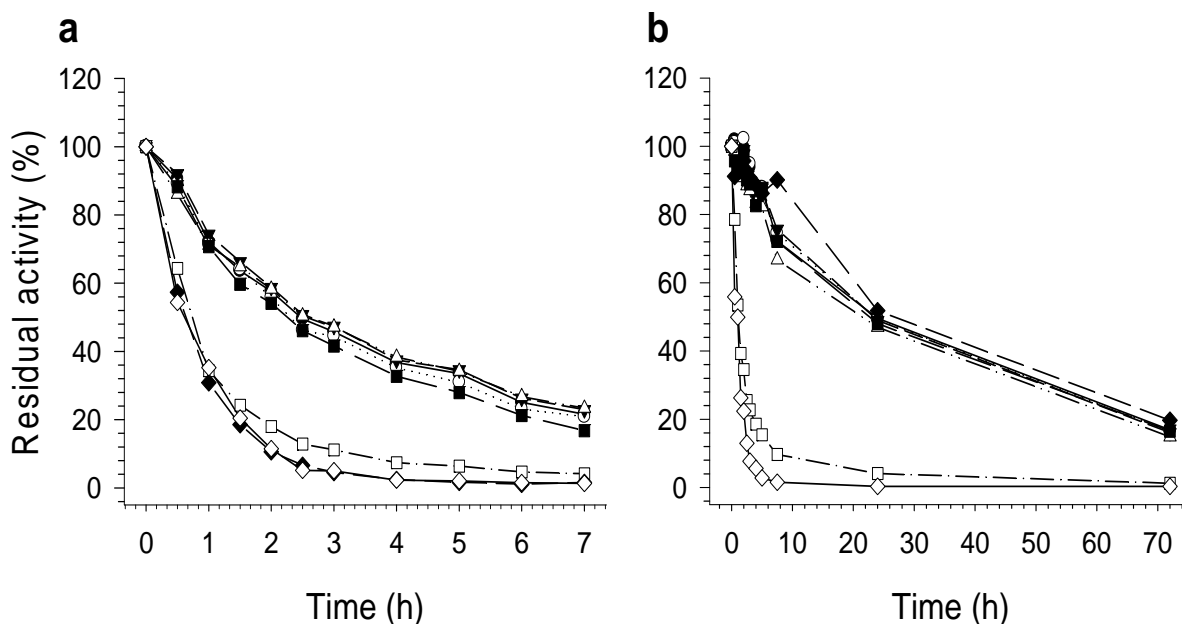


Fig. 5 Lcc1 stability at pH 3 (a) and pH 5 (b) at 30°C in buffer (open diamond) or in the presence of 0.01 mM Tween 20 (filled circle), Tween 80 (open circle), Triton-X100 (filled inverted triangle), CTAB (open triangle), DOC (filled square), NLS (open square) and SDS (filled diamond). Activity was normalized to the activity at t_0 (a,b); (b) SDS was replaced by 10 mM Tween 80

Cloning and genetic characterization of Lcc1

The following amino acid sequences of the purified laccase were obtained by electrospray-tandem-MSⁿ: AVGPVTDLPLTNANLSPDGFTR (P1), AAVLAGGTFPGPLVSGNK (P2), FPTADATLLNGLGR (P3), ANPNLGTTGFSGGLNSALLR (P4). Degenerated primers LacP2_fw and LacP3_rev, which were deduced from sequenced Lcc1 peptides, enabled the successful amplification of a 417 bp product which was identified by BLAST search as a gene fragment typically found in laccases. Highest homology was found to a laccase of *Cerrena* sp. WR1 (accession number: ACZ58368). The combinations of primer Lcc1_rev and Lcc1_fw, derived from a 414 bp fragment, with primer 5'PCR and 3'PCR, respectively, resulted in the amplification of the missing sequence fragments. The length of the complete coding sequence of *lcc1* was 1,551 bp which was confirmed via amplification of the 2,214 bp genomic sequence which included 12 introns, with primers Lac_5' and Lac_3'. The full *lcc1* sequence possessed the highest homology to a laccase from *Rigidoporus*

microporus (accession number ACL93333.1) with 82% identity and 90% similarity. Both species belong to the order Polyporales. At the N-terminus of the deduced 516 amino acid (aa) sequence a cleavage site AFA-AV between aa 20 and 21 was identified indicating a 21 aa signal sequence (Fig. 6). The molecular mass of the mature protein was calculated to be 52.7 kDa. Four potential N-glycosylation sites were identified at positions 154, 398, 453, and 490 following the pattern of Asn-X-Ser/Thr. In addition, seven putative sites for O-glycosylation, 311, 312, 315, 322, 327, 369, and 494 were found. The peptide sequence of fungal laccases shows four ungapped highly conserved sequence regions, L1-L4 in which the 12 amino acids acting as copper ligands are located (Giardina *et al.* 2010). In Fig. 6 Lcc1 was aligned with the two high redox potential laccases Tv1 Lcc1 of *Trametes villosa* (accession number: AAC41686), to Rlg1V10 of *Rigidoporus lignosus* (accession number: CAE81289) and to the mid potential laccase CcL1A65 of *Coprinus cinerea* (accession number: AAD30964).

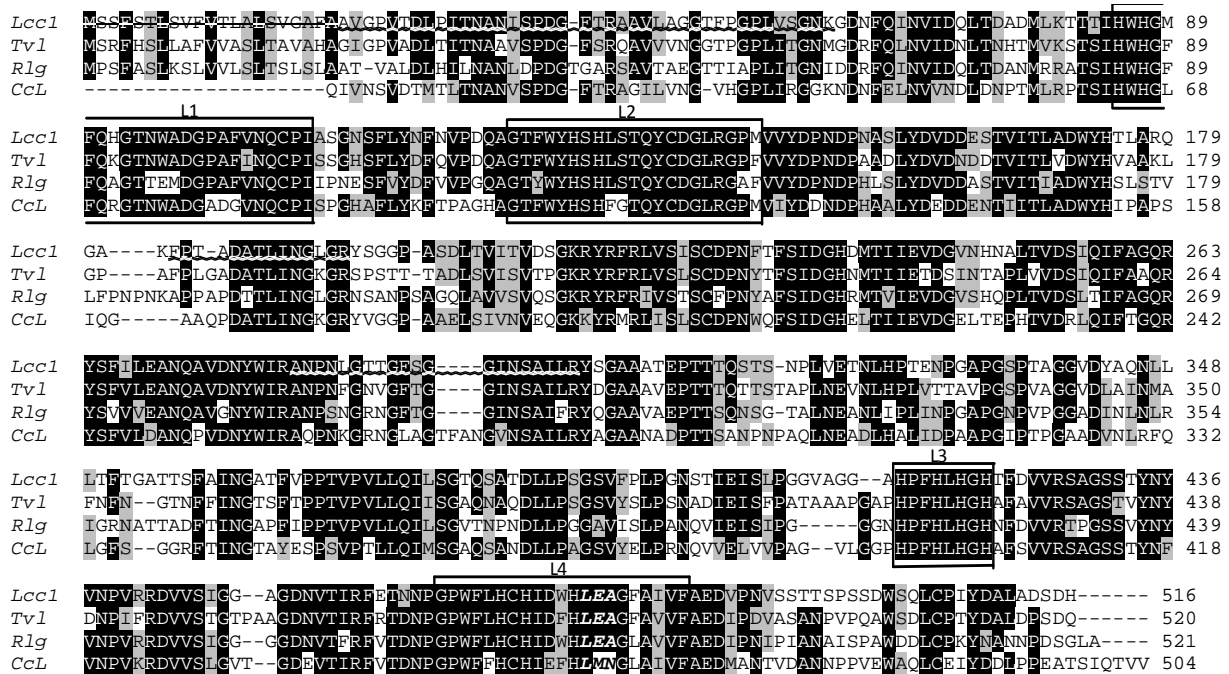


Fig. 6 Lcc1 alignment: Alignment of Lcc1 (present work, CBV46340), *Trametes villosa* (AAC41686), *Rigidoporus lignosus* (CAE81289) and *Coprinus cinerea* (AAD30964). Signal peptide (cross out), internal peptides (underlined), laccase conserved domains L1-L4 (in brackets) as well as the Leu-Glu-Ala triad (bold italic) are marked

3.2.4 Discussion

Lcc1, secreted by *M. giganteus* into the liquid culture medium, was purified, biochemically characterized and the structural gene sequenced. As reported for other white-rot fungi including *Pholiota mutabilis*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* (Leonowicz and Trojanowski 1978), laccase production was greatly enhanced after induction with ferulic acid. Detoxification of natural

phenols through cross-linking might explain the increased laccase expression in the presence of ferulic acid (Thurston 1994).

Lcc1 was purified either classically by chromatography (IEX and SEC), or by foaming (Table 2). As previously shown, foaming presents an efficient, up-scalable and environmentally compatible method for the purification of certain enzymes from diluted aqueous solutions (Linke *et al.* 2007). In this work, the anionic surfactant CTAB was used as the foaming agent. In contrast to a previous report (Walker and McCallion 1980), Lcc1 activity was not adversely affected but rather improved under conditions used. While the pre-purified cross-flow filtrate of *M. giganteus* was foamable using 3 mM of CTAB, the CTAB concentration required for foaming of the crude culture broths had to be raised to 5 mM to achieve a stable foam. Most likely, the free CTAB concentration was reduced by interactions with other proteins and polyphenols in culture supernatants. Addition of CTAB to crude culture broth of *M. giganteus* even increased laccase activity. Either a facilitated release of mycelia associated active enzyme, or a conformational stabilization may have contributed to this observation. Foaming enabled the fast purification of Lcc1 with superior recoveries without prior pre-treatment of the crude fungal culture broth (90% total recovery). A slightly lower purity compared to the conventional consecutive purification (IEX, SEC) might not affect its usefulness in some industrial applications.

The molecular mass of Lcc1 (55 kDa) as well as the isoelectric point are in the lower range reported for fungal laccases (Baldrian 2006). There was a gap in molecular mass of Lcc1 determined either using SEC or SDS-PAGE or calculated from the aa sequence. The difference in the molecular mass can most likely be ascribed to glycosylation, as several C and N glycosylation sites have been found within the aa sequence. In contrast to other laccases, Lcc1 exhibited an activity optimum towards ABTS at an unusually acidic pH of 2.0. For a laccase of *Agaricus blazei* (Ullrich *et al.* 2005) a comparably low pH optima of 2.3 was reported. The higher pH optimum of Lcc1 towards DMP is owed to the fact that DMP requires deprotonation in order to bind in the substrate pocket. Thus activity decreased with lowering pH while the oxidation of ABTS was pH independent (Giardina *et al.* 2010).

Lcc1 exhibited low K_m values for both substrates, and the catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) was among the highest reported for ABTS as the substrate (Table 3). The temperature optimum of 60-70°C was in the upper range reported for fungal origins (Baldrian 2006). Lcc1 was most stable at 24°C, but activity declined rapidly when incubated at temperatures above 30°C. The stability of Lcc1 increased with increasing pH values, reaching the highest stability at pH 7.0.

Table 3 Kinetic parameters of the purified laccase of *Meripilus giganteus* at 30°C towards ABTS (pH 3.0) and DMP (pH 5.5) as compared to other laccases

Laccase source	Substrates	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/k_m ($\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	Reference
<i>Meripilus giganteus</i>	ABTS	17	546	37,437	Present work
	DMP	80	101	1,259	
<i>Trametes pubescens</i>	ABTS	14	690	48,000	(Galhaup <i>et al.</i> 2002a)
	DMP	72	400	5,600	
<i>Galerina sp.</i>	ABTS	14	592	42,286	(Ibrahim <i>et al.</i> 2011)
<i>Phoma sp.</i>	ABTS	8	10.6	1,252	(Junghanns <i>et al.</i> 2009)
	DMP	266	4.3	16	
<i>Agaricus blazei</i>	ABTS	63	21	340	(Ullrich <i>et al.</i> 2005)
	DMP	1026	15	14	
<i>Bacillus licheniformis</i>	ABTS	6.5	83	12,769	(Koschorreck <i>et al.</i> 2008a)
	DMP	56.7	28	494	

There is only limited information on the interaction of metal ions with laccases. In view of possible environmental applications of Lcc1, the high stability in the presence of metal ions as well as the increased activity by supplementation with Cu^{2+} (Fig. 3) are remarkable. In contrast, a laccase from *Galerina sp.* (Ibrahim *et al.* 2011) was inhibited in the presence of 0.1 mM Mn^{2+} and Cu^{2+} by 67 and 40%, respectively.

Complete inhibition of laccases by NaN_3 in the range from 0.01 mM (Ibrahim *et al.* 2011) to more than 15 mM (Junghanns *et al.* 2009) was reported. This applied as well to Lcc1 which was completely inhibited by 1 mM NaN_3 . Contradictory reports exist on the influence of chloride ions on laccase activity with IC_{50} values (the concentration of an inhibitor causing a reduction of 50% activity) ranging from 0.05 mM to 600 mM (Xu 1996). A 50% inhibition at around 8 mM chloride was determined for Lcc1, whereas the stability of Lcc1 towards EDTA was superior compared to others. Inhibition of two laccases by EDTA was 50% at 19 mM for a *Phoma sp.* (Junghanns *et al.* 2009) and 67% at 1 mM for a *Galerina sp.* (Ibrahim *et al.* 2011). The data suggest that the Cu^{2+} centers in Lcc1

are particularly well shielded by the surrounding substituents, another property favoring environmental applications. The low bias of Lcc1 to bind or exchange metal ions (except Cu^{2+}) is in line with this suggestion.

Lcc1 not only exhibited an extraordinary stability in the presence of the non-ionic surfactants Tween 20, Tween 80, Triton-X-100 as well as the anionic surfactant DOC and cationic surfactant CTAB, but showed a significant increase of enzyme activity (Fig. 4). The increase in activity of up to 200% may partly be traced back to the vast increase in stability under the experimental conditions used. Surfactants, such as Tween 20, Tween 80 and Triton X-100 are often used in millimolar concentrations to increase substrate availability to enzymes. However, there are few reports dealing with the influence of surfactants on laccase activity and/or stability. The presence of 0.3% Merspol, a non-ionic polyethylene oxide surfactant used in the textile industry, showed no significant effect on the oxidation of ABTS while the rate of Reactive blue 19 decolorization was decreased by 80% using *T. versicolor* laccase (Champagne *et al.* 2010). For a laccase of *C. subvermispora* (Elegir *et al.* 2005) a slight increase in stability upon addition of 1% Tween 80 was reported. The stability of a yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 was enhanced by addition of 2 mM Tween 80 in the presence of 1% acetonitrile, but a 25% inhibition of activity was reported at a concentration of 5 mM Tween 80 (Pozdnyakova *et al.* 2004). In contrast, Lcc1 showed a remarkable tolerance towards surfactants up to 50 mM.

The oxidative removal of phenolic pollutants by laccases may be a potential application of surfactants. An enhanced removal of phenol by a laccase of *Trametes versicolor* was reported when the anionic biosurfactant dirhamnolipid was present, while CTAB and SDS inhibited the removal of phenol (Liu *et al.* 2011). Furthermore an improved laccase catalyzed conversion of bisphenol A was obtained due to a striking increase of stability when Triton X-100 was added to the reaction mixture (Ji *et al.* 2009). The authors suggest that the increase of stability originated from the interaction between the monomers or pre-micelles of Triton X-100 and the respective laccase, which supports the enzyme to maintain the optimal folding state or to prevent the enzyme from the attack of intermediate free radicals and adsorption of oxidative polymerization products. Supported by fluorescence emission spectra in the presence of Triton X-100, it was assumed that the exposure of the hydrophobic amino acid residues to a less polar environment or the burying into the inner part of the enzyme are beneficial for correct folding and stabilization of the respective laccase (Ji *et al.* 2009). In the present study not only non-ionic, but also anionic and cationic surfactants led to an enhanced stability of Lcc1. Co-crystallisation and X-ray analysis might help to fully understand the effect of bipolar reagents on these bipolar enzymes.

The sequence data obtained for Lcc1 (Fig. 6) not only allow future enzyme engineering, but also to confirm predicted structure-activity relationships. The tenth aa downstream of the T1 copper coordinating two His and one Cys residues was claimed to possess a major effect on the redox

potential. With Phe in position 480 of Lcc1 a high redox potential-type enzyme was expected (Eggert *et al.* 1998). Based on the three possible amino acids at this positions laccases are classified into class 1 (Met), 2 (Leu) and 3 (Phe). The high redox potential (0.73 mV) of Rlg1V10 (Bonomo *et al.* 1998) with Leu at this position showed that not only Phe contributes to the redox potential (Giardina *et al.* 2010). The Phe residue together with the “Leu-Glu-Ala” triad, considered to be important as well (Xu *et al.* 1998), suggest that Lcc1 is a high potential laccase.

In summary, *lcc1* from *M. giganteus* was purified with superior yields by conventional chromatography or by foam separation, an underestimated but efficient method for the isolation of laccases. The purified laccase exhibited remarkable kinetic properties with the non-phenolic substrate ABTS, high stability towards metal ions and EDTA, and was stabilized as well as activated by various surfactants. The sequence data may aid theoretical studies and enzyme engineering efforts to create laccases with an improve stability towards metal ions and bipolar compounds.

Acknowledgements

Supported by the BMBF-Cluster Biokatalyse2021 and the Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (Bonn) through AIF and BMWi (AIF 15305 N, Oxidoreductases from Edible Mushrooms to Improve Bakery Goods).

3.3 Heterologe Expression der Lcc1 in *E.coli*

3.3.1 Expression im pCOLDI-System

Da für die industrielle Anwendung die Bereitstellung von großen Mengen an kostengünstigen Laccasepräparationen unabdingbar ist, wurde die heterologe Expression von Lcc1 in *E.coli* angestrebt. Dies könnte auch die Möglichkeit eröffnen, die Eigenschaften des Enzyms durch Mutagenese zu verbessern und den technischen Anforderungen anzupassen (*protein engineering*). Abseits von den meistens genutzten Expressionssystemen wie Hefen und filamentösen Pilzen wurde eruiert, inwieweit eine Expression der Lcc1 im prokaryotischen Wirt *E.coli* realisierbar ist. Dafür sollte ein Kälteschockexpressionssystem (pCOLD) eingesetzt werden, welches bereits für eine erfolgreiche Expression einer DyP aus *Marasmius scorodoni* (Zelena *et al.* 2011b) verwendet wurde.

Eine Kultivierung bei verringerter Temperatur kann die Löslichkeit des Zielproteins erhöhen und damit die Bildung von *inclusion bodies* signifikant verringern (Shirano and Shibata 1990; Spadiut *et al.* 2010; Yamanaka 1999). Dabei steht die Expression im pCOLD-Vektor, welcher auf der Basis des pUC118-Vektors designt wurde, unter Kontrolle des Kälteschock-Promotors *cspA* (Qing *et al.* 2004). Durch eine signifikante Erniedrigung der Kultivierungstemperatur von *E.coli* (z.B. 8 °C) findet ein temporärer Stopp des Zellwachstums und eine massive Verringerung der meisten Proteinexpressionen statt, während durch *cspA*-Promotoren regulierte „Kälteschockproteine“ induziert werden. Dies führt zu einer selektiven Expression des Zielproteins bei verringerter Expression der *E.coli*-eigenen Proteine. Ein Lac-Operator hinter dem *cspA*-Promotor ermöglicht zudem eine strikte Kontrolle der Expression (Qing *et al.* 2004).

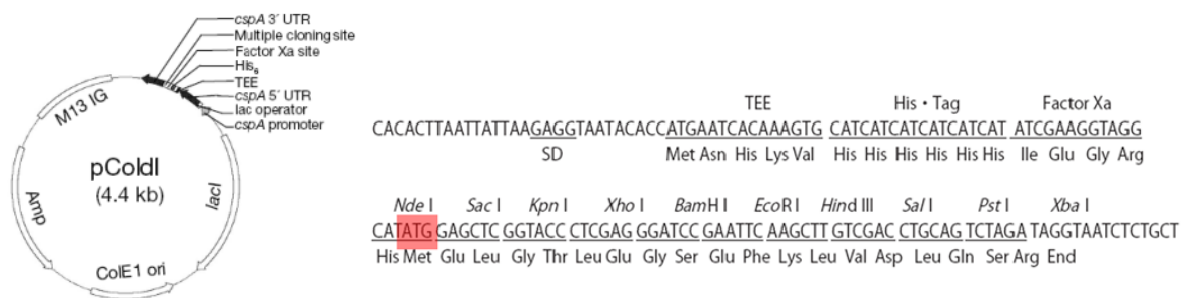


Abb. 18: Übersicht des pCOLDI-Plasmides und der MCS des pCOLDI-Vektors (Clontech 2011), in dem rot markierten Bereich wurde das *lcc1*-Gen eingefügt

Für die rekombinante Expression der *Meripilus giganteus* Laccase wurde der pCOLDI-Vektor ausgewählt. Das dabei nach Expression entstehende rekombinante Protein ist ein Fusionsprotein mit einem

N-terminalen 6 x His-Tag gefolgt von einer Faktor Xa Schnittstelle. Der His-Tag sollte eine spätere Aufreinigung über eine Affinitätschromatographie ermöglichen.

Für die Herstellung des Expressionskonstruktes wurde das amplifizierte *lcc1*-Gen in den pCR2.1 Vektor subkloniert und anschließend sequenziert. Als Insert wurde die vollständige kodierende *lcc1*-Sequenz inklusive Signalpeptid verwendet. Nach Vergleich aller sequenzierten Klone untereinander und mit der genomischen Sequenz konnte kein Klon ohne mindestens eine Mutation, welche wahrscheinlich während der cDNA-Synthese eingefügt worden sind, identifiziert werden. Die Mutation wurde durch eine PCR, bei der eine *Taq*-Polymerase mit Fehlerkorrektur verwendet wurde, nach dem Prinzip des *rolling circles* rückgängig gemacht. Nach erfolgter Überprüfung der Sequenz wurden das fehlerfreie *lcc1*-Gen (*accession number*: FR668033.1) für die Herstellung des Expressionsvektors pCOLDI-*lcc1* verwendet und in den Klonierungs- und Expressionsstamm *E.coli* TOP10 transformiert. Eine erfolgreiche Transformation des Expressionskonstruktes wurde sowohl durch Kolonien-PCR als auch durch Kontroll-Verdau mit *NdeI* und *EcoRI* verifiziert. Als Negativkontrolle dienten *E.coli* TOP10-Zellen mit pCOLDI-Vektor ohne Insert. Nach erfolgter Expression der Lcc1 mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen von 0-1 mM bei 8 °C wurde das Expressionsmuster mittels denat. SDS-PAGE der unlöslichen und löslichen Fraktion untersucht (Abb. 19). Zu allen Expressionsversuchen wurde 100 µM CuSO₄ zugesetzt, um einen posttranslationalen Einbau von Cu²⁺-Ionen zu stimulieren (Hoshida *et al.* 2005).

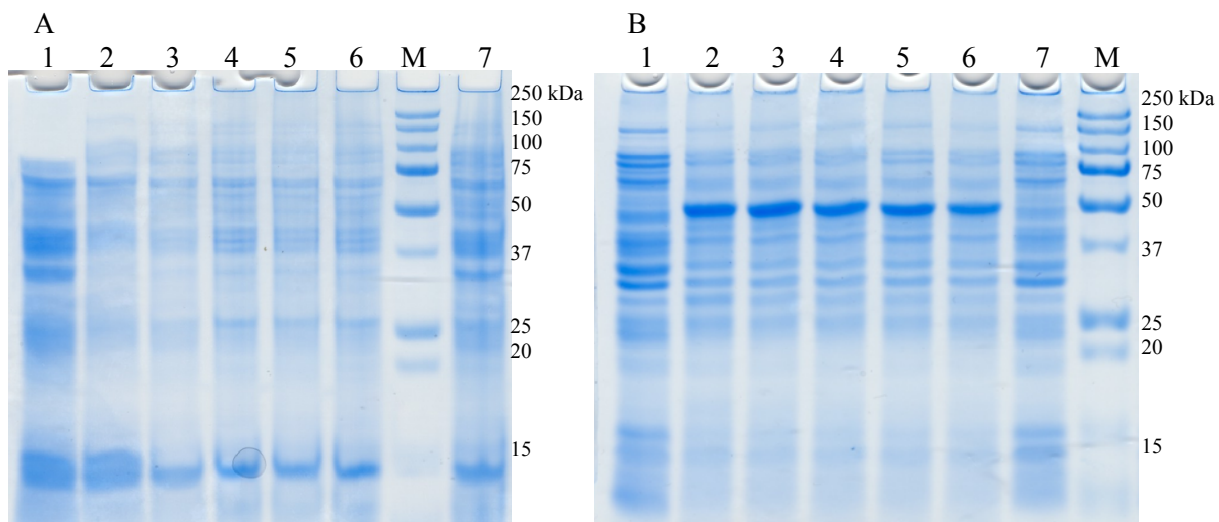


Abb. 19: SDS-PAGE und Coomassiefärbung der löslichen (A) und unlöslichen (B) Fraktionen nach Expression der rek. Lcc1 in *E.coli* TOP10-Zellen induziert mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen und Supplementierung mit 100 µM CuSO₄; M: Biorad Precision Plus Proteinstandard, (1-6): pCOLD-*lcc1* induziert mit entsprechend 0,0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 mM IPTG, (7): pCOLD Negativkontrolle induziert mit 0,5 mM IPTG

Die rek. Lcc1, welche ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 55-56 kDa besitzt, wurde unabhängig von der gewählten IPTG-Konzentration ausschließlich als unlösliche *inclusion bodies* exprimiert. Da die Auswahl des Expressionswirtes maßgeblichen Einfluss auf die Expressionsrate und Bildung von *inclusion bodies* haben kann, wurde versucht, die Expression durch Verwendung von weiteren *E.coli*-Stämmen (Tab. 27) zu optimieren.

Tab. 27: Vorteile der zusätzlich verwendeten *E.coli*-Stämme gegenüber dem TOP10-Stamm

Stamm	Eigenschaften
BI21 DE3	Expression der T7 Polymerase unter Kontrolle lacUV5 Promotors, höhere Expression falls T7-Promotor verwendet wird, defizient in zwei Peptidasen (Lon und OmpT), (Invitrogen 2011b)
BI21 DE3 Star™	wie BI21 DE3, geringere mRNA Degradation durch Mutation des RNaseE-Genes, (Invitrogen 2011a)
Rosetta-Gami B	wie BI21 DE3 (ohne T7 Polymerase), Mutationen in Thioredoxin Reduktase-Gen (<i>trxB</i>) und Gluthathione Reduktase-Gen (<i>gor</i>), welches in einer erhöhten Bildung von Disulfidbindungen der Zielproteine im Cytoplasma führt, höhere Bereitstellung von sechs seltenen tRNAs für die Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA, Mutation in der Lac-Permease für eine bessere Diffusion von IPTG in die Zellen (Novagen 2011)
Shuffle 3026H	exprimiert konstitutiv die Disulfidbindungs-Isomerase DsbC, welche zu einer verbesserten Ausbildung von Disulfidbindungen führt (New-England-Biolabs® 2011)

Der Rosetta-Gami B-Stamm versprach die beste Expression, da 16-mal das Triplet CCC, welches für Prolin kodiert, im *lcc1*-Gen vorkommt und bei einer geringen Verfügbarkeit der entsprechenden tRNA bei einer hohen Expression limitieren kann. Da das vorhergehende Experiment in *E.coli* TOP10-Zellen zeigte, dass die Variation der IPTG-Konzentration keinen Einfluss auf die Expression hat, wurde mit einer Konzentration von 0,1 mM IPTG gearbeitet. Nach Expression in den verschiedenen *E.coli*-Derivaten wurde die lösliche und unlösliche Proteinfraction mittels denat. SDS-PAGE analysiert (Abb. 20). Die rek. Lcc1 (ca. 53 kDa) wurde hauptsächlich in Form von unlöslichen *inclusion bodies* exprimiert. Im Shuffle 3026H-Stamm konnte die höchste Bildung von rek. Lcc1 gefolgt vom BI21 DE3 Star detektiert werden.

Für die Aktivitätsmessungen wurde die lösliche Aufschlussfraction durch Zentrifugation von der unlöslichen Fraction getrennt. Anschließend wurden 450 µL löslicher Fraction zu 850 µL Phosphatpuffer (mit Essigsäure eingestellt, 200 mM, pH 3,0) und 100 µL 5 mM ABTS gegeben und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Es konnte keine ABTS-Aktivität detektiert werden. Der während der Inkubation

entstandene Niederschlag wurde wahrscheinlich durch *E.coli*-Proteine, welche bei pH 3,0 ausfallen, und partiell gefaltete rek. Lcc1 (Wildtyp Lcc1, pI 3,1) hervorgerufen.

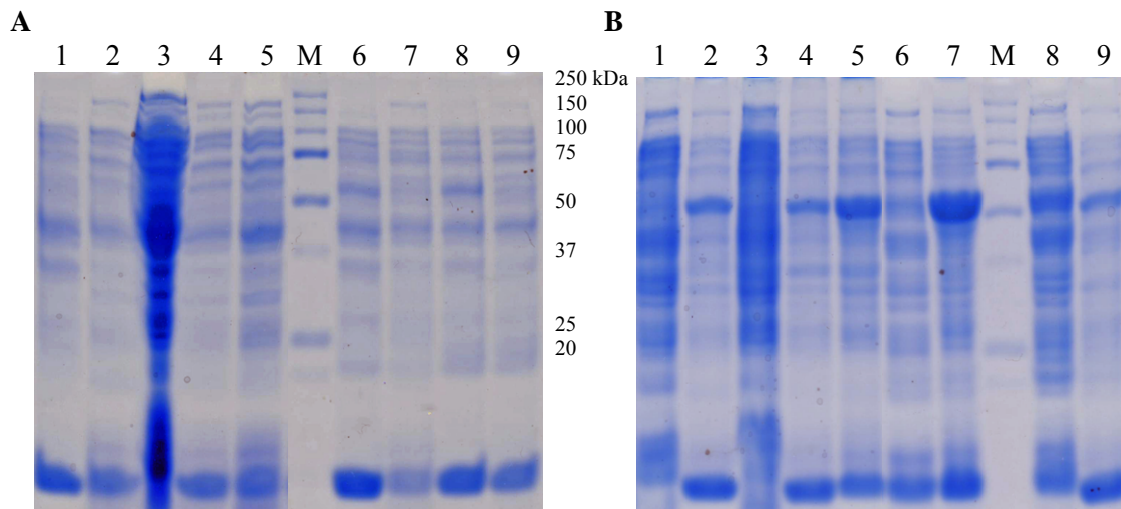


Abb. 20: Expression bei 8 °C der rek. Lcc1 in unterschiedlichen *E.coli*-Stämmen mit 0,1 mM IPTG und 100 µM CuSO₄; SDS-PAGE der löslichen (A) und unlöslichen (B) Fraktionen nach Coomassie-färbung. M: Biorad Precision Plus Proteinstandard, (1):TOP10 pCOLD, (2): TOP10 pCOLD-lcc1, (3): B121 DE3 pCOLD, (4): B121 DE3 pCOLD-lcc1, (5): B121 DE3 Star pCOLD-lcc1, (6): Shuffle 3026H pCOLD, (7): Shuffle 3026H pCOLD-lcc1, (8):Rosetta-Gami B pCOLD, (9): Rosetta-Gami B pCOLD-lcc1

Nach Separierung des Niederschlages durch Zentrifugation und Wiederaufnahme in 300 µL Phosphatpuffer (50 mM, pH 3) konnte eine Färbung 1 h nach Zugabe von 30 µL ABTS beobachtet werden (Abb. 21). Durch das Waschen mit Phosphatpuffer wurden eventuelle Hemmstoffe, wie inhibierende Cl⁻-Ionen (3.2.3), aus dem Kulturmedium oder reduzierende Substrate und Proteine, welche die Bildung des grünen ABTS Kationenradikals verhindern, eliminiert, wodurch die verstärkte Reaktion erklärt werden könnte. Dabei zeigte der Stamm B121 DE3 Star sowohl die höchste Aktivität als auch keine Hintergrundaktivität durch den Kontrollansatz mit Leervektor.

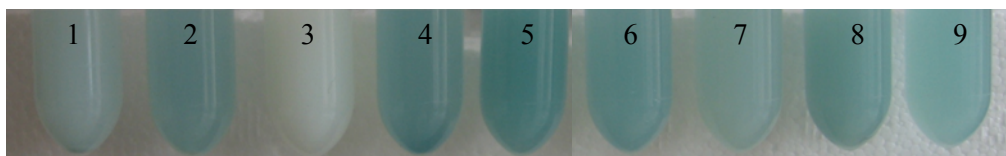


Abb. 21: ABTS-Aktivität des in Phosphatpuffer (50 mM, pH 3,0) wieder aufgenommenen Rückstandes der löslichen Aufschlussfraktion (nach Inkubation für 16 h in NaPhosphat-Puffer pH 3,0), Expression erfolgte bei 8 °C. (1): TOP10 pCOLDI, (2): TOP10 pCOLDI-lcc1, (3): B121 DE3 pCOLDI, (4): B121 DE3 pCOLDI-lcc1, (5): B121 DE3 Star pCOLDI-lcc1, (6): Rosetta gami B pCOLDI, (7): Rosetta gami B pCOLDI-lcc1, (8): Shuffle 3026H pCOLDI, (9): Shuffle 3026H pCOLDI-lcc1

Die beobachtete Hintergrundaktivität könnte auf eine *E.coli*-eigene Cu-Oxidase (CueO) (Djoko *et al.* 2010) zurückgeführt werden, welche bereits bei einer Konzentration von 100 μM CuSO_4 im Medium exprimiert wird (Galli *et al.* 2004). Die *multicopper oxidase* (MCO), welche für die Kupferhomöostase in *E.coli* mit verantwortlich ist (Outten *et al.* 2001), wurde bereits aus *E.coli* W3110, einem K12-Derivat, isoliert, kloniert (Grass and Rensing 2001) und wird auch im *E.coli* B121 DE3 Genom (Jeong *et al.* 2009) kodiert (*accession number* ACT42023). Das 53 kDa große Enzym ist in der Lage, bei Vorhandensein von 0,1 bis 1 mM Cu^{2+} -Ionen, DMP bei einem optimalen pH-Wert von 6,5 zu oxidieren. Ist kein Überschuss an Cu^{2+} -Ionen vorhanden (10 μM CuCl_2), sinkt die Aktivität auf 10%. Diese sinkt ebenfalls drastisch um 64% bei Verringerung des pH-Wertes auf 5,5 (Roberts *et al.* 2002). Die weiteren Arbeiten wurden mit dem B121 DE3 Star-Stamm fortgeführt, da dieser keine Hintergrundaktivität zeigte und damit vermutlich auch keine Expression der CueO unter den gewählten Bedingungen stattfand, was die Interpretierbarkeit der Ergebnisse deutlich verbesserte.

3.3.2 Co-Expression der rek. Lcc1 mit Chaperonen

Abb. 20 zeigt, dass die exprimierte rek. Lcc1 nahezu ausschließlich als unlösliche *inclusion bodies* vorlag. Mitunter ist eine Produktion von rekombinanten Proteinen in Form von *inclusion bodies* erwünscht, da hohe Expressionsraten bei toxischen Proteinen, eine einfache Aufreinigung und Schutz vor Peptidaseabbau gegeben sind. Dafür müssen aber geeignete und effektive Refolding-Strategien entwickelt werden. Für die rek. Lcc1 wurden zwei Strategien näher betrachtet. Zuerst wurden die *inclusion bodies* mit Guanidiniumhydrochlorid solubilisiert und eine Rekonstitution im Alkalischen mit Cu^{2+} -Ionen (Salony *et al.* 2008) versucht, welche jedoch ohne Erfolg blieb. Auch die Faltung unter Vorhandensein von Cu^+ -Ionen, deren Einbau gegenüber Cu^{2+} ins aktive Zentrum favorisiert sein soll (Bukh and Bjerrum 2010), lieferte keine aktive Laccase. Da aber beide Methoden ausgehend von korrekt gefalteten Proteinen entwickelt worden sind, kann das essentielle Vorhandensein einer primären Grundfaltung nicht ausgeschlossen werden, welches eventuell in diesem Fall nicht vorlag. Um die korrekte Faltung schon während der Expression in *E.coli* zu erreichen, wurde als weitere Strategie eine Co-Expression mit den drei cytoplasmatischen Chaperonen GroEL, GroES und *Trigger Faktor* (TF) betrachtet, was in einer Verringerung der Expression als unlösliche *inclusion bodies* bei gleichzeitiger Erhöhung von nativ gefalteter und somit aktiver rek. Lcc1 resultieren sollte. Dazu wurden die Vektoren pCOLDI und pCOLDI-*lcc1* in drei verschiedenen B121 DE3 Star-Stämmen mit den Plasmiden pGro7 (groEL-groES), pG-Tf2 (groEL-groES-tig) und pTf16 (tig) transformiert.

Das Hitzeschock-Chaperon GroEL ist zusammen mit seinem Cofaktor GroES das einzige Chaperonsystem in *E.coli*, welches unter allen Wachstumsbedingungen essentiell ist (Fayet *et al.* 1989). Der Mechanismus der Faltung ist in Abb. 22 genauer dargestellt. GroEL ist ein Oligomer bestehend aus 14 identischen Untereinheiten, jedes mit einer Molekülmasse von 57 kDa, welches eine zylindrische Struktur mit zwei großen Kavitäten bestehend aus jeweils einem heptameren Ringsystem ausbildet

(Abb. 22). Falsch- oder ungefaltete Proteine von meist 10/20-55/60 kDa Größe (Martínez-Alonso *et al.* 2010), deren hydrophoben Aminosäuren offen vorliegen, binden im zentralen Zwischenraum an den hydrophoben Domänen von GroEL. Dies verhindert die Aggregation der ungefalteten Proteine durch Wechselwirkung ihrer hydrophoben Domänen untereinander und kann je nach Natur des Proteins mehrmals nacheinander erfolgen, um die native Faltung zu erhalten (Houry *et al.* 1999). Dieser Effekt konnte durch eine Co-Expression von Chaperonen bereits mehrfach erfolgreich für eine deutliche Verbesserung der Löslichkeit von rek. Proteinen angewendet werden (Hoffmann and Rinas 2004; Kolaj *et al.* 2009; Zelena *et al.* 2011a).

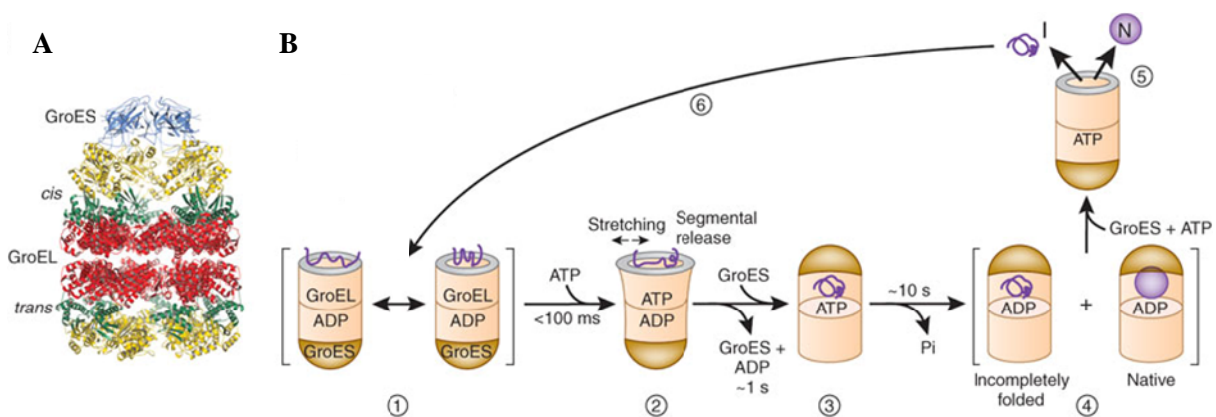


Abb. 22: (A) Kristallstruktur von GroEL-ES (PDB 1AON, (Xu *et al.* 1997)), (B) Mechanismus der GroEL-ES unterstützten Faltung von Proteinen: (1) Bindung des Proteinsubstrates an GroEL unter lokaler Entfaltung des Zielproteins, (2) die ATP-abhängige Konformationsänderung von GroEL führt zu einer Streckung von an GroEL fest gebundenen Regionen des Substrates und resultiert in einer Freisetzung und partiellen Verdichtung von schwach gebundenen Regionen, (3) Abschluss der Verdichtung über Einschluss des Substrates durch GroES, (4) Faltung in der GroEL Kavität, (5) Dissoziation des Proteins, (6) erneute Bindung von unvollständig gefaltetem Protein, N, nativ gefaltetes Protein; I, intermediäres Faltungsprodukt, modifizierte Abbildung nach Hartl und Hayer-Hartl (2009)

Ein weiteres Chaperon, das für eine verbesserte Faltung von rek. Lcc1 eingesetzt wurde, ist der *Trigger Factor* (TF). Das Chaperon sorgte durch Co-Expression für eine erhöhte Löslichkeit von rek. Proteinen in *E.coli* (Kolaj *et al.* 2009). Das Chaperon, welches in *E.coli* konstitutiv exprimiert wird, ist direkt am Ausgang des Ribosoms assoziiert, aus dem die wachsende Polypeptidkette in das Cytoplasma abgegeben wird. Durch diese Bindung an die wachsende Polypeptidkette wird eine spontane Zusammenlagerung der hydrophoben Bereiche der erst unvollständigen Peptidkette, sowie die Zusammenlagerung mit anderen Polypeptidketten verhindert, welche durch Ribosomen ins Cytosol abgegeben werden. Zusätzlich wird ebenfalls der Abbau durch Peptidasen vermieden (Hoffmann *et al.* 2010; Kramer *et al.* 2009). Des Weiteren kann der TF an den hydrophoben Bereichen der wachsenden Polypeptidkette gebunden bleiben und vom Ribosom dissoziieren. Die weitere Bindung von TF an die wachsende Polypeptidkette am Ausgang des Ribosoms sowie mehrere Zyklen dieser beiden Vorgänge

kann die korrekte Faltung von Multidomänenproteinen, den bevorzugten Trigger-Faktor Substraten, entscheidend verbessern (Agashe *et al.* 2004). Nach Dissoziation des TF faltet sich der Großteil der unter normalen Wachstumsbedingungen gebildeten cytosolischen Proteine (ca.70%) spontan oder benötigt weitere Chaperone wie DnaK (zusammen mit DnaJ und GrpE) oder das GroEL-ES System (Hoffmann *et al.* 2010).

Nach erfolgreicher Herstellung der Expressionssysteme für die Co-Expression mit den zuvor beschriebenen Chaperonen wurde eine Expression mit 0,05 mM IPTG im 50 mL Maßstab durchgeführt. Angemerkt werden muss, dass durch das Vorhandensein des pCOLDI-*lcc1*-Konstrukts ein enormer selektiver Druck auf die Zellen ausgeübt wurde, was in einem sehr schnellen „Verlust des Vektors“ bei Lagerung auf LB/Amp-Agarplatten (bereits nach drei Tagen) mündete, weshalb sofort nach Transformation entsprechende Glycerolstocks angelegt wurden. Um die Expression von rek. Lcc1 zu überprüfen, wurden von den Kulturen 1 mL entnommen, die Zellen separiert, in denaturierenden Puffer für die SDS-PAGE vorbereitet und durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert (Abb. 23).

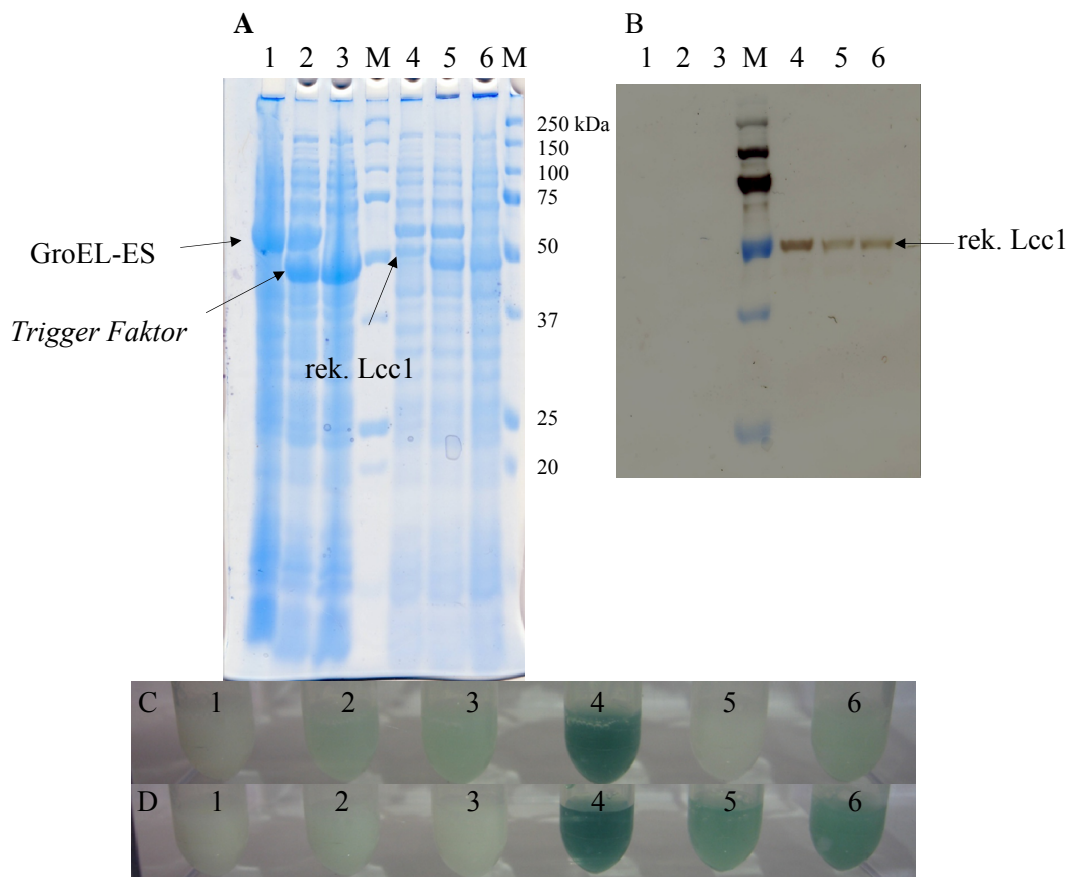


Abb. 23: Expression der rek. Lcc1 in *E. coli* BL21 DE3 Star mit drei verschiedenen Chaperon-Systemen: (1) pCOLD, groEL-groES, (2) pCOLD groEL-groES-tig, (3) pCOLD tig, (4) pCOLDlcc1, groES-groEL, (5) pCOLDlcc1 groES-groEL-tig, (6) pCOLDlcc1 tig; Analyse mittels: Coomassie Färbung (A) und Westernblot (B) nach denaturierender SDS-PAGE der unaufgeschlossenen *E. coli* Zellen und ABTS-Aktivität (pH3, 30 °C) der unlöslichen (C) und löslichen (D) Aufschlussfraktion

Durch Vergleich der jeweiligen Expressionsmuster der Ansätze mit Leervektor und dem Expressionskonstrukt konnte eine erfolgreiche Expression der rek. Laccase (53 kDa) sowie eine Überexpression der jeweiligen Chaperone (GroEL-ES 57 kDa, TF 48 kDa) festgestellt werden. Durch eine erfolgreiche Detektion des N-terminalen 6 x His-Tags des Lcc1-Fusionsproteins über einen Westernblot wurde die erfolgte Expression der rek. Lcc1 zusätzlich belegt. Die besten Ergebnisse zeigte die Co-Expression mit GroEL-ES. Nach Aufschluss der Zellen konnte bereits eine Farbentwicklung innerhalb von 30 min nach Zugabe von ABTS in der löslichen Fraktion erstmalig, ohne eine vorhergehende Fällung und Wiederaufnahme der Pellets, detektiert werden (Abb. 23). Die Negativkontrollen zeigten keine oder nur eine sehr geringe Aktivität, welche nach weiterer Inkubation jedoch wieder verschwand und als Artefakt angesehen wurde. Eine Quantifizierung über eine photometrische Aktivitätsmessung war bisher durch den sich bildenden Niederschlag der *E.coli*-Proteine nicht durchführbar. Deshalb wurde versucht, die rek. Lcc1, welche mit einem N-terminalen 6 x His-Tag als Fusionsprotein exprimiert wurde, von den restlichen Proteinen über eine His-Tag-geleitete Affinitätschromatographie abzutrennen. Bei Vorversuchen mit Ni-NTA-Säulen (Ni-NTA Spin Columns, Qiagen, Daten nicht gezeigt) konnte eine Elution des Zielproteins bereits bei einer Imidazolkonzentration von 10 mM beobachtet werden. Um eine bessere Trennung zu erreichen, wurde die rek. Lcc1 über eine IMAC-Säule mittels FPLC aufgereinigt (Abb. 24).

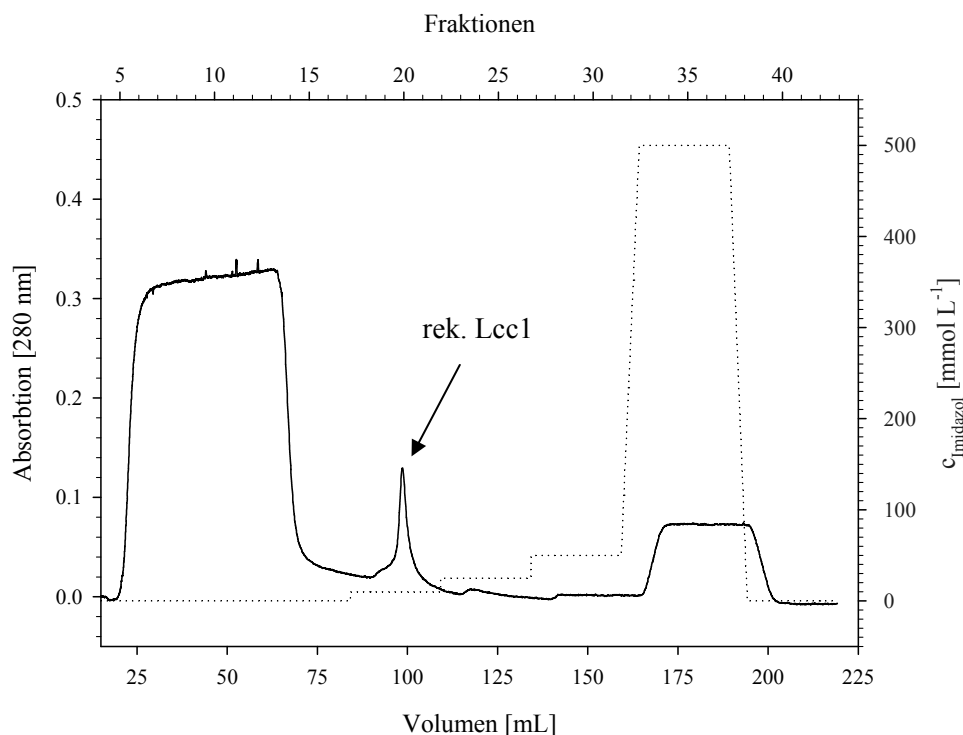


Abb. 24: IMAC-Affinitätsreinigung der rek. Lcc1 aus BI21 DE3 Star ausgehend von konzentriertem Zelllysate einer 250 mL Kultur, Elution erfolgte mit steigender Imidazolkonzentration (gepunktete Linie)

Die ABTS-aktiven Fraktionen (17-25) wurden vereinigt, aufkonzentriert und mit Tris-Puffer (10 mM, pH 8) gewaschen. Da störende Fremdproteine, welche eine frühere Aktivitätsfärbung verhindert hatten, entfernt wurden, konnte die Laccaseaktivität zu 67 U L^{-1} bestimmt werden, was, auf eine 250 mL Kultur skaliert, eine Aktivität von $0,08 \text{ U L}^{-1}$ ergeben würde. Die Aufkonzentrierungs- und Umpufferungsschritte sowie die Reinigung über die FPLC, welche einen hohen Verlust an Aktivität mit sich gebracht haben könnten, tragen zusätzlich zu der geringen Aktivitätsausbeute bei. Eine ABTS-Anfärbung nach nativer PAGE blieb erneut ohne Ergebnis. Die gesamte ABTS-Lösung auf dem Gel färbte sich zwar grün, es konnte jedoch keine Bande detektiert werden. Eventuell ist die Oxidation des ABTS durch die rek. Lcc1 zu langsam und das gebildete Kationenradikal diffundiert zu schnell aus dem Gel in die Lösung. Deshalb wurde TMBZ als Substrat ausgewählt, welches auf dem Gel nach Oxidation präzipitiert und einen blauen Niederschlag bildet. Hierdurch konnte eindeutig aktive rek. Laccase bereits nach 5 min Inkubation auf dem Gel detektiert werden (Abb. 25). In der Durchbruchfraktion konnte hingegen keine Aktivität detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die gesamte Laccaseaktivität über die Affinitätschromatographie isoliert wurde.

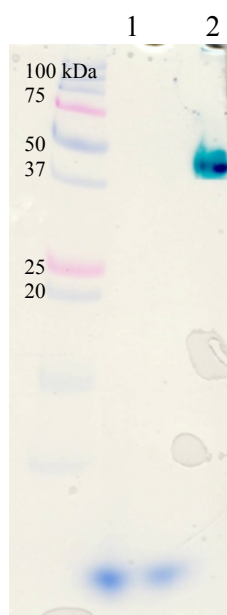


Abb. 25: TMBZ-Färbung der rek. Lcc1 nach seminativer SDS-PAGE des Durchbruchs (**1**) und des Eluates (**2**) der His-Tag-Aufreinigung

Nach eigenem Kenntnisstand ist dies die erste Laccase aus Pilzen, deren aktive heterologe Expression in *E.coli* nicht nur durch Zymographie (Salony *et al.* 2008), sondern auch über die Oxidation von einem typischen Laccase-Substrat wie ABTS nachgewiesen werden konnte. Die Expression der *Cyathus bulleri*-Laccase in *E.coli* betreffend gibt es keine weiteren Angaben über die Aktivität, ob das Enzym in löslicher Form oder als *inclusion bodies* exprimiert wurde sowie zur Sequenz des für die Expression verwendeten Inserts. Salony *et al.* klonierten einen Genabschnitt, welcher nachweislich einen 435 Bp Abschnitt einer Laccase ohne C-Terminus und Stoppcodon (das Stoppcodon des Vektors

wurde verwendet) enthielt, in den pCR2.1 Vektor. Das Enzym wurde als großes Fusionsprotein mit einer Größe von ca. 190 kDa (Wildtyp ca. 66 kDa), im nativen Gel, exprimiert. Leider wurde das klonierte Insert im pCR2.1 Vektor nicht sequenziert, was über die universellen Primer M13 für den pCR2.1 möglich gewesen wäre, um weitere Informationen hinsichtlich Start oder Stopp der Replikation und die Vollständigkeit des Laccasegenes zu erhalten. Bedauerlicherweise wurde trotz des hohen wissenschaftlichen Interesses keine weitere Arbeit über eine heterologe Expression der *Cyathus bulleri*-Laccase in *E.coli* veröffentlicht, die einen ausführlicheren Vergleich mit der vorliegenden Arbeit erlaubt hätte.

Eine Anfärbung der rek. Lcc1 nach Westernblot war nicht erfolgreich. Die Aufreinigung über IMAC zeigte, dass das Fusionsprotein nur sehr schwach an das Material gebunden wurde, was eine schlechte Zugänglichkeit des 6 x His-Tags vermuten lässt, so dass für eine geeignete Detektion im Westernblot große Mengen an rekombinantem Enzym vorliegen müssen. Dass ein Großteil der rek. Laccase als *inclusion bodies* vorlag, kann mit der sehr guten Detektion des Ganzzellaufschlusses und der nicht erfolgreichen Anfärbung der löslichen Fraktion im Westernblot erklärt werden (Abb. 23). Die geringe Aktivität deutet zusätzlich auf einen immer noch hohen Anteil an *inclusion bodies* oder nicht nativ gefalteter Laccase hin.

Mögliche Ursachen hierfür sind vielfältig. Zum einen ist die Expression von prokaryotischen Proteinen in *E.coli* durch die fehlende co- oder postranslationale Modifikation, wie zum Beispiel eine Glykosidierung, beschränkt. Dieser Sachverhalt wird häufig für eine schlechte Expression von Laccasen mit ungenügenden katalytischen Eigenschaften herangezogen, wurde aber bisher nur unzureichend untersucht. Ranieri *et al.* (2009) exprimierten eine Laccase in *Kluyveromyces lactis* in einem O- und N-glykosidierungsunfähigen Mutationsstamm mit einer deutlich geringeren Aktivität, verglichen mit dem Wildtyp während der Fermentation. Jedoch erfolgte keine Charakterisierung der rek. Laccase, was eine qualitative Aussage hinsichtlich deren Eigenschaften zugelassen hätte. Eine Deglykosidierung einer N-glykosidierten Laccase aus *Pycnoporus sanguineus* zeigte nur bei niedrigen Temperaturen (20 °C) eine signifikante Verringerung der Stabilität und Aktivität gegenüber ABTS (Vite-Vallejo *et al.* 2009). Es wurde postuliert, dass dieser Effekt nicht durch eine Änderung der Gesamtfaltung, wie die gleichbleibende Stabilität gegenüber Harnstoff nahelegte, sondern in einer Verschiebung von wichtigen negativ geladenen Aminosäuren in der Nähe des T1 Kupferatoms hervorgerufen wurde (Vite-Vallejo *et al.* 2009). Jedoch können die Glykane, welche bereits im endoplasmatischen Retikulum an das ungefaltete Protein gebunden werden, Einfluss auf die Faltung besitzen. Dieser ist aber sehr heterogen und betrifft vor allem hoch-glykosidierte Proteine (Helenius and Aebi 2004). Vor diesem Hintergrund könnte es für eine Expression der Lcc1 in *E.coli* von Vorteil sein, dass sie wahrscheinlich nur gering glykosidiert ist, was aus dem geringen Unterschied zwischen der gemessenen Größe nach SDS-PAGE und SEC zu der aus der Aminosäuresequenz berechneten Größe geschlossen werden kann (Kapitel 3.2.3). In einer einzigen Arbeit von Xu *et al.* wurde bisher das Thema des Ein-

flusses der Glykosidierung auf die Laccaseexpression adressiert. Dafür wurden sechs Laccase-Mutanten, in denen jeweils bei einer der sechs potentiellen N-Glykosidierungsstellen Asn durch Gln ausgetauscht wurde, rekombinant in *Pichia pastoris* produziert. Die somit entstandenen Isoformen mit unterschiedlicher Glykosidierung zeigten geringere spezifische Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp (Xu *et al.* 2007). Weitere mögliche Einflüsse der Glykosidierung von Laccasen können die Stabilisierung der Kupferzentren, eine Direktionierung der Proteinsekretion und eine Erhöhung der Thermostabilität sein (Rodgers *et al.* 2010).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine aktive und lösliche Produktion von Laccasen pilzlichen Ursprungs in *E.coli* möglich ist. Expression von Laccasen in *E.coli* sind bisher nur für prokaryotische Vertreter beschrieben (Santhanam *et al.* 2011), welche jedoch nur ein geringes Redoxpotential besitzen. Im Vergleich zur rek. Produktion in Hefen muss die Ausbeute jedoch deutlich erhöht werden. Je nach vorliegender Laccase und verwendetem Expressionssystem variieren die Ausbeuten in Hefen beträchtlich. So können geringe Aktivitäten von $0,035 \text{ U L}^{-1}$ für eine Laccase aus *Trametes versicolor* in *Saccharomyces cerevisiae* (Necochea *et al.* 2005), $1,3 \text{ U L}^{-1}$ für eine Laccase aus *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris* (Bohlin *et al.* 2006) und 12 U L^{-1} für eine Laccase aus *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis* (Pezzella *et al.* 2009) als auch außerordentlich hohe Aktivitäten bis zu 140.000 U L^{-1} in *Pichia pastoris* für eine Laccase aus *Trametes versicolor* (Hong *et al.* 2002) erhalten werden. Meist werden jedoch Ausbeuten unter 10.000 U L^{-1} (Hong *et al.* 2007) erhalten. Verglichen damit ist die Expression der Lcc1 mit $0,08 \text{ U L}^{-1}$ in *E.coli* im unteren Bereich einzuordnen. Die sehr großen Unterschiede in der durch Expression in Hefen gewonnenen Laccaseaktivitäten zeigen jedoch wiederum, dass eine gute Produktion in Hefen nicht garantiert ist.

Eine weitere Möglichkeit ist die heterologe Expression in filamentösen Pilzen, welche sehr hohe Ausbeuten bei der Expression einer *mid-potential* Laccase aus dem Ascomyceten *Melanocarpus albomyces* im engen Verwandten *Trichoderma reesei* 47.000 U L^{-1} lieferte (Kiiskinen *et al.* 2004). Abseits davon konnten sehr hohe Laccasetiter von bis zu 740.000 U L^{-1} in hyper-laccaseproduzierenden Wildstämmen mit optimierter Fermentation erhalten werden (Galhaup *et al.* 2002b). Trotzdem ist die großtechnische Kultivierung von Basidiomyceten immer noch mit vielen Schwierigkeiten verbunden. Die sehr niedrigen Aktivitäten von bis zu 4 U L^{-1} (Couto and Toca-Herrera 2007) für andere Wildstämme und die Tatsache, dass viele Basidiomyceten, wie in dieser Arbeit gezeigt, nur geringe Laccasetiter bilden, zeigen, dass die Verwendung von Expressionssystemen für eine Ausschöpfung des riesigen Angebotes an Laccasen unabdingbar ist. Ein mögliches Ziel ist daher die Entwicklung eines universellen Expressionssystems für viele nur schwach exprimierte Laccasen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten in weiteren fortlaufenden Arbeiten zu einer Etablierung eines *E.coli*-Expressionssystems für Laccasen pilzlichen Ursprungs genutzt werden. Hierfür sind aber noch weitere Optimierungen, wie eine Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung, die Expression ohne Signalpeptid, die Variation der Chaperonexpression, die Verwendung

von alternativen Chaperonen wie DnaK und die Optimierung der *codon usage* nötig. Des Weiteren könnte auch durch Verwendung von verschiedenen Tags, wie z.B. NusA-, Strep- und CaM-Tag, die Löslichkeit verbessert werden. Auch ein Ausschleusen der Laccase, z.B. über den Sec- und TAT-abhängigen Transport ins Periplasma, könnte zu einer Verbesserung der Aktivität und einer einfacheren Aufreinigung führen. Zusätzlich könnten auch Methoden der gerichteten Evolution eingesetzt werden.

3.4 Charakterisierung einer Peroxidase aus *Hirneola auricula-judae* (*Haj*)

Peroxidasen bilden eine weitere interessante Klasse der von Basidiomyceten sekretierten Oxidoreduktasen. Die sekretierten Peroxidasen von *Haj*, der im Screening als potentester Peroxidaseproduzent identifiziert werden konnte, sollten näher biochemisch charakterisiert werden. Hierzu wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit (Arendt 2009) die mit Xylidin induzierten Peroxidasen über eine zwei-stufige FPLC-Aufreinigung (IEX und SEC) isoliert und der Verlauf über eine denaturierende SDS-PAGE und IEF verfolgt (Abb. 27). Als erste Trennstufe wurde ein schwacher Anionentauscher (DEAE) verwendet. Anschließend erfolgte eine zweite Trennung über eine Größenausschlusschromatographie (Sephadex 75).

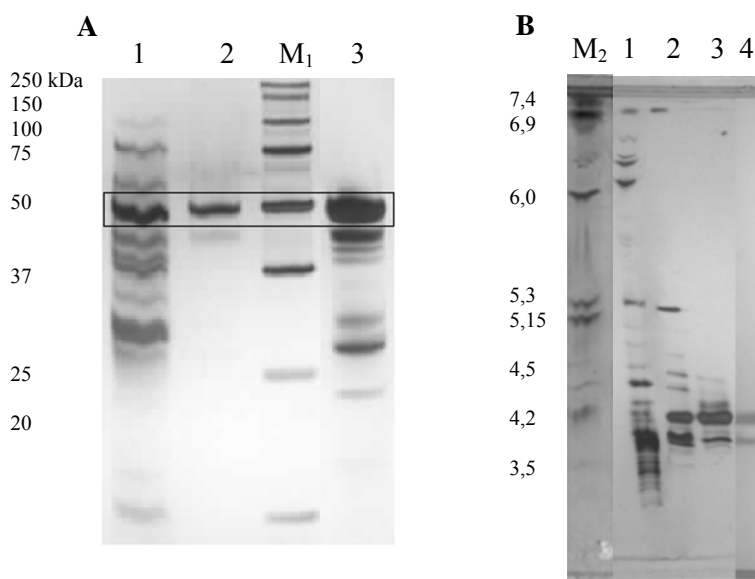


Abb. 26: Analyse der FPLC-Aufreinigungsschritte des Kulturüberstandes von *Haj* nach den. SDS-PAGE (A) und IEF (B) Silberfärbung: (1) Kulturüberstand induziert mit Xylidin, (2) aufkonzentrierte Fraktionen nach SEC, (3) aufkonzentrierte Fraktionen nach IEX, (4) aufkonzentrierte Fraktionen nach SEC und Aktivitätsfärbung mit ABTS und H₂O₂ in Abwesenheit von Mn²⁺, (M₁) Marker Biorad All Blue, (M₂) IEF pH 3-6 Marker Serva, modifiziert nach (Arendt 2009)

Durch die gewählten Trennmethode konnte keine Separierung der beiden Isoenzyme, welche einen pI von 4,1 und 3,9 besitzen, erreicht werden. Nach Größenausschlusschromatographie wurden zwei Banden, eine prominente bei 50 kDa und eine schwache Bande bei 42 kDa, in der den. SDS-PAGE detektiert (Abb. 26). Liers *et al.* (Liers *et al.* 2010) isolierten und charakterisierten unabhängig von der hier vorgestellten Arbeit zwei Peroxidasen aus dem Basidiomyceten *Auricula auricularia-judae* (Synonym für *Haj*, DSMZ 11326), welcher identisch mit dem in dieser Arbeit untersuchten Stamm ist. Die zwei Peroxidasen AjP I und AjP II wurden in die Familie der DyPs eingeordnet und besitzen in der den. SDS-PAGE eine Molekülmasse von 51 (AjP I) und 40 kDa (AjP II) (Liers *et al.* 2010). Wie in der den. SDS-PAGE der SEC-Fraktion (Abb. 26) zu sehen, wurden für die in dieser Arbeit isolierten Peroxidasen ebenfalls nahezu identische Molekülmassen von 42 respektive 50 kDa beobachtet. Abweichend zu Liers *et al.*, welche zwei Isomere mit isoelektrischen Punkten von 4,3 (AjP I) und 4,1 (AjP II) identifizierten, wurde ein neues Isomer mit einem pI von 3,9 detektiert (Abb. 26). Allerdings widerspricht sich die Zuordnung der Molekülmassen zu den einzelnen isoelektrischen Punkten. Während Liers *et al.* für die Peroxidase bei 51 kDa ein pI von 4,3 ermittelten, kann aufgrund des Vergleiches der Bandenintensität zwischen der den. SDS-PAGE und dem IEF-Gel in der vorliegenden Arbeit die Peroxidase mit einer Molekülmasse von 50 kDa eher einem pI von 4,1 zugeordnet werden. Ob das Peroxidaseisomer mit einem pI von 3,9 ein Molekulargewicht von 50 kDa oder 42 kDa besitzt, konnte mit den vorliegenden Daten nicht eindeutig geklärt werden. Um zu eruieren, ob es sich bei der 42 kDa-Bande eventuell um eine Verunreinigung handelte, wurden die Proben nach einer nat. SDS-PAGE mit Coomassie sowie mit ABTS und H₂O₂ angefärbt. Es konnte nur eine Peroxidasebande mit einer Molekülmasse von ca. 70 kDa unter nativen Bedingungen in der SDS-PAGE identifiziert werden (Arendt 2009). Eine Peroxidase mit einem pI von 4,3 konnte bei einer Induktion mit Xylidin nicht detektiert werden. Es kann festgestellt werden, dass durch Verwendung von Xylidin ein abweichendes Isoenzymmuster im Vergleich zur Induktion mit Tomatensaft (Liers *et al.* 2010) beobachtet werden konnte. Für eine weitere biochemische Charakterisierung wurde DMP als Substrat verwendet. Da durch das gewählte Trennverfahren keine Trennung der Isoenzyme möglich war, sind die nachfolgenden Ergebnisse der Charakterisierung immer als Mischwert der beiden Isoenzyme zu verstehen.

Es konnte gezeigt werden, dass das pH-Optimum gegenüber DMP bei pH 3,5 liegt (Abb. 27). Liers *et al.* (2010) ermittelten demgegenüber ein pH-Optimum von 1,5 bei der Oxidation von Veratrylalkohol. Dies verdeutlicht, welche großen Unterschiede im pH-Optimum bei Verwendung von unterschiedlichen Substraten auftreten können. Das keine Aktivität der in dieser Arbeit induzierten DyPs aus *Haj* gegenüber Veratrylalkohol detektiert werden konnte, ist der Tatsache geschuldet, dass der Assay bei pH 4,5 durchgeführt wurde und beide von Liers *et al.* (2010) identifizierten DyPs in diesem pH-Bereich keine Aktivität mehr zeigten.

Die höchsten Umsätze wurden bei einer Temperatur von 40 °C beobachtet (Abb. 27). Eine geringe Restaktivität von 18% bei 50 °C deutet auf eine rasche Inaktivierung hin. Die optimale H₂O₂-Konzentration wurde zu 0,25 mM bestimmt, wenngleich die Peroxidasen in einem weiten Konzentra-

tionsbereich von 0,005 bis 1 mM Aktivität zeigten (Abb. 27). Die geringere Aktivität bei höheren Konzentrationen an H_2O_2 kann auf eine Inaktivierung zurückgeführt werden, wie sie von Häm-Peroxidasen in Anwesenheit von H_2O_2 bekannt ist (Ogola *et al.* 2010). Für eine weitere Charakterisierung und Klonierung der isolierten Peroxidasen wurde diese mittels ESI-MS/MS sequenziert.

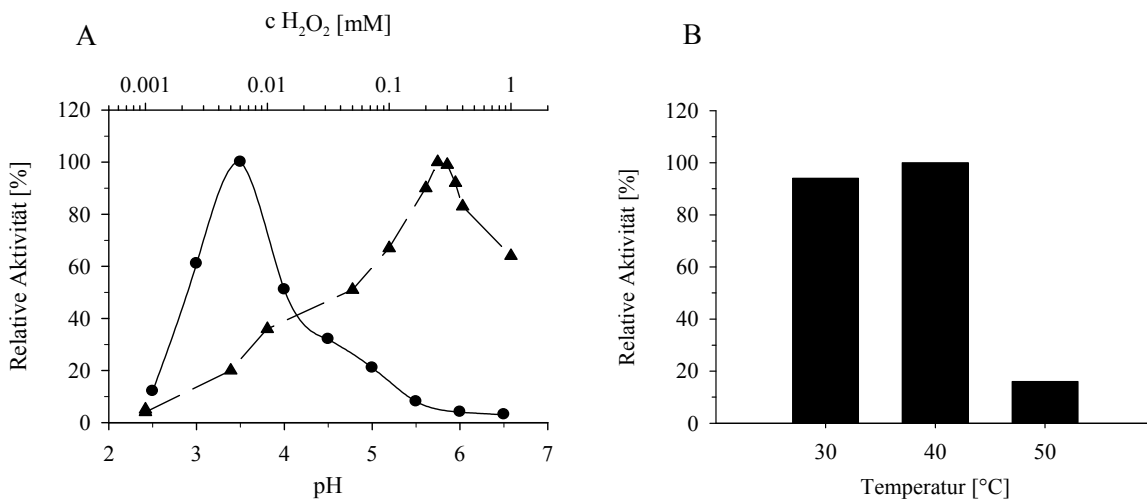


Abb. 27: Bestimmung des (A) optimalen pH-Wertes (Dreieck), der H_2O_2 -Konzentration (Kreis) und (B) des Temperaturoptimums der Peroxidase aus *Haj* gegenüber DMP

3.4.1 Proteinsequenzierung *Haj*

Nach der Aufreinigung der Peroxidase und anschließender den. SDS-PAGE wurde die Bande bei 50 kDa aus dem Gel ausgeschnitten und per ESI-MS/MS sequenziert. Hierdurch wurden die in Tab. 28 aufgeführten Peptidfragmente der *Haj*-Peroxidasen (HjP) erhalten.

Tab. 28: Erhaltene Peptidfragmente nach ESI-MS/MS Analyse der DyPs aus *Haj* und literaturbekannte Peptidfragmente

Bezeichnung	Sequenz	Quelle
P1	QLFYFFALNDPAFTK	Eigene Arbeit
P2	TPATVGLDPLLQNNQPR	Eigene Arbeit
P3	SGAPLDLTPTADDPALGADAQR	Eigene Arbeit
Iso AjP I	ATSLNTDDIQGDILV	N-Terminus Isoenzym 1 (Liers <i>et al.</i> 2010)
Iso AjP II	AGTGIHGVIILASDT	N-Terminus Isoenzym 2 (Liers <i>et al.</i> 2010)
Intern AjP	TPATVGLDPLIGQNNGGAPR	Internes Peptid Isoenzyme 1 und 2 (Liers <i>et al.</i> 2010)

Das Peptid P2 wurde mit dem internen Peptid der AjPs aligned (Abb. 28). Beide Sequenzen unterschieden sich nur in drei Aminosäuren an den Stellen 11, 17 und 18 und besitzen eine Identität von 85% (90% ohne I/L). Über diese Abweichung an der Stelle 11 von Leucin und Isoleucin kann jedoch keine eindeutige Aussage getroffen werden, da die gewählte Sequenzierungsmethode nicht zwischen Leucin und Isoleucin unterscheidet. Die Unterschiede an Position 17 und 18 deuten darauf hin, dass die in dieser Arbeit isolierte Peroxidase ein Isoenzym ist. Die Peptide P1 und P3 besitzen hingegen keine Überschneidungen mit den N-terminalen Sequenzen der beiden AjPs.

```

                                10      20
                                .... | .... | .... | .... |
Peptid 2 HjP      TPATVGLDPLLGNNG-QPR
Internes Peptid AjP .....I.....GA..
Konsensussequenz *****:***** **

```

Abb. 28: Alignment des in der vorliegenden Arbeit identifizierten Peptids 2 aus *Haj* mit dem internen Peptid von AjP (Liers *et al.*)

Für das Fragment P1 konnte mittels einer Datenbanksuche²⁶ nur eine einzige homologe DyP (*Piriformospora indica*, GenBank: CCA72011.1) mit 92% Identität (E-Wert 0,91) gefunden werden. Es konnten keine weiteren homologen Peroxidasen identifiziert werden. Dies ist nicht ungewöhnlich, da DyPs hinsichtlich ihrer Sequenz sehr heterogen sind. Das Peptid P3 scheint in einem hochkonservierten Bereich für DyPs zu liegen, da sehr hohe Homologien zu anderen DyPs wie z.B. von *Bjerkandera adusta* (86% Identität, $E=7e^{-09}$, GenBank: BAA77283.1), *Polyporaceae sp.* (73% Identität, $E=9e^{-05}$, GenBank: AAB58908.1), *Streptomyces hygroscopicus* (73% Identität, $E=4e^{-04}$, GenBank: AEY86865.1) und *Termitomyces albuminosus* (73% Identität, $E=3e^{-04}$, GenBank: AAM21606.1) gefunden wurden. Eine abschließende Aussage, ob es sich bei den in dieser Arbeit beschriebenen Peroxidasen um Isoenzyme der AjPs handelte, kann ausgehend von den erhaltenen Peptidsequenzen, nicht erfolgen. Daher wurde der Versuch unternommen, die vollständige Sequenz zu klonieren.

3.4.2 Fischen des HjP-Gens

Um die Orientierung der sequenzierten Peptide zu bestimmen und die Größe an zu erwartenden Amplifikaten abschätzen zu können, wurden diese mit einer DyP aus *Pleurotus ostreatus* aligned (Abb. 29). Für eine Rückübersetzung der Aminosäuresequenz in die DNA-Sequenz wurde die *codon usage* des *Auricularia auricula-judae*²⁷ verwendet. Da aber nur zwei kodierende Sequenzen für die Generierung der *codon usage* zu Verfügung standen, mussten dementsprechend viele Wobble-Basen in die

²⁶ BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, abgerufen am 12.05.2012

²⁷ <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=29892&aa=1&style=GCG> abgerufen am 05.08.2009

abgeleiteten degenerierten Primer (Tab. 14) eingebaut werden, um alle möglichen Varianten abzudecken.

QLFYFFALNDPAFTK → P1for

SGAPLDLTPTADDPALGADAQR → P2for and P3for

TPATVGLDPLLGNNGQPR → P4rev

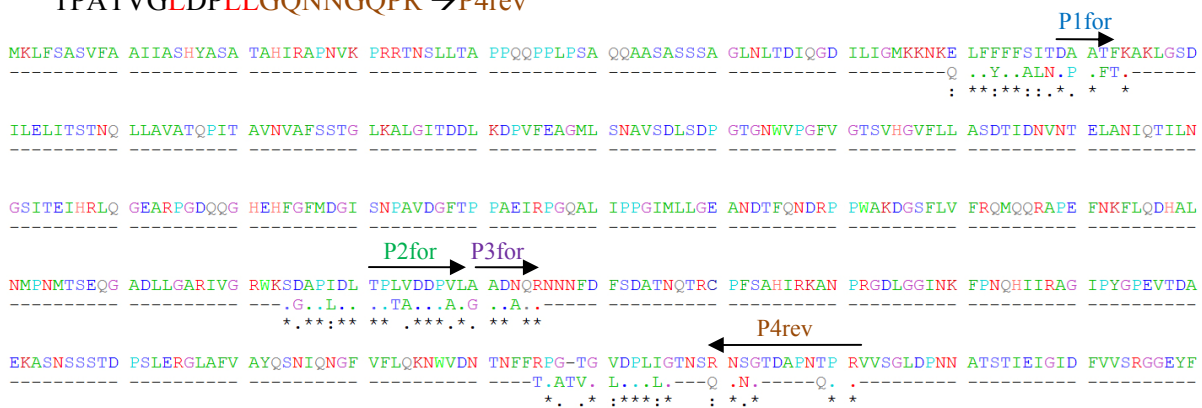


Abb. 29: Ableitung geeigneter Primer aus den Peptidsequenzen P1-3, oben: Bereiche der Peptidsequenzen aus denen degenerierten Primer abgeleitet wurden (farbig), unten: Alignment der Peptide 1-3 und MsP1 aus *Marasmius scorodoni* (UniProtKB/Swiss-Prot: B0BK71.1)

Da keine Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin in der Sequenzierung mittels der angewendeten ESI-MS/MS getroffen werden konnten, wurden alle Bereiche der Peptidsequenzen mit Leucin nicht für die Primerableitung herangezogen. Ebenfalls wurden Bereiche mit Serin nicht verwendet, da sechs Basentriplets für Serin kodieren und eine Rückübersetzung nur mit sehr stark degenerierten Primern möglich gewesen wäre.

Für die Synthese der cDNA wurde Myzel von Peroxidase-produzierenden *Haj*-Kulturen an mehreren Tagen abgenommen. Wegen des Einsatzes degenerierter Primer und der hohen Anzahl an Primerkombinationen wurde die *Touch Down*-PCR für die Amplifikation verwendet und die gebildeten Amplifikate anschließend per Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 30). Es konnten jedoch keine eindeutigen Amplifikate mit den postulierten Größen für die eingesetzten Primerkombinationen detektiert werden. Zwei Primerkombinationen (P1.1forHaj und P4.1revHaj, P2.2forHaj und P4.4revHaj) bei denen eventuell Amplifikate mit der richtigen Größe von ca. 1080 Bp respektive 360 Bp entstanden sind, wurden für eine nachfolgende Gradienten-PCR von 45 bis 57 °C verwendet (Abb. 30).

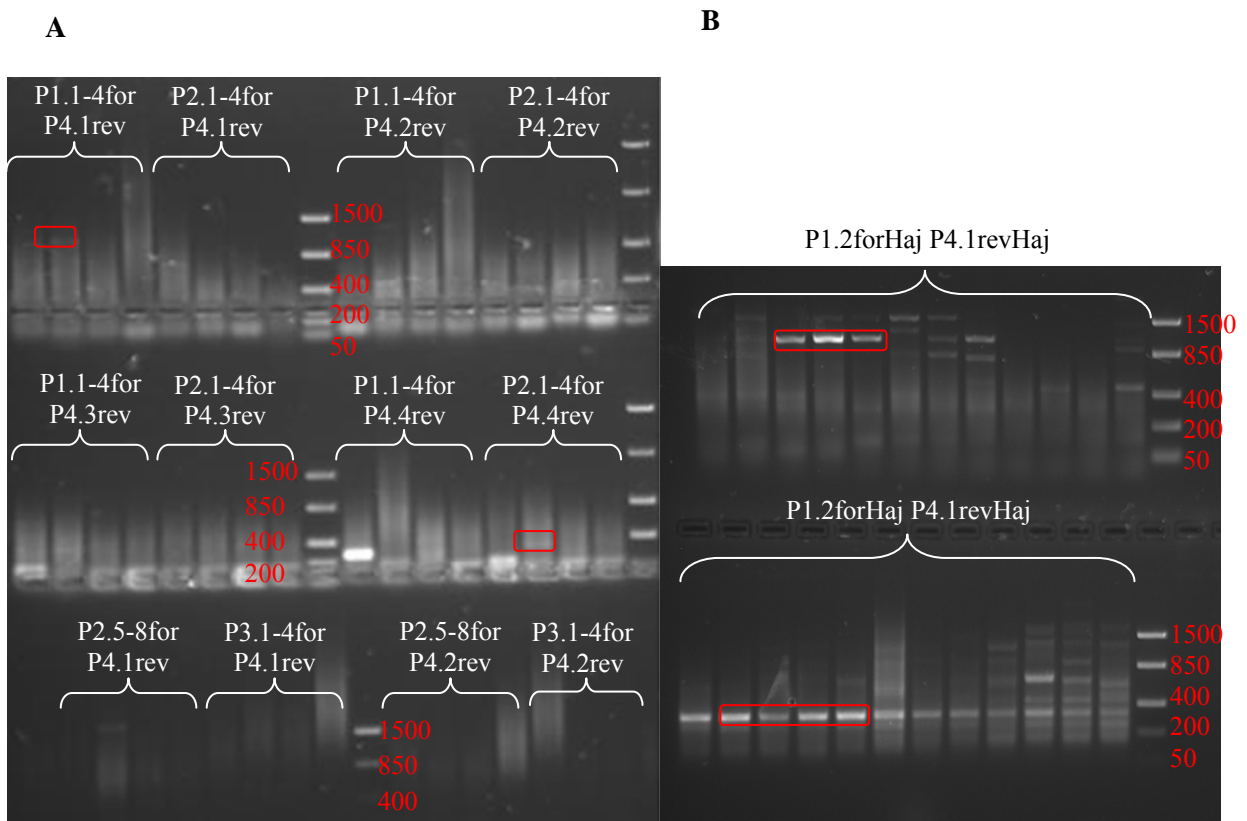


Abb. 30: (A) Analyse der Amplifikate der verschiedenen Primerkombinationen nach *Touch Down*-PCR mittels Agarosegelelektrophorese, rot markierte Bereiche zeigen eventuelle Amplifikate mit entsprechender Größe an, vermutete ungefähre Größe der Amplifikate: P1forHaj und P4revHaj 1080 Bp, P2forHaj und P4revHaj 360 Bp, P3forHaj und P4revHaj 330 Bp, (B) Analyse der Amplifikate der Primerkombinationen (P1.1forHaj und P4.1revHaj, P2.2forHaj und P4.4revHaj) nach Gradienten-PCR mittels Agarosegelelektrophorese: Rot markierte Bereiche wurden für nachfolgende Klonierung und Sequenzierung ausgeschnitten, Marker: FastRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas)

Nach der Agarosegelelektrophorese konnten eindeutige Banden detektiert werden, welche aus dem Gel ausgeschnitten, ligiert, transformiert und sequenziert wurden. Es konnten jedoch weder Teile der Peptidsequenz noch Übereinstimmungen mit Peroxidasen nach Datenbanksuche gefunden werden. Anschließend wurden weitere degenerierte Primer (Tab. 14, P2.1-8revHaj und P1.5-12forHaj) abgeleitet. Es wurden durch keinen Ansatz Sequenzen der DyP aus *Haj* erhalten. Auch die Verwendung von frischer cDNA von verschiedenen Kulturtagen mit neuen Primern aus den Peptid-Bereichen mit Leu und Ile (Tab. 14) blieben erfolglos. Daraufhin wurden auch von den N-terminalen Peptidsequenzen, die durch Liers *et al.* (2010) zur Verfügung standen, degenerierte Primer abgeleitet, welche aber ebenfalls keinen Erfolg brachten.

Erst kürzlich wurde das Genom eines nahen Verwandten von *Hirneola auricula-judae*/*Auricularia auricula-judae* nämlich *Auricularia delicata* sequenziert²⁸. Die Tatsache, dass elf verschiedene DyPs annotiert werden konnten, zeigt einmal mehr, dass Basidiomyceten eine Vielzahl an Isoenzymen bilden können.

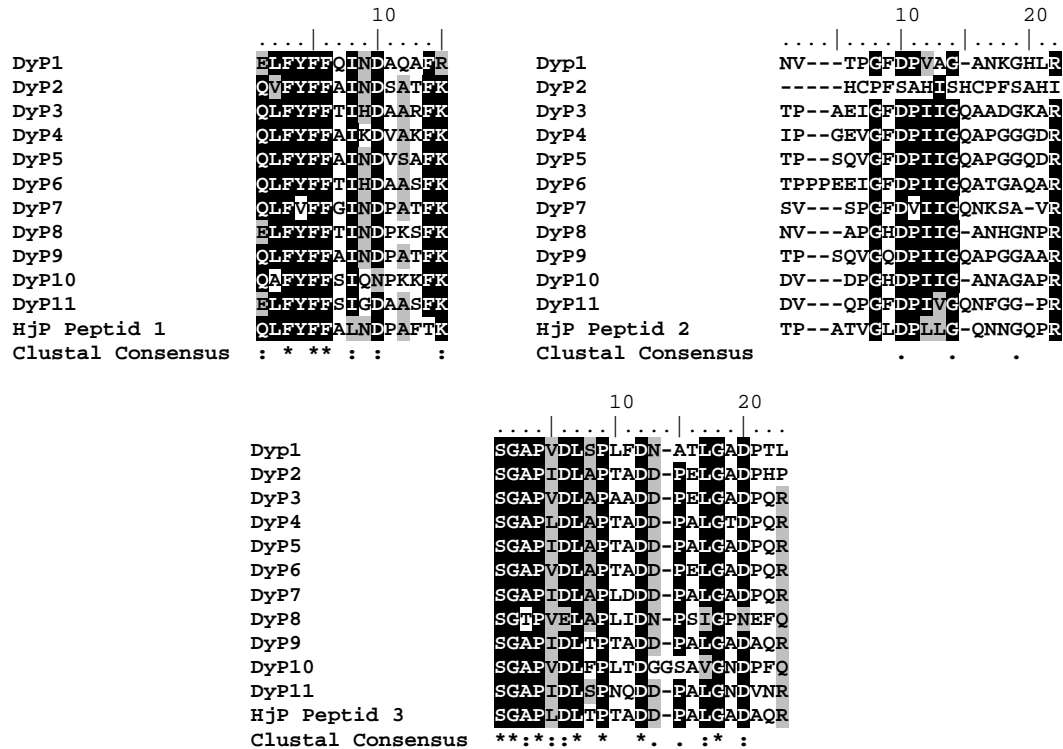


Abb. 31: Alignment der HjP-Peptide mit den DyPs aus *Auricularia delicata*, als Schwellenwert wurde 70% verwendet

Die Peptide 1 und 3 besitzen sehr hohe Übereinstimmungen mit den Isoenzymen aus *Auricularia delicata*. Die DyP9 besitzt zu den Peptiden 1 und 3 fast identische Sequenzen und könnte, da die DNA-Sequenz vorliegt, als Vorlage für neue spezifische Primer dienen. Das Peptid 2, welches beinahe identisch mit dem internen Peptid der von Liers *et al.* (2010) beschriebenen AjPs ist, liegt in einem Bereich, der eher heterolog ist, aber einen konservierten Bereich von fünf Aminosäuren besitzt, welcher ebenfalls zur Neusynthese von Primern herangezogen werden könnte. Die nun zur Verfügung stehenden Informationen könnten in weiterführenden Arbeiten zu einer erfolgreichen Amplifikation der DNA-Sequenzen der DyPs aus *Haj* führen.

3.4.3 Alternative Aufreinigung der DyPs aus *Haj*

Um für weitere Untersuchungen und die Bereitstellung innerhalb des AiF-Projektes genügend *Haj*-DyP-Peroxidasen (HjPs) zu generieren, wurde *Haj* im 2,5 L Maßstab in einem Rührkesselreaktor unter

²⁸ JGI, *Auricularia delicata* SS-5 v1.0, <http://genome.jgi-psf.org/Aurde1/Aurde1.home.html>, abgerufen am 15.05.2012

Induktion von Ethanol anstatt des toxischen Xylidins kultiviert. Hierbei konnte bereits nach 4 Tagen eine Peroxidaseaktivität von $2,4 \text{ U mL}^{-1}$ erreicht werden. Mit einer Dauer von 6 Tagen für die Vorkultur konnte somit innerhalb von insgesamt 10 Tagen die maximale Aktivität erreicht werden. Im Gegensatz hierzu, blieb die DyP-Produktion im Rührkesselreaktor (10 L Maßstab) in einem auf Tomatensaft basierendem Medium erfolglos (Liers *et al.* 2010). Bei der Kultivierung im Schüttelkolben mit Tomatensaftmedium konnte zwar eine höhere Aktivität von 8 U mL^{-1} erzielt werden, diese wurde jedoch erst am 24. Kulturtag erreicht. Nach 9 Tagen betrug die Aktivität ca. 1 U mL^{-1} (Liers *et al.* 2010).

Für eine erneute Aufreinigung wurde eine alternative Strategie verwendet, welche im größeren Maßstab durchgeführt wurde. Hierfür wurde zuerst der Überstand vom Myzel getrennt und anschließend für den ersten Trennschritt die hydrophobe Interaktionschromatographie angewandt. Nach einer Vorselektion auf 1 mL Säulen mit den Matrices Octyl Sepharose FF, Butyl Sepharose HP, Phenyl Sepharose (low sub) FF und Phenyl Sepharose (high sub) FF wurden mit der phenylmodifizierten Sepharose (high sub) FF die besten Ergebnisse erhalten. Für die anschließende präparative Aufreinigung wurde ein Säulenbett von 200 mL gewählt. Mittels HIC konnten bei einem geringen Verlust von 18% die gesamten Laccase- und Peroxidasefraktionen in einem diskreten Peak eluiert werden (Abb. 32).

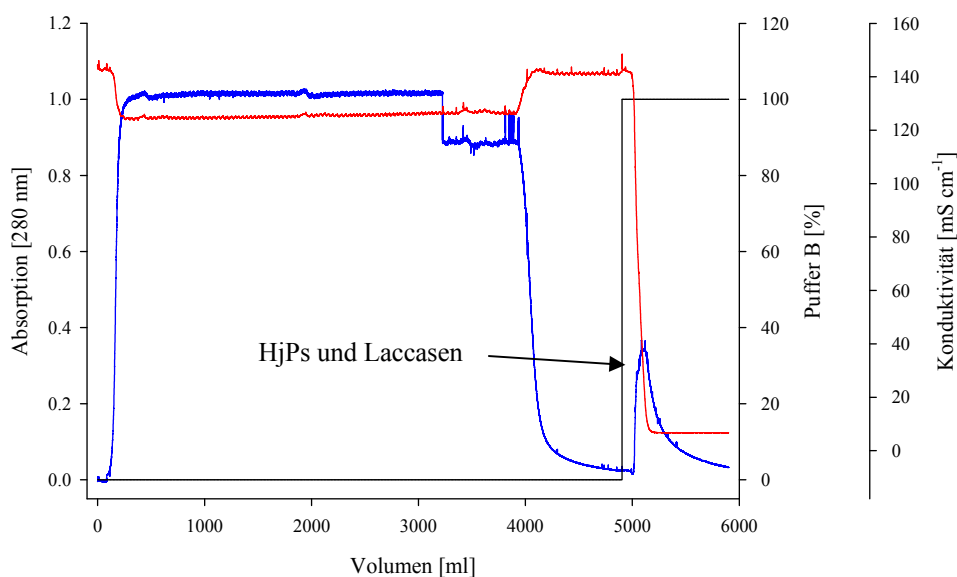


Abb. 32: HIC (Phenyl Sepharose FF) des *Haj*-Kulturüberstandes: blaue Linie, UV-Absorption bei 280 nm; rote Linie, Konduktivität [mS cm^{-1}]; schwarze Linie, Volumenanteil Elutionspuffer B [%]

Der große Vorteil dieser Methode gegenüber einer Anionenaustauschchromatographie (DEAE oder Q-Sepharose) war, dass unter den gewählten Bedingungen fast ausschließlich die Laccase- und Peroxidaseaktivität an dem Säulenmaterial band und der Großteil des Fremdproteins bereits im Durchbruch eluierte (Abb. 32). Dies ermöglichte es, große Mengen Kulturüberstand ohne eine Vorreinigung zu verarbeiten und ein schnelles Überschreiten der Kapazitätsgrenze des Säulenmaterials zu vermeiden.

Ein Problem dieser Methode war jedoch das große Probenvolumen, das aufgrund der geringen Flußrate von 4 mL min^{-1} die Analysenzeit auf bis zu 24 h verlängerte. Durch eine vorangestellte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung und anschließende Dialyse könnte das Probenvolumen und damit die Analysezeit deutlich reduziert werden. Auch über eine Ultrafiltration mittels Tangentialfluss könnte das Volumen drastisch verringert oder entsprechend mehr Material in einem Ansatz auf die Säule aufgetragen und getrennt werden. Aufgrund der sehr guten Selektivität des Säulenmaterials für die Laccasen und Peroxidasen könnte durch Verwendung einer größeren Partikelgröße, wie zum Beispiel von Phenyl Sepharose Big Beads (GE Healthcare), die Flußrate deutlich erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit der Optimierung wäre der Einsatz des Säulenmaterials in einem Batch-Ansatz, wodurch eine rasche Verarbeitung von großen Volumina erreicht werden könnte.

Anschließend wurden die Peroxidasen von den Laccasen durch Ionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) getrennt (Abb. 33). Mit den beiden Trennstufen, gelang es, in einem Durchlauf, ausgehend von 3L Kulturüberstand, eine Gesamtaktivität von 3900 U (ABTS, pH 4, 30 °C) mit einer Ausbeute von ca. 50% zu erhalten. Da das Hauptaugenmerk auf eine möglichst einfache und schnelle Methode zur Isolierung der Peroxidasefraktion gelegt wurde, wurde die Trennung der Isomere nicht weiter verfolgt. Die erhaltene spezifische Aktivität von 139 U mg^{-1} (ABTS, pH 4, 30°C) liegt zwar unter der gemessenen spezifischen Aktivität von Liers *et al.* (2010), die aber einen fünf-stufigen Aufreinigungsprozess für die Trennung der beiden Peroxidasen verwendeten.

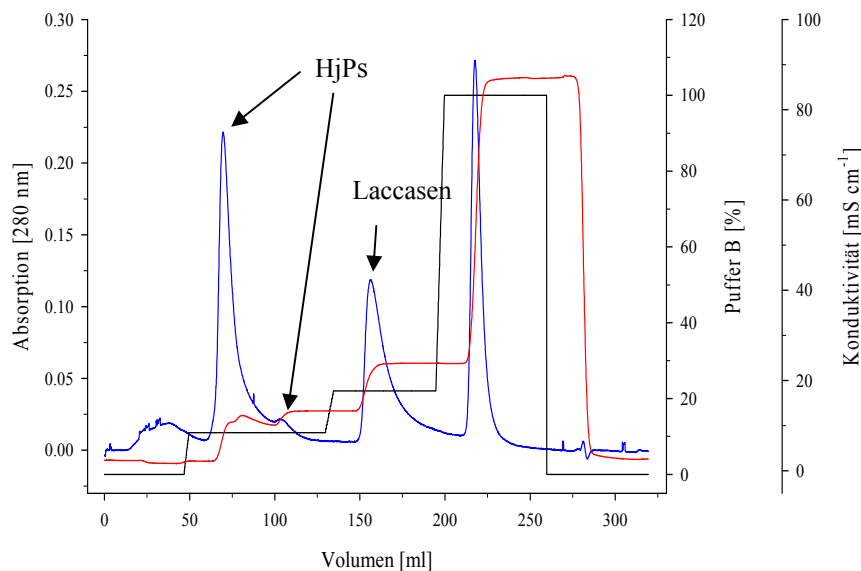


Abb. 33: IEX (Q-Sepharose) der peroxidase-aktiven HIC-Fraktion: blaue Linie, UV-Absorption bei 280 nm; rote Linie, Konduktivität [mS cm^{-1}]; schwarze Linie, Volumenanteil Elutionspuffer [%]

Nach Konzentration der Peroxidasefraktionen mittels Centrikon (10 kDa) konnte das typische Absorptionsmuster von Häm-Peroxidasen (Sugano 2009) mit λ_{max} bei 407, 506 und 636 beobachtet werden (Abb. 34). Die Fraktionen mit Laccaseaktivität wurden ebenfalls vereinigt und aufkonzentriert.

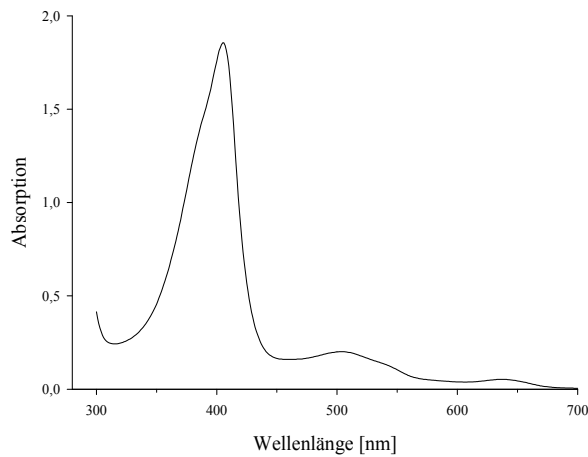


Abb. 34: Absorptionsspektrum der aufgereinigten HjPs

Die Güte der Aufreinigung der mit Ethanol induzierten HjPs und Laccasen wurde mittels SDS-PAGE und nachfolgender Färbung mit DMP und Coomassie sowie mittels IEF und anschließender Färbung mit TMBZ (pH 4) und ABTS (pH 4) analysiert (Abb. 35).

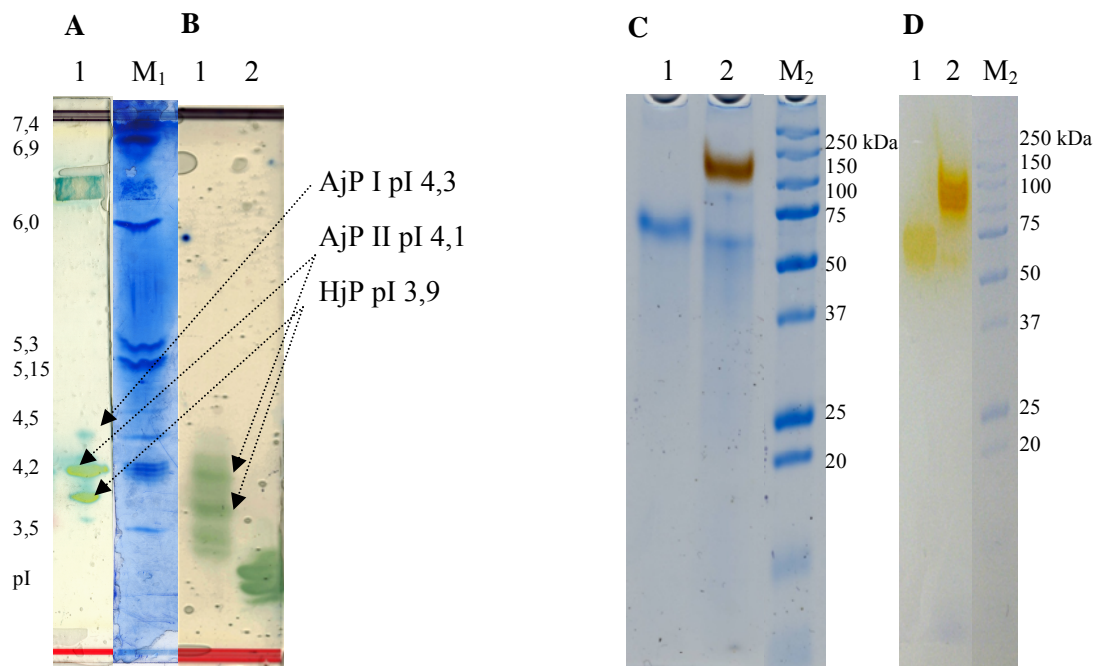


Abb. 35: Analyse der aufgereinigten Peroxidase- (1) und Laccase-Isoenzyme (2) über IEF mit anschließender TMBZ- (A) und ABTS-Färbung (B) sowie nach nat. SDS-PAGE und Coomassie-(C) und DMP-Färbung (D), Aktivitätsfärbungen wurden ohne Mn^{2+} , mit ABTS und H_2O_2 und im Falle der Laccasen ohne H_2O_2 durchgeführt, M₁) IEF Marker pH 3-10 Serva. M₂) Biorad All Blue

Wie bei der Induktion mit Xylidin wurde nach Aufreinigung der nat. SDS-PAGE nur eine Bande bei ca. 70 kDa detektiert. Im Gegensatz dazu konnten durch Induktion mit Ethanol weitere Isoenzyme auf dem IEF-Gel visualisiert werden, darunter die von Liers *et al.* beschriebenen AjP I bei pI 4,3 und AjP II bei 4,1 sowie die auch unter Xylidin induzierte HjP bei pI 3,9 (Abb. 35). Bei den beiden schwachen Banden unterhalb von pI 3,5 könnte es sich um weitere Isoenzyme oder um Isoformen mit unterschiedlichen Glykosidierungsmuster handeln (Lis and Sharon 1993). Möglicherweise könnten durch weitere Veränderung der Kultivierungsbedingungen andere Isoenzyme exprimiert werden. Der enge Verwandte *Auricularia delicata* zeigt mit seinen insgesamt 11 annotierten DyP-Isoenzymen das Potential dazu auf²⁹.

Durch die Induktion des *Haj* mit Xylidin und Ethanol konnten bereits bekannte sowie auch neue Mn-unabhängige Peroxidasen (HjPs) identifiziert werden. Mit einem zweistufigen Aufreinigungsprozess wurde eine einfache und schnelle Methode zur gleichzeitigen Isolierung beider DyPs erreicht. Mit den sequenzierten Peptiden P1-3 könnte unter Zuhilfenahme der bekannten genomischen DyP-Sequenzen aus *Auricularia delicata* in zukünftigen Arbeiten eine vollständige Amplifizierung der *Haj*-Peroxidasen gelingen.

3.5 DyP aus *Pleurotus sapidus*

Pleurotus sapidus, welcher ein bekannter Produzent von Laccasen ist (Linke *et al.* 2005), zeigte unter Induktion mit Eichenholz Peroxidaseaktivität (Kapitel 3.1.2). Ausgehend vom sequenzierten Genom des engen Verwandten *Pleurotus ostreatus*, in dem eine DyP bereits beschrieben wurde (Faraco *et al.* 2007), sollten Primer für die Sequenzierung der *PsaDyP* abgeleitet werden.

Um die Erfolgsaussichten zu erhöhen, wurden über ein Sequenzalignment bekannter DyPs homologe Bereiche identifiziert und für das Primerdesign verwendet (Abb. 36). Anschließend wurde ausgehend von *Pleurotus sapidus*-cDNA, welche aus der mRNA induzierter Kulturen (Tween 80 und Lignin) synthetisiert wurde, versucht, mit den von der DyP aus *Pleurotus ostreatus* abgeleiteten Primern (Tab. 16) ein *PsaDyP*-Fragment über PCR zu amplifizieren.

Nach einer Agarosegelelektrophorese konnten signifikante Banden mit den Primerkombinationen *Psa2for Psa1rev* (ca. 830 Bp) und *Psa3for Psa4rev* (ca. 500 Bp) erhalten werden (Abb. 37). Diese wurden aus dem Gel herausgeschnitten, kloniert und sequenziert.

²⁹ JGI, *Auricularia delicata* SS-5 v1.0, <http://genome.jgi-psf.org/Aurde1/Aurde1.home.html>, abgerufen am 15.05.2012

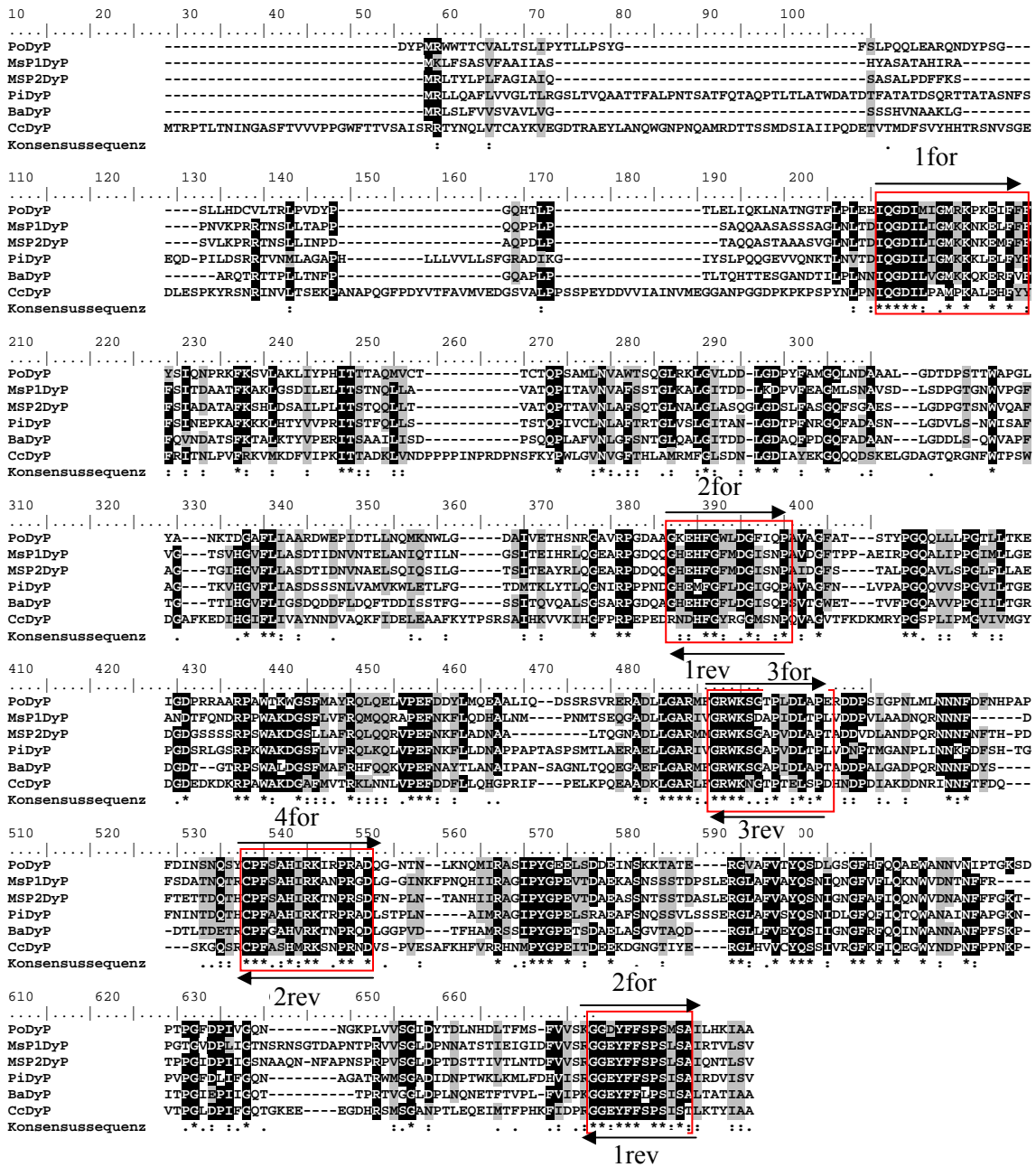


Abb. 36: Alignment folgender DyPs: PoDyP (*Pleurotus ostreatus*, GenBank: CAK55151.1), BaDyP (*Bjerkandera adusta*, GenBank: BAA77283.1), MsP1 DyP (*Marasmius scorodoni*, UniProtKB/Swiss-Prot: B0BK71.1), MsP2 DyP (*Marasmius scorodoni*, UniProtKB/Swiss-Prot: B0BK72.1) PiDyP (*Piriformospora indica*, GenBank: CCA72011.1), CcDyP (*Coprinopsis cinerea*, NCBI Reference Sequence: XP_001832231.1), zur Bestimmung konservierter DyP-Bereiche zur Ableitung von Primern (rot umrandet)

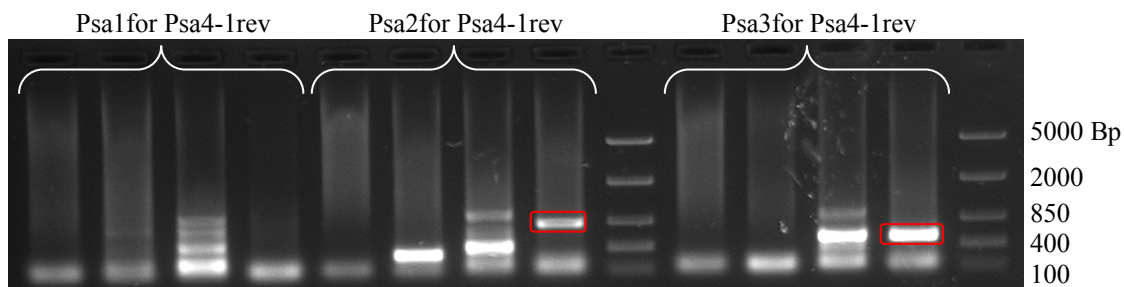


Abb. 37: Agarosegelelektrophorese der *Psa*-DyP-PCR-Amplifikate: rot umrandete Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, Marker: FastRuler™ Middle Range DNA Ladder (Fermentas)

Nach Datenbanksuche mittels BLAST konnten im 830 Bp großen Fragment, welches für 273 AS kodiert, konservierte DyP-Domänen identifiziert werden. Zu der beschriebenen DyP aus *Pos* besaß das Fragment eine sehr hohe Homologie (97% Identität).

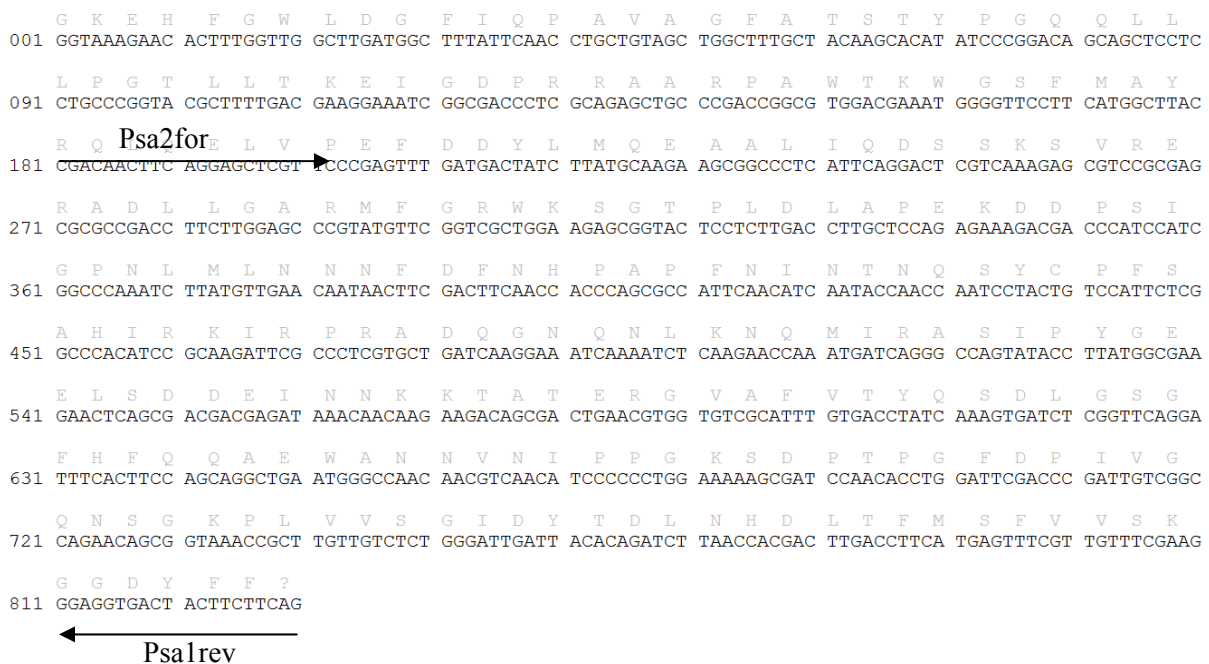


Abb. 38: Mit den Primern Psa2for und Psa1rev amplifiziertes *Psa*DyP-Fragment

Somit konnte erfolgreich eine *Pleurotus sapidus*-DyP-Sequenz amplifiziert werden (Abb. 38). Durch weitere PCR-Amplifizierung zum 5'- und 3'-Ende mit den 5'-PCR- und 3'-PCR-Primern könnte in weitergehenden Arbeiten die komplette Sequenz erhalten werden. Anschließend bestünde die Möglichkeit, die DyP im *E.coli*-Expressionssystem, wie bereits für die MsP2 aus *Marasmius scorodonium* beschrieben (Zelena *et al.* 2009b), heterolog zu exprimieren und zu charakterisieren. Dieses Verfahren könnte noch auf weitere *Pleurotus*-Spezies ausgeweitet werden, um neue DyPs zu identifizieren.

3.6 Oxidative Quervernetzung von Ferulasäure

Mit Ferulasäure veresterte Arabinoxylane sind eine der Zielsubstanzen im Teig, welche durch Quervernetzung eine Verbesserung der rheologischen Eigenschaft des Teiges hervorrufen können. Freie Ferulasäure wird dabei schnell durch Laccasen und Peroxidasen zu verschiedenen Di- (Abb. 39) und Trimeren umgesetzt (El Agha *et al.* 2008; Kupriyanovich *et al.* 2007; Ward *et al.* 2001).

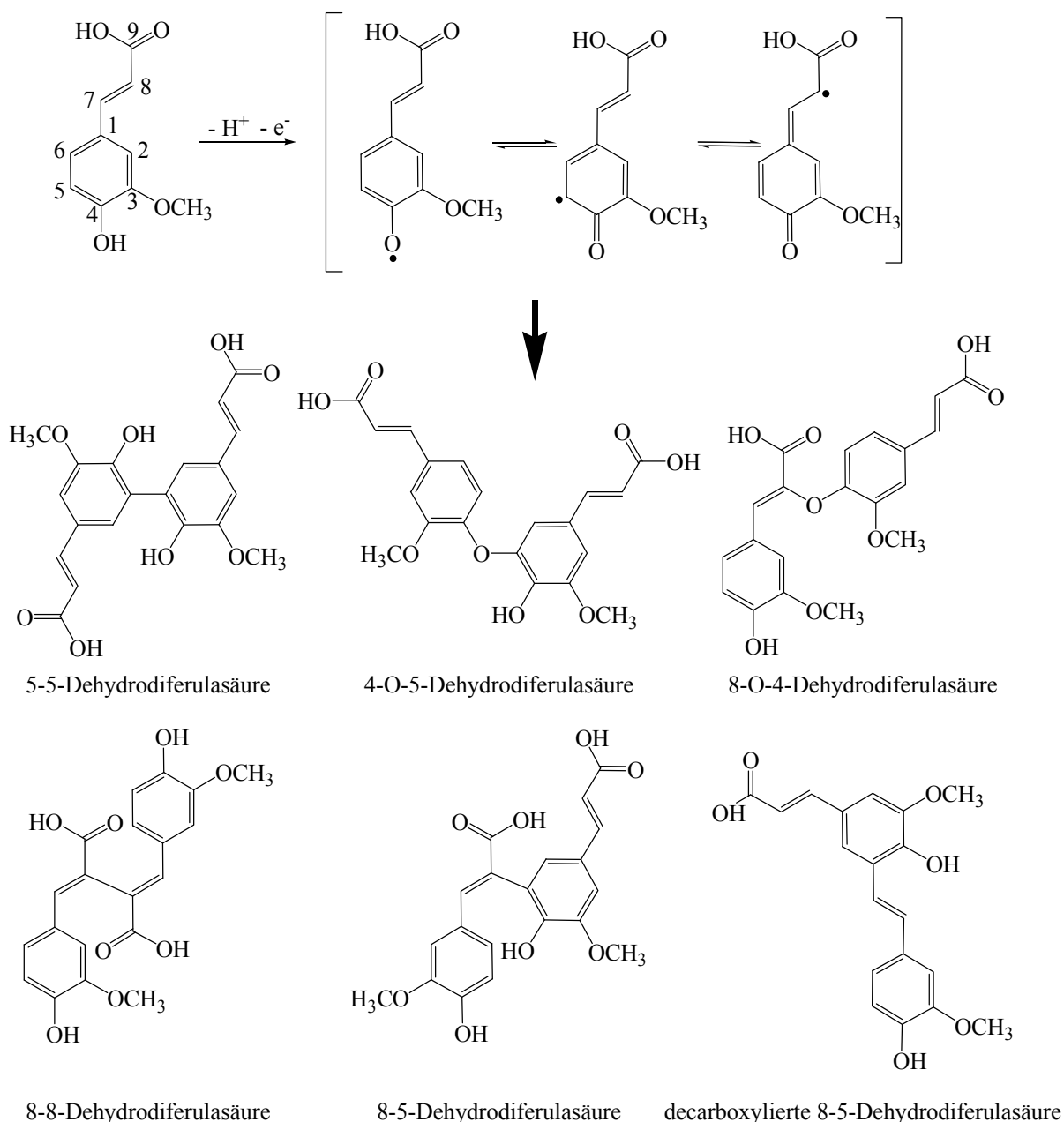


Abb. 39: Beispiele möglicher Ferulasäuredimere nach oxidativer Vernetzung (Bunzel 2010; Ward *et al.* 2001)

Auch die Bildung von Hydrokolloiden durch oxidative Gelierung von phenolhaltigen Zuckern wie Zuckerrübenpektin (Micard and Thibault 1999; Norsker *et al.* 2000) und Arabinoxylanen (Figuroa-Espinoza *et al.* 1999; Ng *et al.* 1997) ist eine für die Lebensmittelindustrie relevante Anwendung. Bei beiden Zuckern wird die Gelierung durch oxidative Quervernetzung der an den Zuckerresten veresterten Ferulasäure durch Peroxidasen und Laccasen (Kuuva *et al.* 2003; Norsker *et al.* 2000) katalysiert. Dabei werden vorrangig 5-5, 8-O-4, 8-5 und 8-8 Ferulasäuredehydrodimere (Figuroa-Espinoza and Rouau 1998; Oosterveld *et al.* 2000; Oosterveld *et al.* 1997) aber auch Trimere gebildet (Carvajal-Millan *et al.* 2005).

Um das Vermögen der Lcc1 aus *Mgi* und der isolierten Peroxidasen aus *Haj* (im folgendem als HjP bezeichnet) hinsichtlich der Quervernetzung zu untersuchen, wurde ebenfalls freie Ferulasäure als Modellsubstrat verwendet und die Produkte mittels LC-ESI(-)-MS untersucht. Ein Ansatz mit 2 mM Ferulasäure und 0,02 U mL⁻¹ Enzym wurde bei 24 °C inkubiert und in definierten Abständen wurden Proben genommen. Die Zuordnung der gebildeten Produkte erfolgte dabei über literaturbekannte LC-ESI(-)-MS Spektren für Dimere (Andreasen *et al.* 2000; El Agha *et al.* 2008; Parr *et al.* 1996; Ralph *et al.* 1994), welche eine Molmasse von 386 m/z [M-H] besitzen, Trimere (Bunzel *et al.* 2006; Bunzel *et al.* 2003, 2005; Funk *et al.* 2005; Rouau *et al.* 2003) mit einer Masse von 578 m/z [M-H] und Tetramere (Bunzel *et al.* 2006) mit einer Masse von 769 [M-H].

Nach Inkubation von Ferulasäure mit Lcc1 sowie mit HjP wurden ähnliche Produktmuster erzielt und folgende Di-, Tri- und Tetramere postuliert (Tab. 29 und Abb. 40).

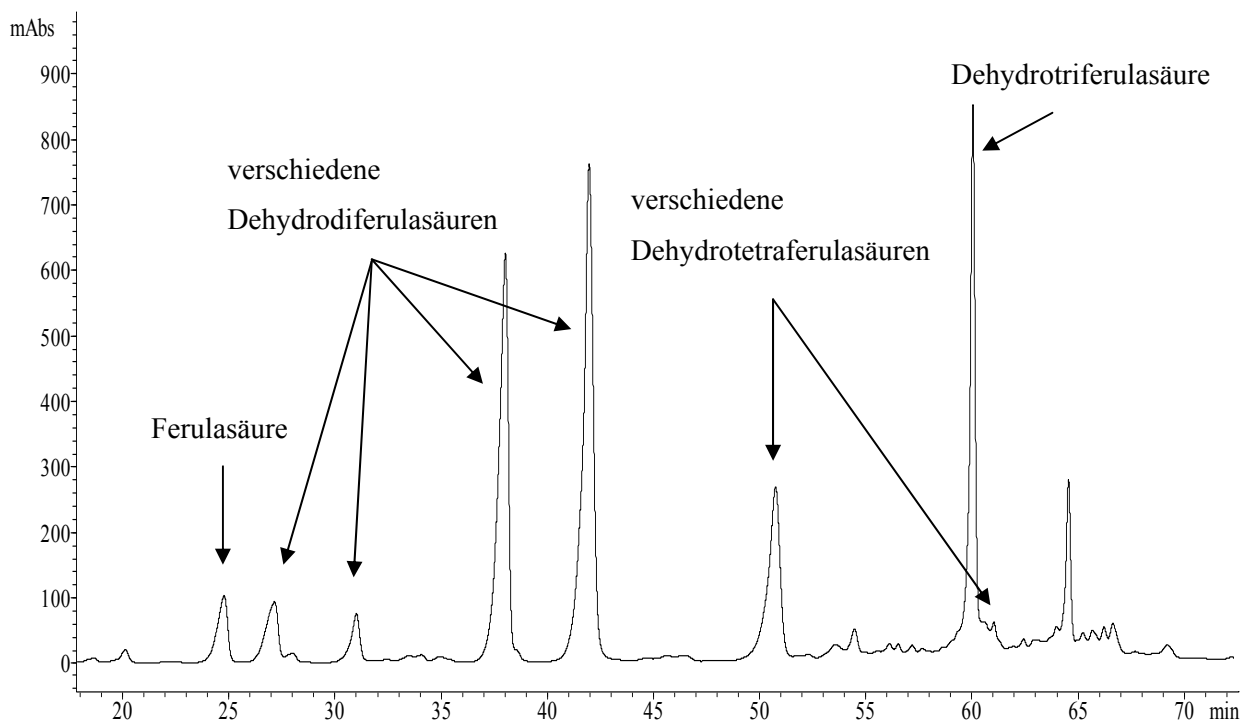


Abb. 40: Postulierte Quervernetzungsprodukte von Ferulasäure mit LC-ESI(-)-MS/MS, Bedingungen: 2 mM Ferulasäure, 0,023 U mL⁻¹ Lcc1, Inkubation für 80 min 24 °C

Tab. 29: Durch LC-ESI(-)-MS erhaltene spektrale Daten der Umsetzungsprodukte

Postulierte Produkte	Retentionszeit [min]	ESI(-)-MS-Ionen [m/z]
Dehydrodiferulasäure I	27	385 [M-H]
Dehydrodiferulasäure II	31	341 [M-H]
Dehydrodiferulasäure III	38	385 [M-H] (100), 341 [M-H-CO ₂] (33)
Dehydrodiferulasäure IV	42	385 [M-H] (100), 341 [M-H-CO ₂] (100)
Dehydrotriferulasäure V	51	551 [M-H]
Dehydrotriferulasäure VI	60	533 [M-H]
Dehydrotetraferulasäure VII	60	725 [M-H]
Dehydrotetraferulasäure VIII	61	769 [M-H]

Vier verschiedene Dimere (**I-IV**) mit Retentionszeiten von 27, 31, 38 und 42 min konnten detektiert werden (Tab. 29 und Abb. 40). Für das Dimer **II** nach 31 min wurde ein Molekül-Ion von 341 m/z [M-H] detektiert, was auf ein decarboxyliertes Dimer hindeutet, das während der enzymatischen Umsetzung gebildet wird. Dies ist ein häufig beobachtbarer Effekt bei der Oxidation von freier Ferulasäure durch Peroxidasen (Liu *et al.* 2005; Ward *et al.* 2001). Eine quantitative Decarboxylierung von Ferulasäure unter den MS-Bedingungen in der Ionenquelle kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Die Reaktionsprodukte mit den Retentionszeiten von 27 min (**I**), 38 min (**III**) und 42 min (**IV**) konnten ebenfalls eindeutig als Dimere klassifiziert werden (Tab. 29). Eine Auswahl von in der Literatur beschriebenen möglichen Ferulasäuredimeren ist in Abb. 39 dargestellt.

Nach 51 min eluierte ein Trimer (**V**), welches im MS-Spektrum ein Molekül-Ion bei 551 m/z [M-H] aufwies. Eine 8-8(Tetrahydrofuran)/5-5-Dehydrotriferulasäure (Abb. 41) mit einem Molekül-Ion von 595 m/z [M-H], bei der unter Wasseranlagerung ein intramolekularer Tetrauranring gebildet wurde, spaltete in der ESI(-)-MS ebenfalls CO₂ ab und führte zur Bildung eines Ions mit einer Molekülmasse von 551 m/z [M-CO₂-H] (Bunzel *et al.* 2006).

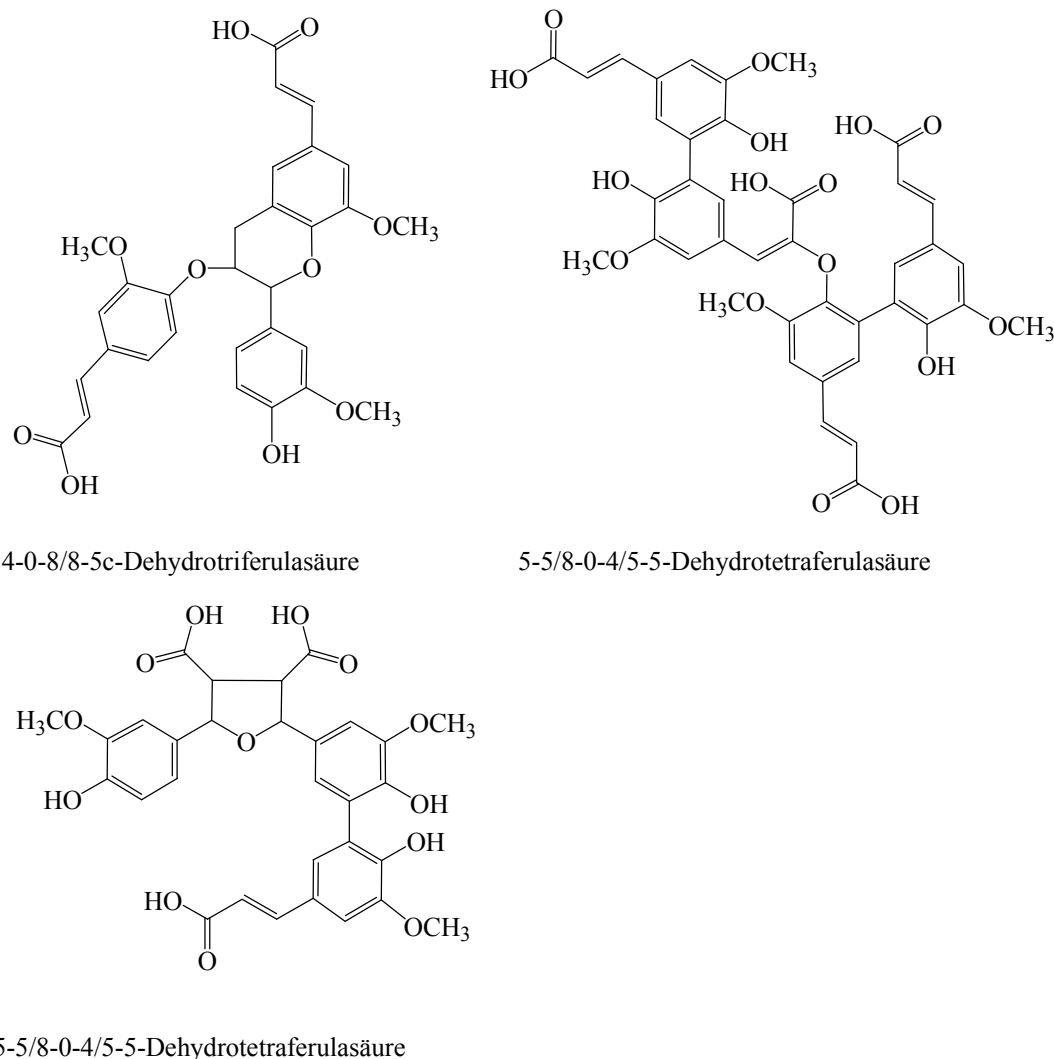


Abb. 41: Beispiele für Tri- und Tetramere der Ferulasäure (Bunzel 2010; Liu *et al.* 2005)

Auch hier kann nicht abschließend entschieden werden, ob die Decarboxylierung tatsächlich nur während der enzymatischen Quervernetzung erfolgte. Der prominente Peak bei ca. 60 min besteht aus zwei Einzelsubstanzen, einem Trimer (**VI**, 533 m/z [M-H]) und einem Tetramer (**VII** 725 m/z [M-H]). Hier handelt es sich um die jeweils decarboxylierten Formen der Tri- und Tetramere. Nach 61 min eluierte ein Trimer (**VIII**) mit einem Molekül-Ion von 769 m/z [M-H] (Abb. 40). In Abb. 41 sind zwei Beispiele bekannter Trimere dargestellt.

Höhermolekulare Aggregate konnten mittels LC-ESI(-)-MS nicht detektiert werden, da diese im gewählten Lösungsmittelgemisch nicht mehr löslich sind. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung der Lcc1 und HjP hinsichtlich deren Quervernetzungsvermögens. Daher erfolgte die Identifizierung der Quervernetzungsprodukte lediglich anhand der Interpretation ihrer Massenspektren und über den Vergleich mit Literaturdaten. Auf eine aufwendige Isolierung und anschließende Identifizierung über NMR wurde verzichtet, da der in Abb. 39 dargestellte Bildungsweg als bestätigt gelten kann.

Beide eingesetzten Enzyme besitzen gegenüber FA zwei Optima von pH 3 und pH 5 (Abb. 42). Bei Laccasen treten bei der pH-abhängigen Oxidation von Phenolen zwei gegensätzliche Effekte auf: die Inhibierung durch Hydroxylionen bei höheren pH-Werten und die Erniedrigung des Redoxpotentials der Phenole durch Deprotonierung (Xu 1997). Nicht-phenolische Substrate werden daher eher bei niedrigeren pH-Werten umgesetzt (pH 2, ABTS, Lcc1), phenolische unter anderem in Abhängigkeit ihres pK_a -wertes (pH 4, DMP, Lcc1).

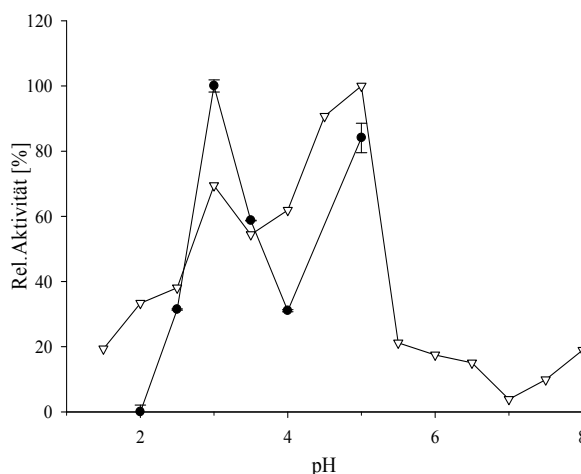


Abb. 42: Relative Enzymaktivität der Oxidation von Ferulasäure durch Lcc1 (Kreis) und HjP (Dreieck) in Abhängigkeit vom pH-Wert: Bestimmung über HPLC nach Umsatz von 1 mM Ferulasäure bei 30 °C für 20 min in 50 mM Citrat-Phosphat-Puffer, Aufnahme des pH-Optimums der HjP unter Zugabe von 0,2 mM H₂O₂ in Einfachbestimmung

Allgemein kann bemerkt werden, dass Ferulasäure durch die Lcc1 rasch umgesetzt wurde. 0,1 U mL⁻¹ Lac1 (ABTS pH 3, 30 °C) setzten 0,015 μmol min⁻¹ Ferulasäure beim optimalen pH-Wert von 3,0 um. Die HjP zeigte deutlich höhere kinetische Werte und setzte bei einer Konzentration von 0,02 U mL⁻¹ (pH 4.0 ABTS, 30 °C) bei pH 5 Ferulasäure mit einer Geschwindigkeit von 0,017 μmol min⁻¹ um. Kupriyanovich *et al.* (2007) bestimmten die Umsatzraten der Oxidation von Ferulasäure durch eine Laccase aus *Trametes versicolor* und die HRP. Da die erhaltenen Ergebnisse nicht auf die Enzymkonzentration normiert wurden, ist ein Vergleich mit den in dieser Arbeit beobachteten Aktivitäten nicht möglich.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Lcc1 Ferulasäure effektiv umsetzt, wurden aufgereinigte Laccase-Chargen im Rahmen eines Projektes des Forschungskreises der Ernährungsindustrie (FEI)³⁰ dem Hans-Dieter-Belitz-Institut für Mehl- und Eiweißforschung (HBBI) für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Im Rahmen des Projektes wurde zum einen die Quervernetzung der aus Mehl isolierten wasserlöslichen Arabinoxylane und die Änderung der Backeigenschaften von Teigen nach

³⁰ Kurzbericht AiF 15305 N, http://www.fei-bonn.de/projekte/projektdatenbank.html/fv_15305/

Behandlung mit Laccasen untersucht. Die isolierte Laccase aus *Mgi* vernetzte wasserlösliche Arabinoxylane effektiv zu höhermolekularen Aggregaten (Meyer *et al.* 2010). In Teigzugversuchen führte die Applikation der Lcc1 zu einer Erhöhung des Dehnwiderstandes und der Zunahmen der Teigfestigkeit, was zu einer Verbesserung der Teigeigenschaft führte. Dies ist übereinstimmend mit den Untersuchungen mit einer Laccase aus *Trametes hirsuta* (Selinheimo *et al.* 2006). Im Mikrobackversuch führte die Zudosierung von Lcc1 zu einer Verringerung der Klebrigkeit und damit zu einer verbesserten Teigbereitung und Verarbeitbarkeit. Dadurch wurde die Gärzeit bis zum Erreichen des Backoptimums gesenkt³⁰.

Die Bildung von Hydrokolloiden durch oxidative Gelierung von phenolhaltigen Zuckern (z.B. Zuckerrübenpektin) ist hinsichtlich der Anwendung in der Lebensmittelindustrie ebenfalls interessant. In weiterführenden Arbeiten (Matthes 2011) wurde anhand des Modellsubstrates Zuckerrübenpektin die Eignung der Laccase Lcc1 zur oxidativen Gelierung von Hydrokolloiden auf Polysaccharidbasis erfolgreich nachgewiesen. Eine 2%ige Zuckerrübenpektinlösung bildete dabei unter Zugabe von 5 U Laccase pro Gramm Zuckerrübenpektin bei Raumtemperatur nach circa 30 min ein selbsttragendes Gel (Matthes 2011). Die beobachteten Optima hinsichtlich der Temperatur (50 °C) und des pH-Werts (4,5) waren mit denen der Oxidation von DMP vergleichbar (Kapitel 3.2.3). Auch eine oxidative Quervernetzung von Proteinen, die ebenfalls Zielsubstanzen im Teig darstellen, welche durch Quervernetzung eine Verbesserung der rheologischen Eigenschaft hervorrufen können, konnte anhand des Modellproteins β -Casein beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass die Inkubationen von β -Caseinlösungen mit Lcc1 zu einer Abnahme der Monomerkomponenten führte und höhermolekulare Moleküle auftraten (Matthes 2011).

Diese beiden Anwendungsfälle zeigen das Potential der in dieser Arbeit aufgereinigten Laccase aus *Meripilus giganteus* für die Anwendung in der Lebensmittelindustrie. Der Einsatz von Laccase in den genannten Anwendungsfällen wurde aus praktischen Gründen gegenüber der Peroxidase bevorzugt, da keine zusätzliche Dosierung von H₂O₂ notwendig war.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für Oxidoreduktasen ist die Spaltung von höhermolekularen Stoffen wie z.B. Carotinoiden zu aromaaktiven Komponenten (Karrasch *et al.* 2010; Zelena *et al.* 2009a).

3.7 Untersuchungen zum Abbau von Curcumin durch Lcc1 und H₂P zur Gewinnung von Vanillin

3.7.1 Abbau von Curcumin

Im Folgenden wurde untersucht, ob durch die enzymatische Spaltung der natürlichen Ressource Curcumin durch Laccasen oder Peroxidasen Vanillin gewonnen werden kann.

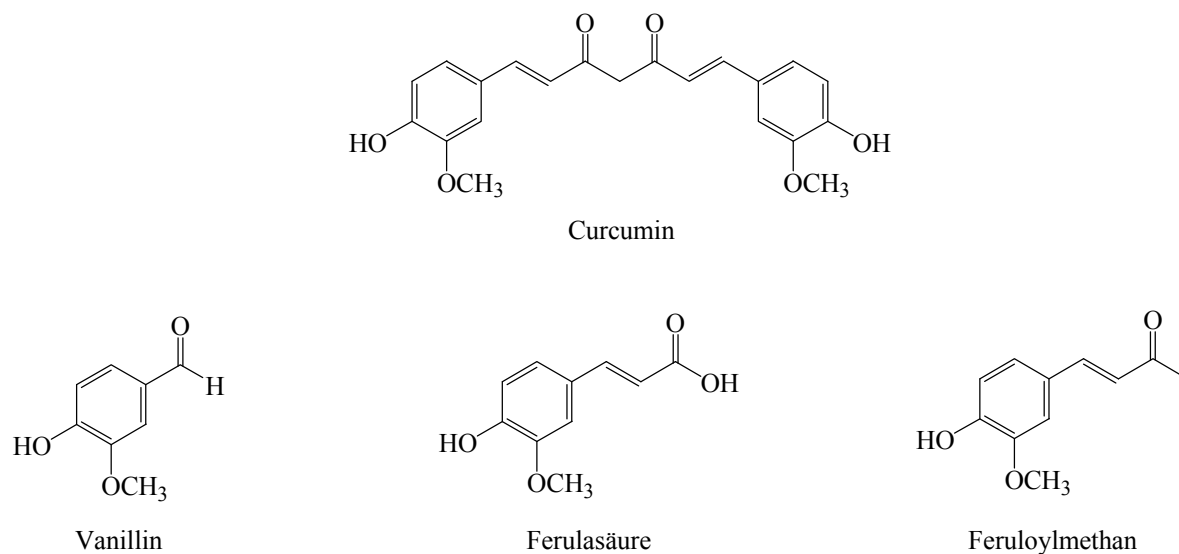


Abb. 43: In der Literatur beschriebene Degradationsprodukte des Curcumins (Griesser *et al.* 2011; Masuda *et al.* 1999)

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Lcc1 wie eine Laccase aus *Streptomyces coelicolor* (Oestergaard and Wu 2007) in der Lage war, Curcumin teilweise zu entfärben. Nach Analyse der gebildeten Spaltprodukte über GC-MS konnte Vanillin in Spuren detektiert werden. Aufgrund dessen wurde die oxidative Spaltung von Curcumin genauer betrachtet. Beachtet werden muss, dass das verwendete Curcuminpräparat aus den drei Curcuminoiden Demethoxycurcumin, Bisdemethoxycurcumin und Curcumin bestand. Für die folgenden Versuche wurden die einzelnen Curcuminoiden nicht isoliert, sondern als Gemisch eingesetzt. Nachfolgend wird der Begriff Curcumin als Bezeichnung für dieses Gemisch verwendet. Da Curcumin im sauren pH-Bereich (pH 3) nicht ausreichend in Lösung gebracht werden konnte, wurde Ethanol als Lösungsvermittler eingesetzt. Um den Einfluss des Ethanols auf die Aktivität der Lcc1 zu untersuchen, wurde die Änderung der DMP-Aktivität in Abhängigkeit der Ethanolkonzentration bestimmt (Abb. 44).

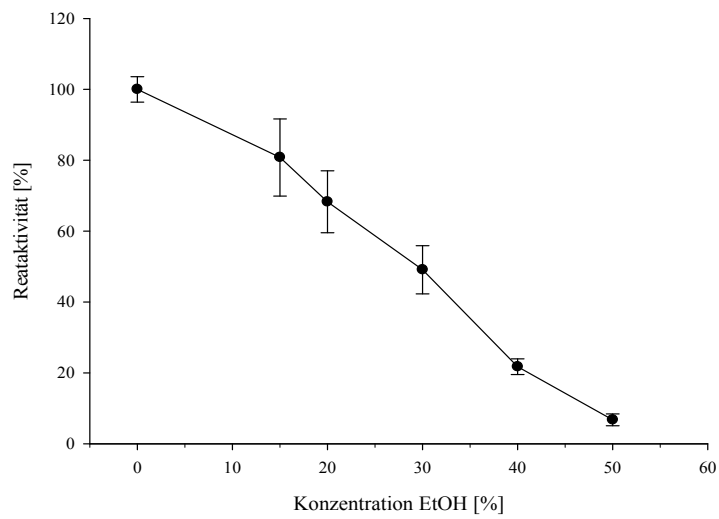


Abb. 44: Abhängigkeit der Lcc1 Aktivität von der Ethanol-Konzentration, DMP-Assay (pH 4, 30 °C)

Da eine Restaktivität von ca. 50% bis zu einem Gehalt von 30% Ethanol (v/v) erhalten werden konnte und diese durch weiterer Erhöhung der Ethanol-Konzentration schnell abfiel, wurde eine Konzentration von 30% für die Umsetzung von Curcumin verwendet.

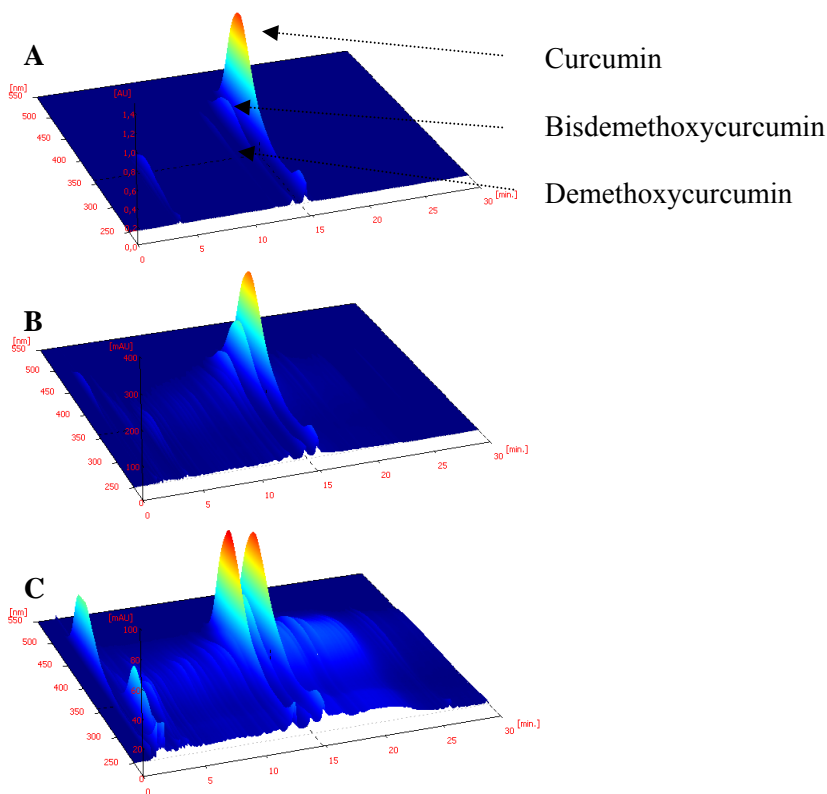


Abb. 45: HPLC-DAD-Analyse der Abbauprodukte der Curcuminoiden (Demethoxycurcumin, Bisdemethoxycurcumin, Curcumin) durch Lcc1 nach 0 min (A), 30 min (B) und 210 min (C) in 30% Ethanol (pH 3, 30 °C, 0,25 mM Curcumin, 0,034 U mL⁻¹ Lcc1)

Wie in Abb. 45 zu sehen, wurde Curcumin rasch umgesetzt und mit fortschreitender Inkubationsdauer eine Vielzahl an Abbauprodukten gebildet. In der Literatur werden Ferulasäure, Feruloylmethan und Vanillin als Spaltprodukte des Curcumins (Abb. 43) beim Zerfall in basischer Umgebung (Griesser *et al.* 2011; Pfeiffer *et al.* 2003; Roughley and Whiting 1973; Tønnesen and Karlsen 1985; Wang *et al.* 1997) sowie durch UV-Bestrahlung (Khurana and Ho 1988; Tønnesen *et al.* 1986) oder Umsatz mit Radikalbildnern (Masuda *et al.* 1999) beschrieben. Hierbei ist die Hydrolyse von Curcumin in 5% (w/v) NaOH, bei der eine Ausbeute von 76% Vanillin erreicht werden konnte, hervorzuheben (Roughley and Whiting 1973).

Ebenfalls wurde die Bildung von Dimeren, durch Oxidation mit Radikalbildnern (Masuda *et al.* 2002) oder biomimetische Oxidation (P_{450} Modellsystem) durch H_2O_2 und 5,10,15,20-Tetraarylporphyrinato-Fe(III) (Chauhan *et al.* 2003), beschrieben. Masuda *et al.* (2002) konnten die gebildeten Dimere nur in reinem DMSO in Lösung bringen, was die außerordentlich schlechte Löslichkeit der Curcumin-Dimere widerspiegelt. Bei der Umsetzung von Curcumin mit Lcc1 und H₂P wurde ein gelblich bis braunes Präzipitat beobachtet, welches unter den für die LC-ESI(-)-MS-Analyse gewählten Bedingungen nicht in Lösung gebracht werden konnte. Hierbei könnte es sich um die in der Literatur beschriebenen Dimere oder um weitere Polymerisationsprodukte des Curcumins handeln.

Da in dieser Arbeit ein Gemisch der Curcuminoide eingesetzt wurde, können entsprechend auch demethoxylierte Degradationsprodukte entstanden sein. Um die flüchtigen Spaltprodukte genauer zu untersuchen, sollte der Ansatz vergrößert werden und nach Extraktion über eine fraktionierte Destillation eingengt werden. Da sich aber herausstellte, dass der Einsatz von großen Mengen Ethanol hierfür nicht geeignet und eine Extraktion über Festphasenextraktion (SPME, CAR/PDMS, Daten nicht gezeigt) nicht erfolgreich war, wurde versucht, das Ethanol durch Diethylether und *tert*-Butylmethylether zu ersetzen und in einem Zwei-Phasen-System zu arbeiten. Nach Inkubation bei 40 °C für 40 h unter Einsatz von $0,8 \text{ U mL}^{-1}$ Lcc1 konnte eine quantitative Konversion des Curcumins in MTBE und Diethylether beobachtet werden. Die höchsten Umsatzraten wurden unter Einsatz von Diethylether/ H_2O (50/50 (v/v)) bei einem pH-Wert von 5,5 erhalten (Abb. 46). Bei einem pH-Wert von 3 konnte keine Abnahme der Curcuminkonzentration beobachtet werden. Daher wurden alle weiteren Untersuchungen bei pH 5,5 durchgeführt.

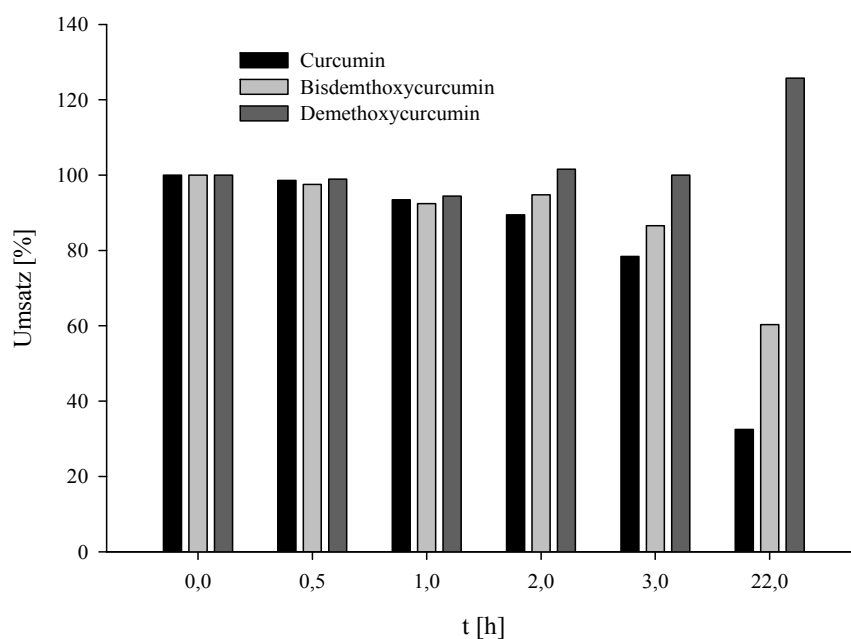


Abb. 46: Umsatz der Curcuminoiden (500 μM) in Diethylether/ H_2O (50/50 (v/v)) bei 40 °C und pH 5,5 (50 mM NaAcetat-Puffer) mit 0,34 U mL^{-1} Lcc1, Einfachbestimmung

Es konnten deutlich voneinander abweichende Umsatzraten der drei Curcuminoiden in der Reihenfolge Curcumin > Bisdemethoxycurcumin > Demethoxycurcumin (Abb. 46) beobachtet werden. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, dass die Methoxygruppe an Position zwei des phenolischen Ringsystems das Redoxpotential erniedrigt, was zu einer schnelleren Umsetzung durch Laccasen führt (Tadesse *et al.* 2008). Die anscheinende Zunahme der Konzentration des Demethoxycurcumins ist auf die Bildung von Produkten zurückzuführen, die mit Demethoxycurcumin co-eluierten.

Allgemein ist die Aktivität der Lcc1 in dem gewählten Lösungsmittelgemisch Diethylether/Wasser (50/50 (v/v)) deutlich geringer als in 30% (v/v) Ethanol und beträgt im Vergleich nur ca. 10%. Um die durch die Oxidation gebildeten flüchtigen Produkte näher zu charakterisieren, wurde der Ansatz auf 10 mL vergrößert. Nach Vigreux-Destillation konnten die möglichen Spaltprodukte Vanillin und Feruloylmethan gefunden werden. Das Vermögen von Laccasen, Phenole, wie in dieser Arbeit am Beispiel der Ferulasäure gezeigt (3.6), rasch zu höhermolekularen Produkten zu polymerisieren, kann zu der geringen Produktbildung geführt haben. Diese Hypothese wird unterstützt durch die sehr gute Transformation von Vanillin durch Peroxidasen, wie der *horseradish peroxidase* (HRP), und Laccasen zu Divanillin (Baumgartner and Neukom 1972; Lahtinen *et al.* 2009; Nishimura *et al.* 2010). Daher sollte untersucht werden, ob Vanillin durch die verwendeten Oxidoreduktasen umgesetzt wird.

3.7.2 Quervernetzung von Vanillin

Sowohl mit der Laccase aus *Mgi* als auch der DyP aus *Haj* konnte eine rasche Quervernetzung von Vanillin zu bisher nicht bekannten höhermolekularen Di-, Tri- und Tetrameren und zu Divanillin, welches ebenfalls in geringen Mengen bei der Reifung der Vanille-Schote durch verbliebene Peroxidaseaktivität entstehen kann (Gatfield *et al.* 2006), beobachtet werden (Abb. 48). Analog zur Quervernetzung von Ferulasäure sollten bevorzugt Verknüpfungen über eine 5-5- und 4-O-5-Bindung entstehen (Abb. 47). Durch LC-ESI(-)MS/MS sollten die gebildeten Reaktionsprodukte näher untersucht werden.

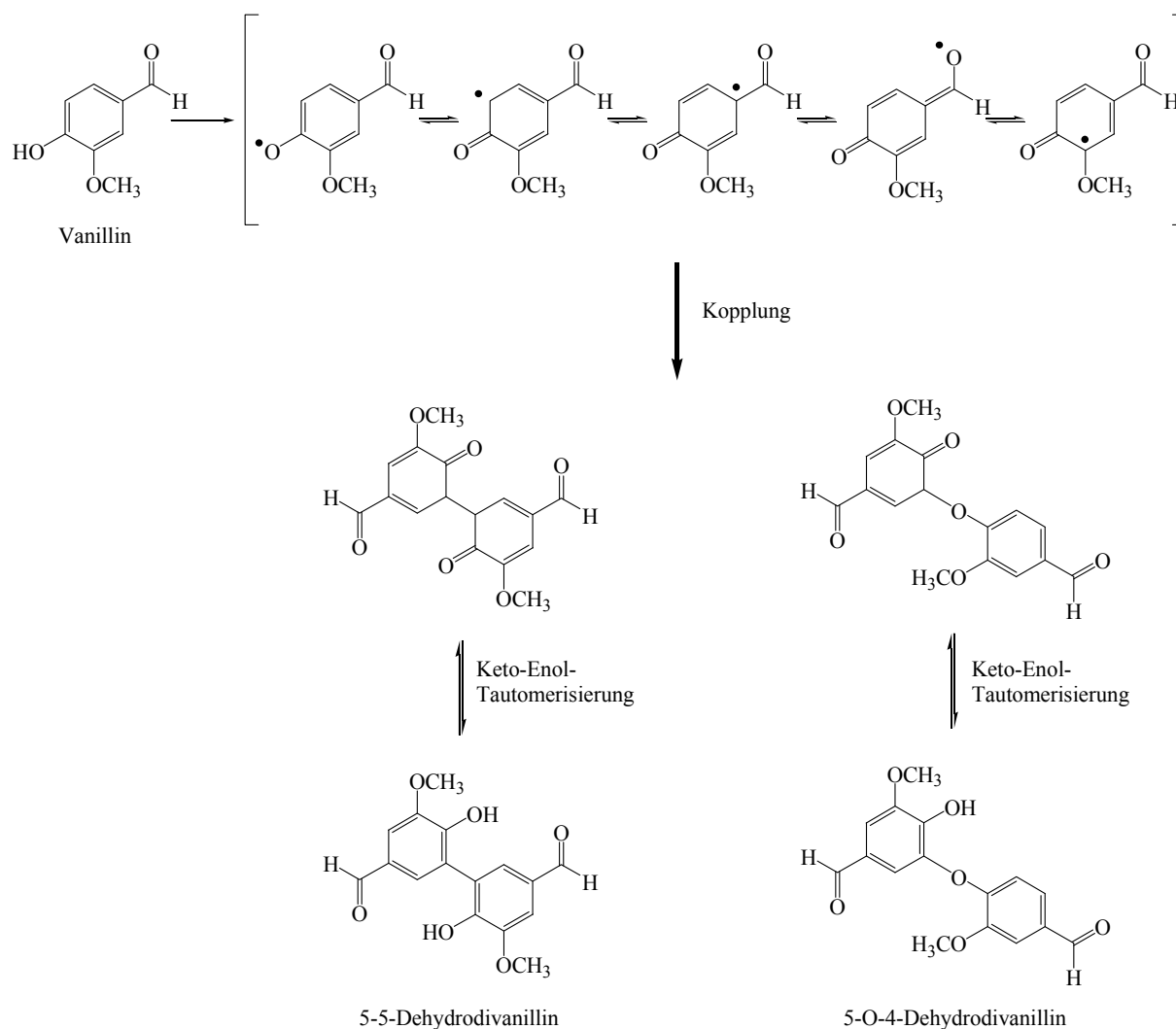


Abb. 47: Bildung der 5,5- und 5-O-4-Dehydrodivanilline

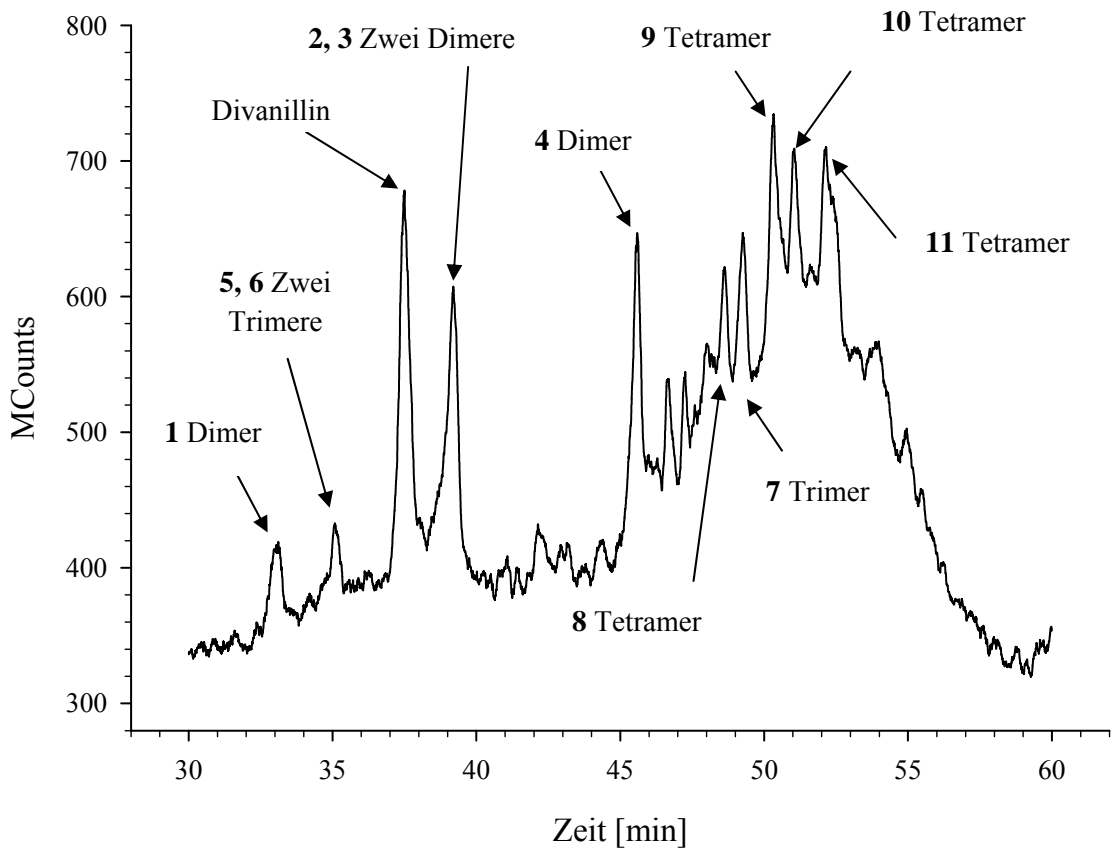


Abb. 48: LC-ESI(-)-MS Chromatogramm der Reaktionsprodukte nach Inkubation (30 min) von Vanillin bei pH 5 und 30 °C mit HjP

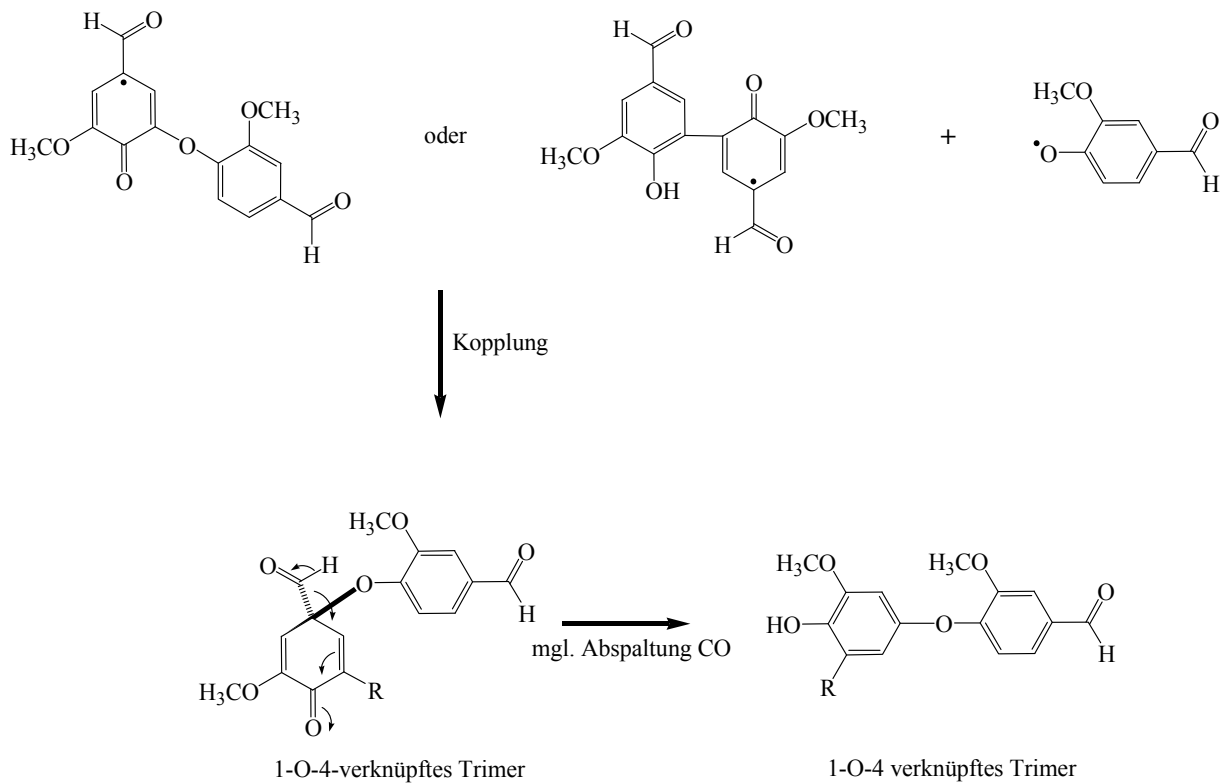
Eine Analyse sämtlicher Reaktionsprodukte über GC-EI-MS/MS war auch nach Derivatisierung (Silylierung oder Acetylierung) nicht erfolgreich und wurde daher nicht weiter verfolgt. In Tab. 30 sind die Fragmentierungsmuster der auffälligsten Peaks der LC-ESI(-)-MS/MS dargestellt.

Tab. 30: Durch ESI(-)-MS (-40 V Kapillarspannung) und durch kollisionsinduzierte Fragmentierung einzelner Ionen durch ESI(-)-MS/MS (-40 V Kapillarspannung, 15 V Kollisionsenergie) erhaltene Fragmentierungsmuster ausgewählter Oligomerisierungsprodukte des Vanillins

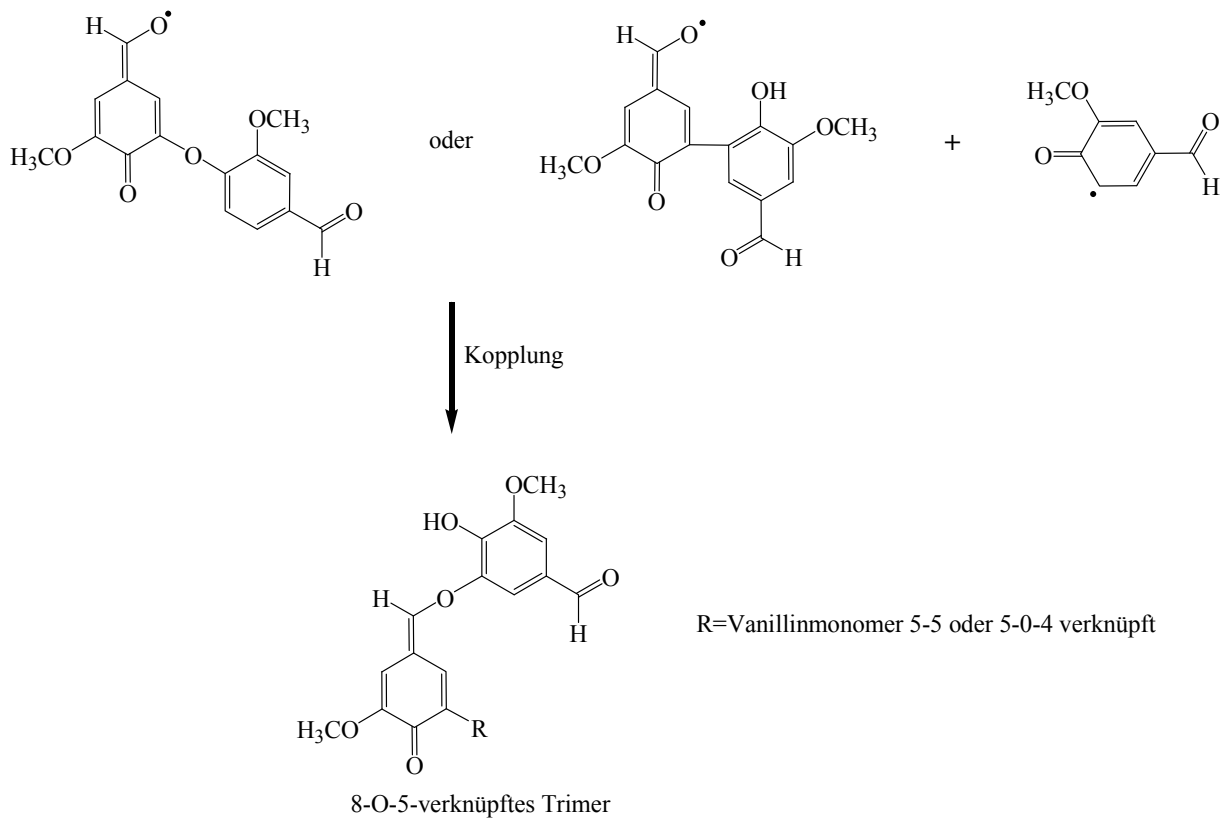
Stoffe	ESI(-)-MS-Fragment-Ionen [m/z]	ESI(-)-MS/MS Spaltprodukte [m/z]
Vanillin	151 (100)	151: 136 (100), 151 (14)
Divanillin	301 (100)	301: 301 (100), 286 (60)
Produkt 1	287 (100)	287: 287 (100), 272 (60)

Stoffe	ESI(-)-MS-Fragment-Ionen [m/z]	ESI(-)-MS/MS Spaltprodukte [m/z]
Produkt 2 und 3	423 (100), 451 (90), 467 (90)	451: 451 (100), 423 (20), 408 467:407 (100), 363 (50), 340 (40), 379 (20)
Produkt 4	301 (100), 286 (50)	301: 301 (100), 286 (50)
Produkt 5 und 6	453, 435,	453: 409 (75), 381 (100), 337 (50), 453 (22) 435: 407 (100), 435 (30)
Produkt 7	451 (100), 423 (10)	451: 423 (100)
Produkt 8	557 (100),	557: 301 (100), 273 (80), 245 (30), 557 (10)
Produkt 9	557 (100)	557: 301 (100), 273 (80), 245 (30), 557 (10)
Produkt 10	151 (100), 601 (50)	601: 151 (100)
Produkt 11	601	601: 573 (100), 289 (50), 601 (10)

Eine Einordnung der Polymerisierungsprodukte hinsichtlich ihrer Einteilung in Di-, Tri- und Tetramere wurde anhand der durch ESI(-)-MS erhaltenen Molekül-Ionen getroffen. Zusätzlich zum *product ion scan* wurden auch MS/MS Experimente im *precursor ion scan* zur Bestimmung der „Mutter-Ionen“ durchgeführt. Da die Fragmentierungsmuster nur beschränkt Informationen bzgl. der Struktur geben können, wurde versucht über Vergleich der Fragmentierungsmuster des Vanillins und des Divanillins weitere Hinweise auf die Struktur zu erhalten. Die beiden Molekül-Ionen des Vanillins und Divanillins sind unter den gewählten ESI-MS Bedingungen (-40 V) sehr stabil und zerfallen nur partiell unter Abspaltung einer Masse von 15 m/z nach kollisionsinduzierter Fragmentierung. Dies kann auf die Abspaltung eines CH₃-Radikals von der Methoxygruppe zurückgeführt werden. Die Produkte **8**, **9** und **10** zeigten ein hiervon sehr unterschiedliches Fragmentierungsmuster. Die Substanzen **8** und **9** bildeten ein Fragment-Ion mit der Masse 301 m/z, was der Masse eines vollständigen Divanillinions [M-H] entspricht. Ferner wurde wieder die charakteristische Abspaltung einer CH₃-Gruppe (15 m/z) von diesen gebildeten Ionen beobachtet, welches auf die Grundstruktur des Divanillins hindeutete. Beim Produkt **10** wurde bereits ohne kollisionsinduzierte Fragmentierung ein Fragment-Ion mit der Masse 151 m/z identifiziert, welches der Masse eines Vanillinmonomers [M-H] entspricht. Diese Spaltungen konnten nicht im Divanillin, welches 5-5 verknüpft ist, beobachtet werden. Auch in den weiteren Dimeren **1-4** und Trimeren **5-7** konnte kein solches Fragmentierungsmuster beobachtet werden. Eventuell erfolgte die weitere Verknüpfung zu den Tri- und Tetrameren über eine 1-O-4- oder 8-O-5-Bindung, welche die unterschiedlichen Fragmentierungsmuster hervorrufen (Abb. 49).



R=Vanillinmonomer 5-5 oder 5-0-4 verknüpft



R=Vanillinmonomer 5-5 oder 5-0-4 verknüpft

Abb. 49: Postulierte Bildung des 1-O-4-verknüpften Vanillintrimers und des 8-O-5-verknüpften Vanillintrimers

Die Produkte **8** und **9** könnten durch Decarboxylierung gebildet worden sein. Die dafür nötige Carboxylfunktion könnte durch Disproportionierung der Aldehydgruppen (Cannizzaro-Reaktion) entstanden sein. Da diese Reaktion aber basenkatalysiert abläuft und die enzymatische Umsetzung unter sauren Bedingungen stattfand, ist dies eher unwahrscheinlich. Eine Strukturaufklärung konnte allein mit den durch LC-ESI(-)-MS/MS gewonnenen Daten nicht erfolgen. Hierzu könnten in weiterführenden Arbeiten die Einzelsubstanzen isoliert und über NMR weitere Daten für die Bestimmung der Struktur herangezogen werden. Die bisher nicht beschriebenen Di-, Tri- und Tetramere könnten ähnlich wie Divanillin (5-5-Dehydrodivanillin), welches in geringen Konzentrationen von 5-50 ppm einen angenehmen, haftfesten und mundfüllenden Geschmackseindruck von Cremigkeit, Sahnigkeit vermittelt, geschmacksaktiv sein. Eine sensorische Untersuchung nach erfolgter Isolierung könnte eventuelles Potential aufdecken.

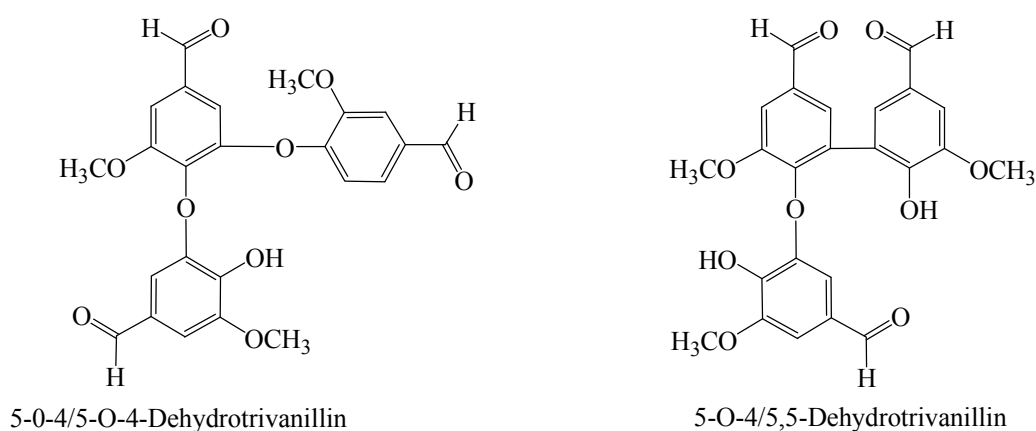


Abb. 50: Mögliche Bildung von 5,5- und 5-O-4-verknüpften Trimeren

Weiterhin wurde die präparative Herstellung von Divanillin, welches sich zur Einarbeitung in fettarme und fettreduzierte Lebensmittel eignet (Gatfield *et al.* 2006; Reiß *et al.* 2004), aus Vanillin untersucht. Die Peroxidase aus *Haj* hat sich dabei als sehr effizient erwiesen. So gelang es in einem ersten Versuch (pH 5, 30 °C) 20 mg Vanillin innerhalb von 5 h mit einem Umsatz von ca. 90% zu Divanillin unter Einsatz von 25 U H₂O₂ (ABTS, pH 4, 30 °C, regelmäßige Zugabe von H₂O₂) zu transformieren (Abb. 51). Nach 45 min wurde ein Umsatz von 75% erhalten. Mit der HRP aus Meerrettich wurde verglichen dazu 1 g Vanillin mit 1000 U innerhalb von 5 min bei 40 °C mit einem Umsatz von 80-95% transformiert (Nishimura *et al.* 2010).

Die deutlich erhöhte Ausbeute an Divanillin im Gegensatz zu dem in Abb. 48 dargestellten Versuch ist der um das 100fach erhöhten Konzentration von Vanillin im Ansatz geschuldet, wodurch gebildetes Divanillin ausfällt und nicht für weitere Quervernetzungen bereitsteht. Hierdurch wird deutlich, dass die verwendeten Bedingungen sehr große Auswirkungen auf das Produktmuster haben.

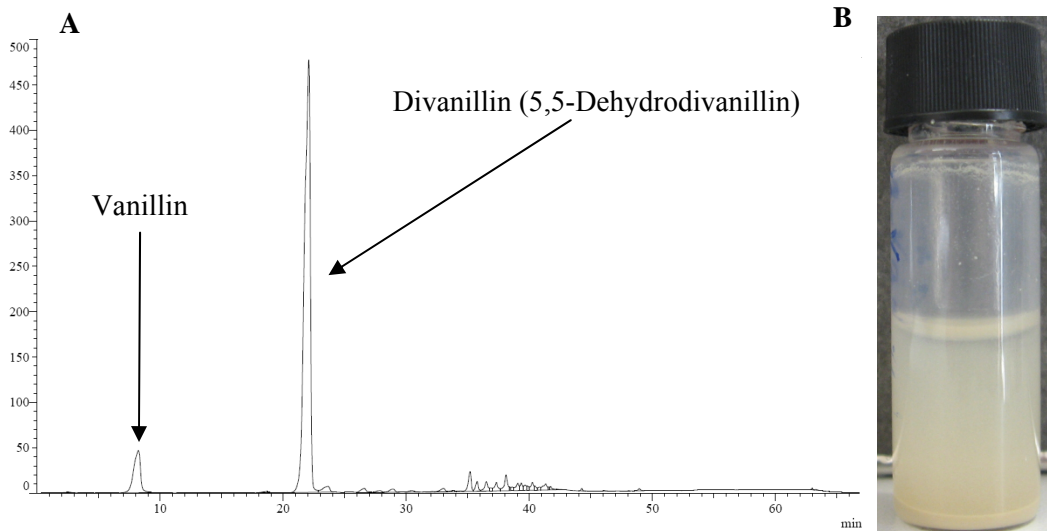


Abb. 51: (A) HPLC-UV/Vis Chromatogramm des durch HjP gebildeten Divanillins und (B) Bildung des Niederschlages während der Transformation von Vanillin durch HjP

3.7.3 Spaltung von O-Acetylcurcumin durch Lcc1

Es konnte gezeigt werden, dass Vanillin schnell durch Lcc1 und HjP zu höhermolekularen Verbindungen transformiert wird. Um eine Polymerisation des durch oxidative Spaltung von Curcumin gebildeten Vanillins zu verhindern, wurde Curcumin acetyliert. Da hierbei nicht aufgereinigtes Curcumin zum Einsatz kam, wurde eine Vielzahl an möglichen O-Mono- und O-Diacetylcurcuminen gebildet (Tab. 31).

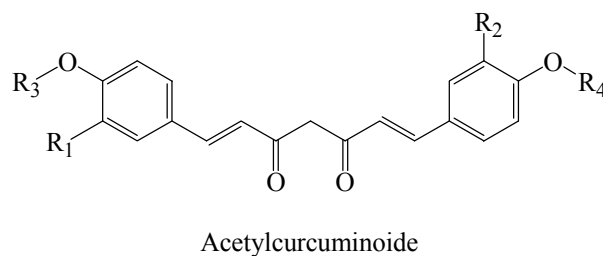


Abb. 52: Struktur der möglichen O-Acetylcurcuminoid

Tab. 31: Mögliche O-Acetylierungsprodukte der Curcuminoid Demethoxycurcumin, Bisdemethoxycurcumin und Curcumin

Produkt	Nummer	R1	R2	R3	R4	m/z
Bisdemethoxycurcumin	1	H	H	H	H	307
Demethoxycurcumin	2	OCH ₃	H	H	H	337

Produkt	Nummer	R1	R2	R3	R4	m/z
Curcumin	3	OCH ₃	OCH ₃	H	H	367
O-Monoacetylbisdemethoxycurcumin	4	H	H	COCH ₃	H	349
O-Monoacetyldemethoxycurcumin	5 und 5*	OCH ₃	H	COCH ₃	H	379
		OCH ₃	H	H	COCH ₃	379
O-Monoacetylcurcumin	6	OCH ₃	OCH ₃	COCH ₃	H	409
O-Diacetylbisdemethoxycurcumin	7	H	H	COCH ₃	COCH ₃	391
O-Diacetyldemethoxycurcumin	8	OCH ₃	H	COCH ₃	COCH ₃	421
O-Diacetylcurcumin	9	OCH ₃	OCH ₃	COCH ₃	COCH ₃	451

Die Produkte wurden über LC-ESI(-)-MS untersucht, wobei die O-Mono- und O-Diacetate der jeweiligen Curcuminoide identifiziert werden konnten. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen **5** und **5*** konnte anhand der MS-Spektren nicht erfolgen. Die Einteilung zu **5** und **5*** erfolgte willkürlich anhand der Elutionsreihenfolge (Abb. 53).

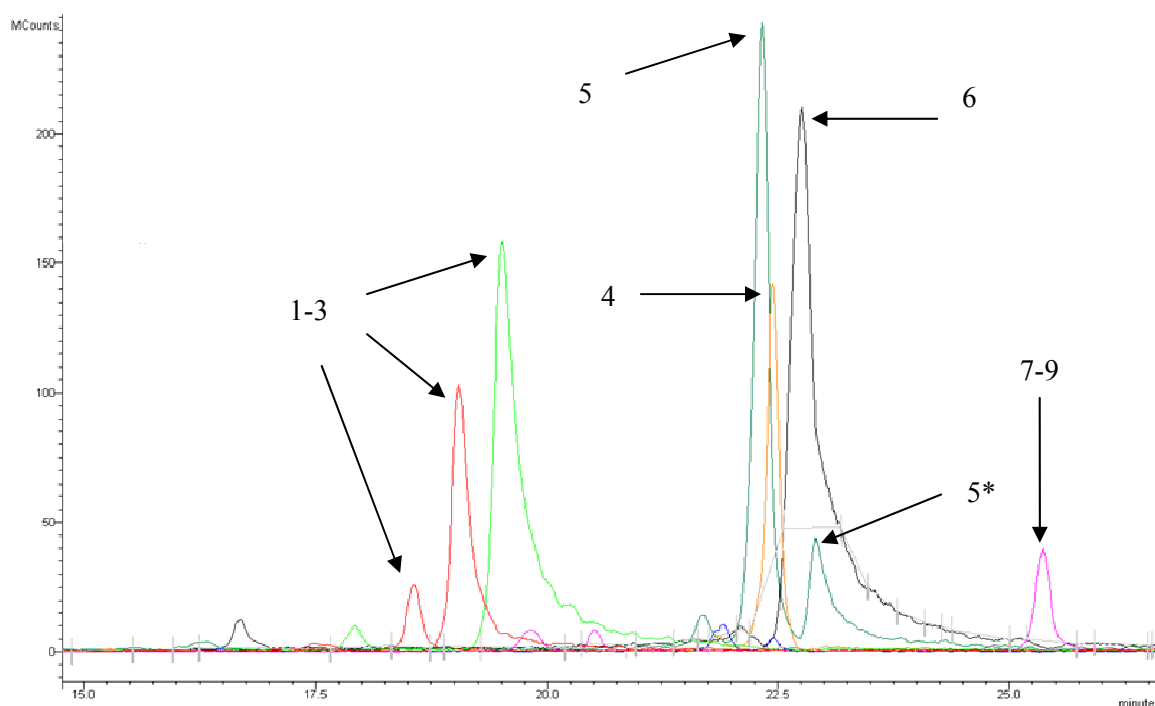


Abb. 53: LC-MS Chromatogramm der gebildeten Acetylcurcuminoide

Nachfolgend wurde das Vermögen der Lcc1 hinsichtlich der Transformation der synthetisierten Acetylcurcuminoide untersucht. Dabei konnte ein vollständiger Umsatz des O-Monoacetylcurcumins (**6**) und O-Monoacetyldemethoxycurcumins (**5***) beobachtet werden. Das O-Monoacetylbidemethoxycurcumin (**4**) und O-Monoacetyldemethoxycurcumin (**5**) wurden nicht vollständig umgesetzt (Abb. 54).

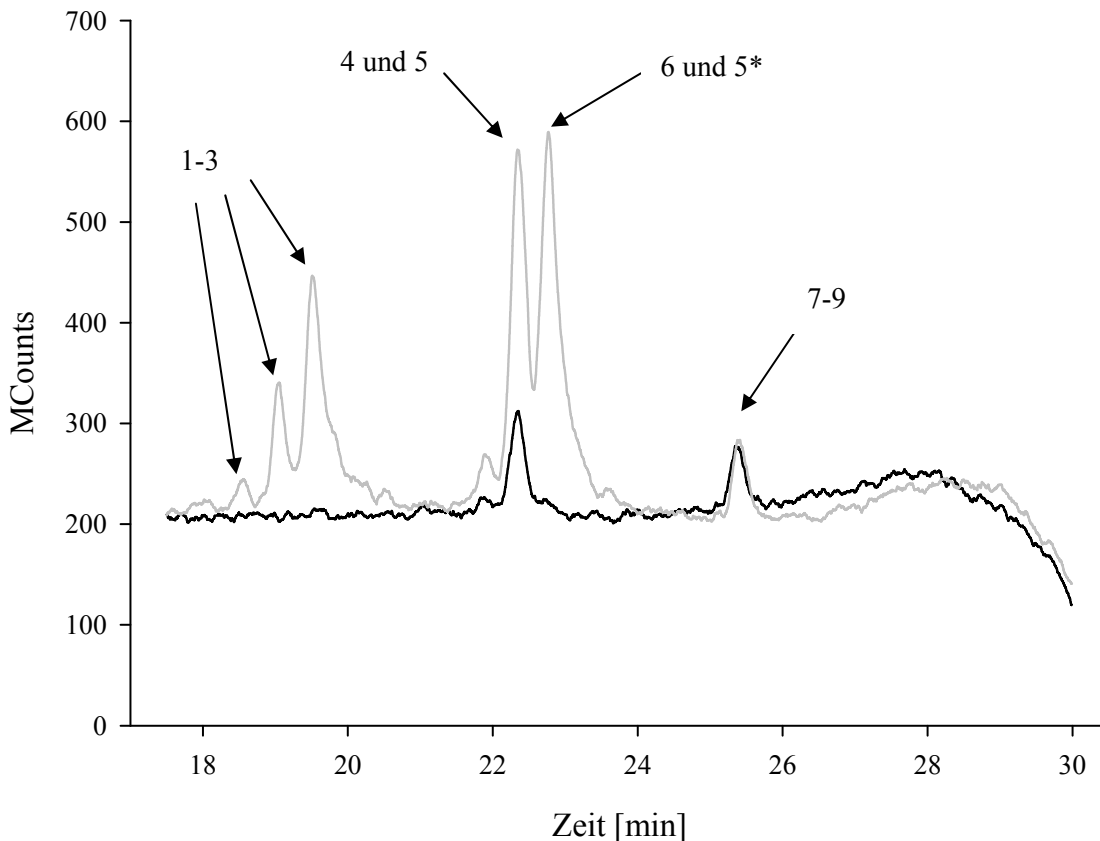


Abb. 54: LC-ESI(-)-MS Chromatogramm der Umsetzung der O-Acetylcurcumine mit Lcc1 (schwarze Linie) oder ohne Enzym (graue Linie)

Die O-Diacetylcurcuminoide konnten weder von der Lcc1 noch LacC aus *Trametes sp.* und der DyP aus *Haj* umgesetzt werden. Bei der Oxidation von Phenolen durch Laccasen ist die Abstraktion des H-Atoms von der phenolischen Gruppe und damit die Bildung eines Aroxyradikals von entscheidender Bedeutung (Potthast *et al.* 1996). Durch die Acetylierung der phenolischen OH-Gruppe wird dies verhindert und es kommt nicht zur Bildung des Radikals und damit zur Oxidation durch Laccasen wie auch Peroxidasen. Dies wird auch durch die Tatsache gestützt, dass Acetylvanillin nicht durch Lcc1 und HjP umgesetzt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Um eindeutig nachweisen zu können, dass Vanillin durch oxidativen Abbau von Curcumin gebildet wird, wurden die O-Monoacetylcurcumine **5*** und **6** über Dünnschichtchromatographie isoliert und mit Lcc1 umgesetzt. Eine Abtrennung des O-

Monoacetylcurcumins (**6**) vom O-Monoacetyldemethoxycurcumins (**5***) konnte über die Dünnschichtchromatographie nicht realisiert werden.

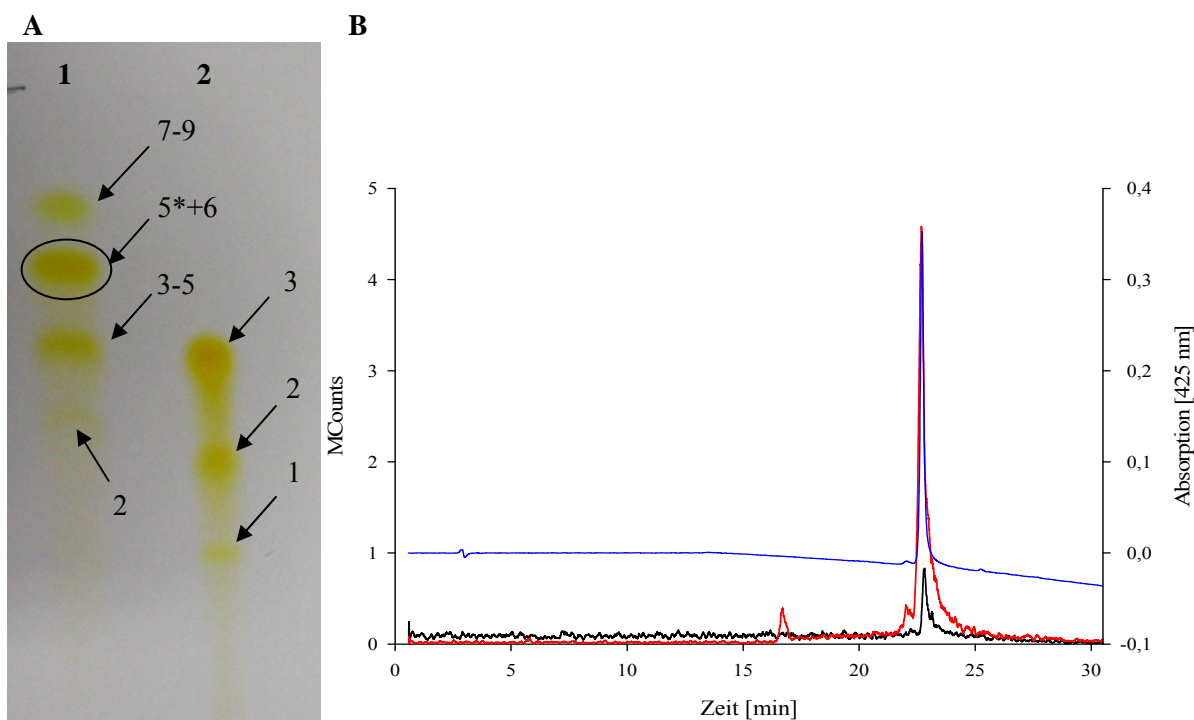


Abb. 55: Trennung der synthetisierten Acetylcurcuminoide (**1**) und der Curcuminoide (**2**) über Dünnschichtchromatographie (**A**) mit dem Laufmittel Dichlormethan: Methanol 9:1. (**B**) LC-ESI(-)-MS Chromatogramm der isolierten O-Monoacetylcurcuminoide **5*** (schwarz) und **6** (rot), UV-Spur (blau)

Unter den gewählten Bedingungen wurden 55% des O-Monoacetylcurcumins (22 mg L^{-1}) oxidativ gespalten. Dabei wurden $4,75 \text{ mg L}^{-1}$ Vanillinacetat erhalten, was einer Ausbeute von 45% (mol/mol) entspricht. Als eine weitere flüchtige Komponente konnte Feruloylmethanacetat detektiert werden. Dies verdeutlicht, dass eine Generierung von Vanillin aus Curcumin durch Laccasen und Peroxidasen prinzipiell möglich ist. Jedoch müssen die Reaktionsbedingungen dahingehend optimiert werden, dass eine weitere Oxidation des gebildeten Vanillins verhindert wird. Dies könnte über eine Entfernung des gebildeten Vanillins durch Adsorbentien (Yoon *et al.* 2007) erreicht werden. Eine weitere Schwierigkeit in der Prozessführung stellt die unzureichende Löslichkeit des Curcumins im gewählten pH-Bereich dar. Eine Überlegung mit Laccasen und Peroxidasen zu arbeiten, welche bei pH-Werten über pH 7 aktiv sind (Martin *et al.* 2007), scheint durch die schnelle Bildung des in diesem pH-Bereich gebildeten Autoxidationsproduktes des Curcumins (Gordon and Schneider 2012; Griesser *et al.* 2011) nicht zielführend. Verglichen mit der Gewinnung von Vanillin mit Konzentrationen von über 10 g L^{-1} durch die Biotransformation von Ferulasäure durch *Amycolatopsis sp* (Rabenhorst and Hopp 2000) oder *Streptomyces setonii* (Müller *et al.* 1998) ist noch viel Forschungsarbeit notwendig, um eine konkurrenzfähige Synthese von natürlichem Vanillin durch oxidative Spaltung von Curcumin durch Laccasen und Peroxidasen zu etablieren.

4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Laccase (Lcc1) aus *Meripilus giganteus* (Mgi) erfolgreich isoliert, charakterisiert und kloniert werden. Die erhaltenen Sequenzdaten der Lcc1 könnten weitere wichtige Informationen liefern, um die Stabilität von Laccasen gegenüber bipolaren Stoffen und Metallionen durch *protein engineering* zu erhöhen. Des Weiteren könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in der heterologen Expression der Lcc1 für die Etablierung eines *E.coli*-Expressionssystems für Laccasen pilzlichen Ursprungs genutzt werden. Um jedoch gegenüber der Expression in eukaryontischen Wirten vergleichbare Ausbeuten an rek. Laccase zu erhalten, müsste in weiterführenden Arbeiten die Löslichkeit und Aktivität der exprimierten rek. Lcc1 deutlich erhöht werden. So könnte die Expression ohne natives Signalpeptid, mit einem *E.coli*-eigenen Signalpeptid sowie die Variation des Zeitpunktes der Chaperoninduktion einen signifikanten Einfluß auf die Ausbeute haben. Weiterhin könnten in zukünftigen Arbeiten weitere Chaperonsysteme und auch die Expression als Fusionsprotein mit verschiedenen Tags die Löslichkeit deutlich verbessern. Dies könnte ebenfalls durch gerichtete Evolution der Lcc1 gelingen. Sollte dies nicht erfolgreich sein, könnten auch Strategien zur Rückfaltung der *inclusion bodies* untersucht werden.

Unter Zuhilfenahme der zur Verfügung stehenden Informationen aus der Genom-Sequenz des engen Verwandten *Auricularia delicata* könnte es gelingen, die DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit isolierten DyPs aus *Hirneola-auricula-judae* erfolgreich zu amplifizieren. Dass diese Vorgehensweise erfolgversprechend sein kann, zeigte die erfolgreiche Amplifikation der Teilsequenz einer DyP aus *Psa*. Durch weitere PCR-Amplifizierung zum 5'- und 3'-Ende könnte in weitergehenden Arbeiten die komplette Sequenz der *Psa*DyP erhalten werden. Anschließend bestünde die Möglichkeit, die DyP heterolog zu exprimieren und zu charakterisieren. Das beschriebene Verfahren könnte noch auf weitere *Pleurotus*-Spezies ausgeweitet werden, um neue bisher unbekannte DyPs zu identifizieren und verfügbar zu machen.

Für beide Oxidoreduktasen konnte ihr Potential in einer möglichen Anwendung in der Lebensmittelindustrie durch die erfolgreiche Quervernetzung von Ferulasäure als auch die oxidative Spaltung von Curcumin unter Bildung von Vanillin demonstriert werden. Durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittelsystems sowie die Verhinderung einer weiteren Polymerisierung des Vanillins könnte die Ausbeute an Vanillin deutlich gesteigert werden. Wenn zukünftig die kostengünstige Bereitstellung von Laccasen und Peroxidasen gelänge, wäre die Etablierung einer Alternative zum aktuellen Verfahren zur Herstellung von natürlichem Vanillin durch Fermentation denkbar. Mittels oxidativer Quervernetzung des Vanillins wurden bisher unbekannte neue geschmacksaktive Substanzen gebildet, deren mögliches sensorisches Potential in weiterführenden Arbeiten näher untersucht werden könnte.

5 Literaturverzeichnis

Adam, W., Lazarus, M., Saha-Möller, C.R., Weichhold, O., Hoch, U., Häring, D., Schreier, P., (1999) *Biotransformations with Peroxidases*. Springer, Berlin Heidelberg.

Aehle, W., (2004) *Enzymes in Industry*. Wiley-VCh, Weinheim.

Aehle, W., (2007) *Enzymes in Industry*. Wiley-VCh, Weinheim.

Agashe, V.R., Guha, S., Chang, H.C., Genevaux, P., Hayer-Hartl, M., Stemp, M., Georgopoulos, C., Hartl, F.U., Barral, J.M., (2004) Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: Increase in yield at the expense of folding speed. *Cell*, pp. 199-209.

Agrawal, D.K., Mishra, P.K., (2010) Curcumin and Its Analogues: Potential Anticancer Agents. *Med. Res. Rev.*, pp. 818-860.

Ahn, T., Yim, S.K., Choi, H.I., Yun, C.H., (2001) Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes. *Anal. Biochem.*, pp. 300-303.

Alves, A.M.C.R., Record, E., Lomascolo, A., Scholtmeijer, K., Asther, M., Wessels, J.G.H., Wosten, H.A.B., (2004) Highly efficient production of laccase by the basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 6379-6384.

Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., (1998) Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS Lett.*, pp. 195-200.

Andreasen, M.F., Christensen, L.P., Meyer, A.S., Hansen, A., (2000) Ferulic acid dehydrodimers in rye (*Secale cereale L.*). *J. Cereal Sci.*, pp. 303-307.

Antranikian, G., (2006) *Angewandte Mikrobiologie*. Springer.

Archibald, F.S., (1992) A New Assay for Lignin-Type Peroxidases Employing the Dye Azure-B. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 3110-3116.

- Arendt, P., (2009) Isolierung und Charakterisierung einer Peroxidase aus *Hirneola auricula-judae*. Bachelorarbeit, Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover, Hannover.
- Arnold, F.H., (1990) Engineering Enzymes for Nonaqueous Solvents. Trends Biotechnol., pp. 244-249.
- Asther, M., Corrieu, G., Drapron, R., Odier, E., (1987) Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. Enzyme Microb. Technol., pp. 245-249.
- Baldrian, P., (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. FEMS Microbiol. Rev., pp. 215-242.
- Bao, W., O'Malley, D.M., Whetten, R., Sederoff, R.R., (1993) A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. Science, pp. 672-674.
- Baumgartner, J., Neukom, H., (1972) Enzymatische Oxidation von Vanillin. Chimia, p. 366.
- Bedoukian, P.Z., (1986) *Perfumery and Flavor Synthesis*. Allured Publishing Corp, Wheaton.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., (2008) *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Berger, R.G., (2007) *Flavours and Fragrances*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Bohlin, C., Jonsson, L.J., Roth, R., van Zyl, W.H., (2006) Heterologous expression of trametes versicolor laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. Appl. Biochem. Biotechnol., pp. 195-214.
- Bonnarme, P., Jeffries, T.W., (1990) Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol., pp. 210-217.
- Bonomo, R.P., Boudet, A.M., Cozzolino, R., Rizzarelli, E., Santoro, A.M., Sterjiades, R., Zappalà, R., (1998) A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the "white-rot" fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences. J. Inorg. Biochem., pp. 205-211.
- Bornscheuer, U.T., Buchholz, K., (2005) Highlights in Biocatalysis - Historical Landmarks and Current Trends. Eng. Life Sci., pp. 309-323.

- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S., (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 4627-4632.
- Bouwens, E.C.M., Trivedi, K., van Vliet, C., Winkel, C., (1996) Method of enhancing colour in a tea based foodstuff. EP0760213
- Bren, A., Kandus, A., Varl, J., Buturović, J., Ponikvar, R., Kveder, R., Primožič, S., Ivanovich, P., (2002) A Comparison Between Epoetin Omega and Epoetin Alfa in the Correction of Anemia in Hemodialysis Patients: A Prospective, Controlled Crossover Study. *Artif. Organs*. Blackwell Publishing, Inc., pp. 91-97.
- Buchholz, K., Kasche, V., Borscheuer, U.T., (2005) *Biocatalysts and Enzyme Technology*. WILEY-VCH, Weinheim.
- Bukh, C., Bjerrum, M.J., (2010) The reversible depletion and reconstitution of a copper ion in *Coprinus cinereus* laccase followed by spectroscopic techniques. *J. Inorg. Biochem.*, pp. 1029-1037.
- Bunzel, M., (2010) Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochem. Rev.*, pp. 47-64.
- Bunzel, M., Ralph, J., Brüning, P., Steinhart, H., (2006) Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 6409-6418.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H., (2003) Isolation and identification of a ferulic acid dehydrotrimer from saponified maize bran insoluble fiber. *Eur. Food Res. Technol.*, pp. 128-133.
- Bunzel, M., Ralph, J., Funk, C., Steinhart, H., (2005) Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.*, pp. 5845-5850.
- Burton, S.G., (2003) Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends in Biotechnology*, pp. 543-549.
- Caballero, P.A., Gómez, M., Rosell, C.M., (2007) Bread quality and dough rheology of enzyme-supplemented wheat flour. *Eur. Food Res. Technol.*, pp. 525-534.
- Cai, D.Y., Tien, M., (1992) Kinetic-Studies on the Formation and Decomposition of Compound-II and Compound-III - Reactions of Lignin Peroxidase with H₂O₂. *J. Biol. Chem.*, pp. 11149-11155.

Camarero, S., Cañas, A.I., Nousiainen, P., Record, E., Lomascolo, A., Martínez, M.J., Martínez, Á.T., (2008) *p*-Hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. *Environ. Sci. Technol.*, pp. 6703-6709.

Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., (1999) Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *J. Biol. Chem.*, pp. 10324-10330.

Cantone, S., Hanefeld, U., Basso, A., (2007) Biocatalysis in non-conventional media-ionic liquids, supercritical fluids and the gas. *Green Chemistry*, pp. 954-971.

Carvajal-Millan, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X., Micard, V., (2005) Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. *Carbohydr. Polym.*, pp. 181-188.

Champagne, P.P., Nesheim, M.E., Ramsay, J.A., (2010) Effect of a non-ionic surfactant, Merspol, on dye decolorization of Reactive blue 19 by laccase. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 147-152.

Chauhan, S.M.S., Kandadai, A.S., Jain, N., Kumar, A., (2003) Biomimetic oxidation of curcumin with hydrogen peroxide catalyzed by 5,10,15,20-tetraarylporphyrinato-iron(III) chlorides in dichloromethane. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, pp. 1345-1347.

Cheng, J., Yu, S.M., Zuo, P., (2006) Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater. *Water Res.*, pp. 283-290.

Choi, S.H., (2005) Implantable biofuel cell system based on nanostructures. US2005118494.

Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K.H., Piontek, K., (1999) The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C(β) of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. *J. Mol. Biol.*, pp. 809-827.

Clark, G.S., (1990) Vanillin. *Perf Flavor*, pp. 45-54.

Clontech, (2011) Cold-Shock expression vector pCold™ I DNA manual. http://www.clontech.com/takara/DE/Products/Protein_Research/Protein_Folding_and_Expression/pCold_DNA_Cold_Shock_Expression_System?sitex=10035:22372:US.

Collins, P.J., Dobson, A.D.W., (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 3444-3450.

- Conesa, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., (2002) Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J. Biotechnol.*, pp. 143-158.
- Converti, A., Aliakbarian, B., Domínguez, J.M., Vázquez, G.B., Perego, P., (2010) Microbial Production of Biovanillin. *Braz. J. Microbiol.*, pp. 519-530.
- Couto, S.R., Herrera, J.L.T., (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.*, pp. 500-513.
- Couto, S.R., Toca-Herrera, J.L., (2007) Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.*, pp. 558-569.
- Cristóvão, R.O., Tavares, A.P.M., Loureiro, J.M., Boaventura, R.A.R., Macedo, E.A., (2009) Treatment and kinetic modelling of a simulated dye house effluent by enzymatic catalysis. *Bioresour. Technol.*, pp. 6236-6242.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Giovannozzi Sermanni, G., (2000) Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *J. Biotechnol.*, 2000/02/22 ed, pp. 265-273.
- D'Souza, S.F., (1999) Immobilized enzymes in bioprocess. *Curr. Sci.*, pp. 69-79.
- Dalal, S., Gupta, M.N., (2007) Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering. *Chemosphere*, pp. 741-747.
- De Souza, C.G.M., Tychanowicz, G.K., De Souza, D.F., Peralta, R.M., (2004) Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J. Basic Microbiol.*, pp. 129-136.
- De Souza, S.M.A.G.U., Forgiarini, E., de Souza, A.A.U., (2007) Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *J. Hazard. Mater.*, pp. 1073-1078.
- Di, J.W., Shen, C.P., Peng, S.H., Tu, Y.F., Li, S.J., (2005) A one-step method to construct a third-generation biosensor based on horseradish peroxidase and gold nanoparticles embedded in silica sol-gel network on gold modified electrode. *Anal. Chim. Acta*, pp. 196-200.
- Dittmer, N.T., Kanost, M.R., (2010) Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, pp. 179-188.

Djoko, K.Y., Chong, L.X., Wedd, A.G., Xiao, Z.G., (2010) Reaction Mechanisms of the Multicopper Oxidase CueO from *Escherichia coli* Support Its Functional Role as a Cuprous Oxidase. *J. Am. Chem. Soc.*, pp. 2005-2015.

Dolfini, J.E., Glinka, J., Bosch, A.C., (1990) Hydrolysis of curcumin.

Doyle, W.A., Blodig, W., Veitch, N.C., Piontek, K., Smith, A.T., (1998) Two substrate interaction sites in lignin peroxidase revealed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, pp. 15097-15105.

Eggert, C., LaFayette, P.R., Temp, U., Eriksson, K.E.L., Dean, J.F.D., (1998) Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 1766-1772.

Eisele, N., Linke, D., Bitzer, K., Na'amnieh, S., Nimtz, M., Berger, R.G., (2011) The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresour. Technol.*, pp. 3316-3321.

El Agha, A., Makris, D.P., Kefalas, P., (2008) Peroxidase-Active Cell Free Extract from Onion Solid Wastes: Biocatalytic Properties and Putative Pathway of Ferulic Acid Oxidation. *J. Biosci. Bioeng.*, pp. 279-285.

Elegir, G., Daina, S., Zoia, L., Bestetti, G., Orlandi, M., (2005) Laccase mediator system: oxidation of recalcitrant lignin model structures present in residual kraft lignin. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 340-346.

Epstein, J., Sanderson, I.R., MacDonald, T.T., (2010) Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br. J. Nutr.*, pp. 1545-1557.

Faber, K., (2011) *Biotransformations in Organic Chemistry*. 6th ed. Heidelberg Dordrecht London New York, Springer.

Faraco, V., Piscitelli, A., Sannia, G., Giardina, P., (2007) Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 889-893.

Faure, D., Bouillant, M.L., Bally, R., (1994) Isolation of *Azospirillum-Lipoferum* 4t Tn5 Mutants Affected in Melanization and Laccase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 3413-3415.

Fayet, O., Ziegelhoffer, T., Georgopoulos, C., (1989) The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. Bacteriol.*, pp. 1379-1385.

Figueroa-Espinoza, M.C., Morel, M.H., Surget, A., Asther, M., Moukha, S., Sigoillot, J.C., Rouau, X., (1999) Attempt to cross-link feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase. *Food Hydrocoll.*, pp. 65-71.

Figueroa-Espinoza, M.C., Rouau, X., (1998) Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: Mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans. *Cereal Chemistry*, pp. 259-265.

Fujihiro, S., Higuchi, R., Hisamatsu, S., Sonoki, S., (2009) Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 853-860.

Funk, C., Ralph, J., Steinhart, H., Bunzel, M., (2005) Isolation and structural characterisation of 8-O-4/8-O-4- and 8-8/8-O-4-coupled dehydrotriferulic acids from maize bran. *Phytochemistry*, pp. 363-371.

Galhaup, C., Goller, S., Peterbauer, C.K., Strauss, J., Haltrich, D., (2002a) Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, pp. 2159-2169.

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.*, pp. 225-232.

Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D., (2002b) Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 529-536.

Galli, I., Musci, G., di Patti, M.C.B., (2004) Sequential reconstitution of copper sites in the multicopper oxidase CueO. *J. Biol. Inorg. Chem.*, pp. 90-95.

Garcia, T.A., Santiago, M.F., Ulhoa, C.J., (2006) Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylidine. *Biotechnol. Lett.*, pp. 633-636.

Gatfield, I., Reiß, I., Krammer, G., Schmidt, C.O., Kindel, G., Bertram, H.-J., (2006) Novel Taste-Active Component of Fermented Vanilla Beans. pp. 18-20.

- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G., (2010) Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.*, pp. 369-385.
- Gold, M.H., Youngs, H.L., Gelpke, M.D.S., (2000) Manganese peroxidase. *Metal Ions in Biological Systems*, Vol 37, pp. 559-586.
- Gómez-Toribio, V., Martínez, A.T., Martínez, M.J., Guillén, F., (2001) Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii* - H₂O₂ generation and the influence of Mn²⁺. *Eur. J. Biochem.*, pp. 4787-4793.
- Gordon, O.N., Schneider, C., (2012) Vanillin and ferulic acid: not the major degradation products of curcumin. *Trends Mol. Med.*, 10.1016/j.molmed.2012.04.011
- Grass, G., Rensing, C., (2001) CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, pp. 902-908.
- Griesser, M., Pistis, V., Suzuki, T., Tejera, N., Pratt, D.A., Schneider, C., (2011) Autoxidative and Cyclooxygenase-2 Catalyzed Transformation of the Dietary Chemopreventive Agent Curcumin. *J. Biol. Chem.*, pp. 1114-1124.
- Hamid, M., Khalil-ur-Rehman, (2009) Potential applications of peroxidases. *Food Chem.*, pp. 1177-1186.
- Hammel, K.E., Cullen, D., (2008) Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, pp. 349-355.
- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, pp. 574-581.
- Hatvani, N., Mács, I., (2001) Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. *Process Biochem.*, pp. 491-496.
- Hearon, W.M., Lo, C.F., (1980) Separating phenols from alkaline pulping spent liquors. US4208350
- Hecker, K.H., Roux, K.H., (1996) High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*, pp. 478-&.
- Heiden, S., Zinke, H., (2006) *Weißer Biotechnologie. Industrie im Aufbruch*. Biocom, Berlin.

Helenius, A., Aebi, M., (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.*, pp. 1019-1049.

Hiner, A.N.P., Hernández-Ruiz, J., Rodríguez-López, J.N., Arnao, M.B., Varón, R., García-Cánovas, F., Acosta, M., (2001) The inactivation of horseradish peroxidase isoenzyme A2 by hydrogen peroxide: an example of partial resistance due to the formation of a stable enzyme intermediate. *J. Biol. Inorg. Chem.*, pp. 504-516.

Hirai, H., Nakanishi, S., Nishida, T., (2004) Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere*, pp. 641-645.

Hoch, U., Adam, W., Fell, R., Saha-Möller, C.R., Schreier, P., (1997) Horseradish peroxidase - A biocatalyst for the one-pot synthesis of enantiomerically pure hydroperoxides and alcohols. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical*, pp. 321-328.

Hoffmann, A., Bukau, B., Kramer, G., (2010) Structure and function of the molecular chaperone Trigger Factor. *BBA-Mol. Cell. Res.*, pp. 650-661.

Hoffmann, F., Rinas, U., (2004) Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2004/06/26 ed, pp. 143-161.

Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., Lundell, T., (2010) New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 871-897.

Hong, F., Meinander, N.Q., Jonsson, L.J., (2002) Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.*, pp. 438-449.

Hong, Y.Z., Zhou, H.M., Tu, X.M., Li, J.F., Xiao, Y.Z., (2007) Cloning of a laccase gene from a novel basidiomycete *Trametes sp* 420 and its heterologous expression in *Pichia pastoris*. *Curr. Microbiol.*, pp. 260-265.

Hoshida, H., Fujita, T., Murata, K., Kubo, K., Akada, R., (2005) Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, pp. 1090-1097.

Houry, W.A., Frishman, D., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Hartl, F.U., (1999) Identification of in vivo substrates of the chaperonin GroEL. *Nature*, pp. 147-154.

Huttermann, A., Mai, C., Kharazipour, A., (2001) Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 387-394.

Ibrahim, V., Mendoza, L., Mamo, G., Hatti-Kaul, R., (2011) Blue laccase from *Galerina sp.*: Properties and potential for Kraft lignin demethylation. *Process Biochem.*, pp. 379-384.

Invitrogen, (2011a) One Shot BL21 Star (DE3) and One Shot BL21 Star (DE3) pLysS Competent Cells <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C601003>.

Invitrogen, (2011b) OneShot BL21(DE3), One Shot BL21(DE3)pLysS and One Shot BL21(DE3)pLysE <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C600003>.

Jeong, H., Barbe, V., Lee, C.H., Vallenet, D., Yu, D.S., Choi, S.H., Couloux, A., Lee, S.W., Yoon, S.H., Cattolico, L., Hur, C.G., Park, H.S., Segurens, B., Kim, S.C., Oh, T.K., Lenski, R.E., Studier, F.W., Daegelen, P., Kim, J.F., (2009) Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J. Mol. Biol.*, pp. 644-652.

Ji, G.L., Zhang, H.B., Huang, F., Huang, X.R., (2009) Effects of nonionic surfactant Triton X-100 on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol A. *J. Environ. Sci. (China)*, pp. 1486-1490.

Jiang, H.L., Somogyi, A., Jacobsen, N.E., Timmermann, B.N., Gang, D.R., (2006) Analysis of curcuminoids by positive and negative electrospray ionization and tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, pp. 1001-1012.

Joye, I.J., Lagrain, B., Delcour, J.A., (2009) Endogenous redox agents and enzymes that affect protein network formation during breadmaking - A review. *J. Cereal Sci.*, pp. 1-10.

Junghanns, C., Pecyna, M.J., Böhm, D., Jehmlich, N., Martin, C., von Bergen, M., Schauer, F., Hofrichter, M., Schlosser, D., (2009) Biochemical and molecular genetic characterisation of a novel laccase produced by the aquatic ascomycete *Phoma sp.* UHH 5-1-03. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 1095-1105.

Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T., Kuwahara, M., (2005) Mn²⁺ is dispensable for the production of active MnP2 by *Pleurotus ostreatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, pp. 871-876.

Karrasch, S., Schmidt, G., Zelena, K., Berger, R.G., (2010) Redox Mechanisms to Modify the Textural and Sensory Properties of Food. 5th International Congress on Biocatalysis (BioCat2010) Hamburg, p. 106.

Khurana, A., Ho, C.T., (1988) High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Curcuminoids and Their Photo-Oxidative Decomposition Compounds in *Curcuma longa* L. Journal of Liquid Chromatography, pp. 2295-2304.

Kiiskinen, L.L., Kruus, K., Bailey, M., Ylosmaki, E., Siika-aho, M., Saloheimo, M., (2004) Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. Microbiology-Sgm, pp. 3065-3074.

Kim, E.Y., Chae, H.J., Chu, K.H., (2007) Enzymatic oxidation of aqueous pentachlorophenol. J. Environ. Sci. (China), pp. 1032-1036.

Kim, S.J., Ishikawa, K., Hirai, M., Shoda, M., (1995) Characteristics of a Newly Isolated Fungus, *Geotrichum candidum* Dec-1, Which Decolorizes Various Dyes. J. Ferment. Bioeng., pp. 601-607.

Kim, S.J., Shoda, M., (1999) Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. Appl. Environ. Microbiol., pp. 1029-1035.

Klevenz, H., (2002) *Industrial Pharmaceutical Biotechnology*. WILEY-VCH, Weinheim.

Klibanov, A.M., (1979) Enzyme Stabilization by Immobilization. Anal. Biochem., pp. 1-25.

Klibanov, A.M., (1990) Asymmetric Transformations Catalyzed by Enzymes in Organic-Solvents. Acc. Chem. Res., pp. 114-120.

Klibanov, A.M., (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature, pp. 241-246.

Kolaj, O., Spada, S., Robin, S., Wall, J.G., (2009) Use of folding modulators to improve heterologous protein production in *Escherichia coli*. Microb. Cell Fact.

Koschorreck, K., Richter, S.M., Ene, A.B., Roduner, E., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., (2008a) Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol., pp. 217-224.

Koschorreck, K., Richter, S.M., Swierczek, A., Beifuss, U., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., (2008b) Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. Arch. Biochem. Biophys., pp. 213-219.

- Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., Bukau, B., (2009) The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, pp. 589-597.
- Krings, U., Berger, R.G., (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 1-8.
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M., (2008a) Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microb. Cell Fact.*, pp. -.
- Kunamneni, A., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M., (2008b) Laccases and their applications: A patent review. *Recent. Pat. Biotechnol.*, pp. 10-24.
- Kupriyanovich, Y.N., Medvedeva, S.A., Rokhin, A.V., Kanitskaya, L.V., (2007) Regioselectivity of ferulic acid polymerization catalyzed by oxidases. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, pp. 516-522.
- Kusnadi, A.R., Nikolov, Z.L., Howard, J.A., (1997) Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnol. Bioeng.*, pp. 473-484.
- Kuuva, T., Lantto, R., Reinikainen, T., Buchert, J., Autio, K., (2003) Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocoll.*, pp. 679-684.
- 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.*, pp. 247-250.
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, pp. 680-&.
- Lahtinen, M., Kruus, K., Heinonen, P., Sipila, J., (2009) On the Reactions of Two Fungal Laccases Differing in Their Redox Potential with Lignin Model Compounds: Products and Their Rate of Formation. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 8357-8365.
- Larré, C., Denery-Papini, S., Popineau, Y., Deshayes, G., Desserme, C., Lefebvre, J., (2000) Biochemical analysis and rheological properties of gluten modified by transglutaminase. *Cereal Chem.*, pp. 32-38.

- Lauber, S., Henle, T., Klostermeyer, H., (2000) Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *Eur. Food Res. Technol.*, pp. 305-309.
- Lee, I.Y., Jung, K.H., Lee, C.H., Park, Y.H., (1999) Enhanced production of laccase in *Trametes vesicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnol. Lett.*, pp. 965-968.
- Lee, S.K., George, S.D., Antholine, W.E., Hedman, B., Hodgson, K.O., Solomon, E.I., (2002) Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase. *J. Am. Chem. Soc.*, pp. 6180-6193.
- Leonowicz, A., Trojanowski, J., (1978) Induction of laccase in basidiomycetes: the laccase-coding messenger. *Acta Biochim. Pol.*, pp. 147-156.
- Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N., Golovleva, L., (1997) 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Lett.*, pp. 446-448.
- Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R., Hofrichter, M., (2010) DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 1869-1879.
- Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., (2006) *Industrial Biotransformations*. 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- Linke, D., Berger, R.G., (2011) Foaming of proteins: new prospects for enzyme purification processes. *J. Biotechnol.*, pp. 125-131
- Linke, D., Bouws, H., Peters, T., Nimtz, M., Berger, R.G., Zorn, H., (2005) Laccases of *Pleurotus sapidus*: characterization and cloning. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 9498-9505.
- Linke, D., Zorn, H., Gerken, B., Parlar, H., Berger, R.G., (2007) Laccase isolation by foam fractionation-new prospects of an old process. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 273-277.
- Lis, H., Sharon, N., (1993) Protein Glycosylation - Structural and Functional-Aspects. *Eur. J. Biochem.*, pp. 1-27.
- Liu, H.L., Kong, L.Y., Takaya, Y., Niwa, M., (2005) Biotransformation of ferulic acid into two new dihydrotrimers by *Momordica charantia* peroxidase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, pp. 816-819.

Liu, Z.F., Zeng, G.M., Zhong, H., Yuan, X.Z., Fu, H.Y., Zhou, M.F., Ma, X.L., Li, H., Li, J.B., (2011) Effect of dirhamnolipid on the removal of phenol catalyzed by laccase in aqueous solution. *World J. Microbiol. Biotechnol.*

Lomascolo, A., Record, E., Herpoël-Gimbert, I., Delattre, M., Robert, J.L., Georis, J., Dauvrin, T., Sigoillot, J.C., Asther, M., (2003) Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *J. Appl. Microbiol.*, pp. 618-624.

Luetz, S., Giver, L., Lalonde, J., (2008) Engineered Enzymes for Chemical Production. *Biotechnol. Bioeng.*, pp. 647-653.

Luria, S.E., Adams, J.N., Ting, R.C., (1960) Transduction of Lactose-Utilizing Ability among Strains of *E.coli* and *S.dysenteriae* and the Properties of the Transducing Phage Particles. *Virology*, pp. 348-390.

Majcherczyk, A., Johannes, C., Huttermann, 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.*, pp. 267-276.

Martin, C., Pecyna, M., Kellner, H., Jehmlich, N., Junghanns, C., Benndorf, D., von Bergen, M., Schlosser, D., (2007) Purification and biochemical characterization of a laccase from the aquatic fungus *Myriocoonium* sp UHH 1-13-18-4 and molecular analysis of the laccase-encoding gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 613-624.

Martínez-Alonso, M., García-Fruitós, E., Ferrer-Miralles, N., Rinas, U., Villaverde, A., (2010) Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. *Microb. Cell Fact.*

Martínez, A.T., (2002) Molecular biology and structure-function of lignin- degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 425-444.

Martínez, M.J., Ruiz-Dueñas, F.J., Guillén, F., Martínez, Á.T., (1996) Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.*, pp. 424-432.

Masuda, T., Hidaka, K., Shinohara, A., Maekawa, T., Takeda, Y., Yamaguchi, H., (1999) Chemical studies on antioxidant mechanism of curcuminoid: Analysis of radical reaction products from curcumin. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 71-77.

Masuda, T., Toi, Y., Bando, H., Maekawa, T., Takeda, Y., Yamaguchi, H., (2002) Structural identification of new curcumin dimers and their contribution to the antioxidant mechanism of curcumin. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 2524-2530.

Mathiasen, T.E., (1995) Laccase And Beer Storage. WO/1995/021240

Matthes, R., (2011) Enzyme aus Basidiomyceten zur Modifikation von Hydrokolloid-Systemen. Dissertation, Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover, Hannover.

Mester, T., Field, J.A., (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera species* strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.*, pp. 15412-15417.

Meyer, C., Schmidt, G., Berger, R.G., Koehler, P., (2010) Enzymatic oxidation of arabinoxylans with laccases from edible mushrooms., *Proceedings of the 10th International Gluten Workshop*, pp. 262-264.

Meza, J.C., Auria, R., Lomascolo, A., Sigoillot, J.C., Casalot, L., (2007) Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 162-168.

Micard, V., Thibault, J.F., (1999) Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins. *Carbohydr. Polym.*, pp. 265-273.

Miller, D.R., Tizard, I.R., Keeton, J.T., Prochaska, J.F., (2003) System for polymerizing collagen and collagen composites in situ for a tissue compatible wound sealant, delivery vehicle, binding agent and/or chemically modifiable matrix. US 6509031

Minussi, R.C., Pastore, G.M., Duran, N., (2002) Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.*, pp. 205-216.

Minussi, R.C., Pastore, G.M., Duran, N., (2007a) Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresour. Technol.*, pp. 158-164.

Minussi, R.C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G.M., Duran, N., (2007b) Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, pp. 102-107.

Moreno, A.D., Ibarra, D., Fernández, J.L., Ballesteros, M., (2012) Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Bioresour. Technol.*, pp. 101-109.

Morisaki, K., Fushimi, T., Kaneko, S., Kusakabe, I., Kobayashi, H., (2001) Screening for phenoloxidases from edible mushrooms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002/01/05 ed, pp. 2334-2336.

Muheim, A., Lerch, K., (1999) Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 456-461.

Müller, B., Münch, T., Muheim, A., Wetli, M., (1998) Process for the production of vanillin. EP0885968

Murray, D.C., (2011) *Green Biotechnology*. Dominant Publishers And Distributors, Neu Delhi.

Nazari, K., Esmaeili, N., Mahmoudi, A., Rahimi, H., Moosavi-Movahedi, A.A., (2007) Peroxidative phenol removal from aqueous solutions using activated peroxidase biocatalyst. *Enzyme and Microb. Technol.*, pp. 226-233.

Necochea, R., Valderrama, B., Díaz-Sandoval, S., Folch-Mallol, J.L., Vázquez-Duhalt, R., Iturriaga, G., (2005) Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiol. Lett.*, pp. 235-241.

New-England-Biolabs[®], (2011) Shuffle C3026H.
<http://www.neb.com/nebecomm/products/productC3026.asp>.

Ng, A., Greenshields, R.N., Waldron, K.W., (1997) Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: Formation of ferulic acid dehydrodimers. *Carbohydr. Res.*, pp. 459-462.

Niño-Medina, G., Carvajal-Millan, E., Rascon-Chu, A., Marquez-Escalante, J.A., Guerrero, V., Salas-Muñoz, E., (2010) Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: structure, sources and applications. *Phytochem. Rev.*, pp. 111-120.

Nishimura, R.T., Giammanco, C.H., Vosburg, D.A., (2010) Green, Enzymatic Syntheses of Divanillin and Diapocynin for the Organic, Biochemistry, or Advanced General Chemistry Laboratory. *J. Chem. Educ.*, pp. 526-527.

Norsker, M., Jensen, M., Adler-Nissen, J., (2000) Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocoll.*, pp. 237-243.

Novagen, (2011) User Protocol TB009 Rev. H 0211JN. http://www.emdchemicals.com/life-science-research/rosetta-gami-b-competent-cells/EMD_BIO-71135/p_ZsCb.s1O1IYAAAEjQB19.zLX?attachments=USP.

O'Malley, D.M., Whetten, R., Bao, W.L., Chen, C.L., Sederoff, R.R., (1993) The Role of Laccase in Lignification. *Plant J.*, pp. 751-757.

Oestergaard, L.H., Wu, G., (2007) Uses of Laccase. PCT/CN2006/003029

Ogola, H.J.O., Hashimoto, N., Miyabe, S., Ashida, H., Ishikawa, T., Shibata, H., Sawa, Y., (2010) Enhancement of hydrogen peroxide stability of a novel *Anabaena sp* DyP-type peroxidase by site-directed mutagenesis of methionine residues. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 1727-1736.

Olempska-Bier, Z., (2004) Laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. Chemical and Technical Assessment (Cta), FAO.

Oosterveld, A., Beldman, G., Voragen, A.G.J., (2000) Oxidative cross-linking of pectic polysaccharides from sugar beet pulp. *Carbohydr. Res.*, pp. 199-207.

Oosterveld, A., Grabber, J.H., Beldman, G., Ralph, J., Voragen, A.G.J., (1997) Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydr. Res.*, pp. 179-181.

Outten, F.W., Huffman, D.L., Hale, J.A., O'Halloran, T.V., (2001) The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, pp. 30670-30677.

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.*, pp. 920-924.

Parr, A.J., Waldron, K.W., Ng, A., Parker, M.L., (1996) The wall-bound phenolics of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*). *J. Sci. Food Agric.*, pp. 501-507.

Peters, T., (2004) Extrazelluläre Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hannover, Hannover.

- Petersen, B.R., Mathiasen, T.E., Peelen, B., Andersen, H., (1996) Use of laccase for deoxygenation of oil-containing product such as salad dressing. WO 9635768
- Pezzella, C., Autore, F., Giardina, P., Piscitelli, A., Sanna, G., Faraco, V., (2009) The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Curr. Genet.*, pp. 45-57.
- Pfeiffer, E., Höhle, S., Solyom, A.M., Metzler, M., (2003) Studies on the stability of turmeric constituents. *J. Food Eng.*, pp. 257-259.
- Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sanna, G., Faraco, V., (2011) Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Curr. Genomics*, pp. 104-112.
- Piscitelli, A., Pezzella, C., Giardina, P., Faraco, V., Giovanni, S., (2010) Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioeng. Bugs. Landes Bioscience Inc.*, pp. 254-264.
- Polaina, J., MacCabe, A.P., (2007) *Industrial Enzymes : Structure, Function and Applications*. Springer, Dordrecht.
- Potthast, A., Rosenau, T., Chen, C.L., Gratzl, J.S., (1996) A novel method for the conversion of benzyl alcohols to benzaldehydes by laccase-catalyzed oxidation. *J. Mol. Catal. A. Chem.*, pp. 5-9.
- Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J., Turkovskaya, O.V., (2004) Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, pp. 19-24.
- Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J., Turkovskaya, O.V., Haber, J., (2006) Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons and their derivatives catalyzed directly by the yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, pp. 8-15.
- Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbuchel, A., (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 296-314.
- Pühse, M., Szweda, R.T., Ma, Y.Y., Jeworrek, C., Winter, R., Zorn, H., (2009) *Marasmius scorodoni* extracellular dimeric peroxidase - Exploring its temperature and pressure stability. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, pp. 1091-1098.

Qing, G.L., Ma, L.C., Khorchid, A., Swapna, G.V.T., Mal, T.K., Takayama, M.M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H.P., Acton, T., Montelione, G.T., Ikura, M., Inouye, M., (2004) Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*, pp. 877-882.

Rabenhorst, J., Hopp, R., (2000) Process for the preparation of vanillin and microorganisms suitable therefor. US 6133003

Raghukumar, C., Mohandass, C., Kamat, S., Shailaja, M.S., (2004) Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 197-202.

Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., (1994) Identification and Synthesis of New Ferulic Acid Dehydrodimers Present in Grass Cell-Walls. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]*, pp. 3485-3498.

Ranieri, D., Colao, M.C., Ruzzi, M., Romagnoli, G., Bianchi, M.M., (2009) Optimization of recombinant fungal laccase production with strains of the yeast *Kluyveromyces lactis* from the pyruvate decarboxylase promoter. *FEMS Yeast Res.*, pp. 892-902.

Rao, S.R., Ravishankar, G.A., (2000) Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes. *J. Sci. Food Agric.*, pp. 289-304.

Reese, E.T., Maguire, A., (1969) Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Appl. Microbiol.*, pp. 242-245.

Reiß, I., Gatfield, I.-L., Krammer, G., Kindel, G., Clerc, A., (2004) Verwendung von Divanillin als Aromastoff. WO 2004/078302

Roberts, S.A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J.T., Tollin, G., Rensing, C., Montfort, W.R., (2002) Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, pp. 2766-2771.

Rodgers, C.J., Blanford, C.F., Giddens, S.R., Skamnioti, P., Armstrong, F.A., Gurr, S.J., (2010) Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? , *Trends Biotechnol.*, pp. 63-72.

Rodríguez, S., Santoro, R., Cameselle, C., Sanromén, A., (1998) Effect of the different parts of the corn cob employed as a carrier on ligninolytic activity in solid state cultures by *P. chrysosporium*. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, pp. 251-255.

Rogalski, J., Lundell, T.K., Leonowicz, A., Hatakka, A.I., (1991) Influence of aromatic compounds and lignin on production of ligninolytic enzymes by *Phlebia radiata*. *Phytochemistry*, pp. 2869-2872.

Rouau, X., Cheynier, V., Surget, A., Gloux, D., Barron, C., Meudec, E., Louis-Montero, J., Criton, M., (2003) A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry*, pp. 899-903.

Roughley, P.J., Whiting, D.A., (1973) Experiments in Biosynthesis of Curcumin. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]*, pp. 2379-2388.

Sakharov, I.Y., Vorobiev, A.C., Leon, J.J.C., (2003) Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree peroxidase. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 661-667.

Sakurai, A., Masuda, M., Sakakibara, M., (2003) Effect of surfactants on phenol removal by the method of polymerization and precipitation catalysed by *Coprinus cinereus* peroxidase. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, pp. 952-958.

Salony, Garg, N., Baranwal, R., Chhabra, M., Mishra, S., Chaudhuri, T.K., Bisaria, V.S., (2008) Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007/12/18 ed, pp. 259-268.

Santhanam, N., Vivanco, J.M., Decker, S.R., Reardon, K.F., (2011) Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends Biotechnol.*, pp. 480-489.

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

Schmid, R.D., Urlacher, V.B., (2007) *Modern Biooxidations*. WILEY-VCH, Weinheim.

Schrader, J., Etschmann, M.M.W., Sell, D., Hilmer, J.M., Rabenhorst, J., (2004) Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds current industrial processes and future prospects. *Biotechnol. Lett.*, pp. 463-472.

Schückel, J., Matura, A., van Pée, K.H., (2011) One-copper laccase-related enzyme from *Marasmius* sp.: Purification, characterization and bleaching of textile dyes. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 278-284.

- Selinheimo, E., Autio, K., Krijus, K., Buchert, J., (2007) Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 6357-6365.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A., Autio, K., (2006) Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *J. Cereal Sci.*, pp. 152-159.
- Selinheimo, E., Lampila, P., Mattinen, M.L., Buchert, J., (2008) Formation of protein - Oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 3118-3128.
- Sharma, P., Goel, R., Capalash, N., (2007) Bacterial laccases. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 823-832.
- Shin, E.S., Kim, S.K., Kim, Y.H., Jeong, Y.S., Jung, H., Park, S.K., Kim, J., Kim, H., (2010) Induction of laccase production and analysis of laccase isozymes in *Trichophyton rubrum* LKY-7. *Journal of Applied Biological Chemistry*, pp. 158-163.
- Shirano, Y., Shibata, D., (1990) Low temperature cultivation of *Escherichia coli* carrying a rice lipoxygenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level. *FEBS Lett.*, pp. 128-130.
- Shuttleworth, K.L., Postie, L., Bollag, J.M., (1986) Production of induced laccase by the fungus *Rhizoctonia praticola*. *Can. J. Microbiol.*, pp. 867-870.
- Sih, C.J., Abushanab, E., Jones, J.B., (1977) Chapter 30. Biochemical Procedures in Organic Synthesis. *Annu. Rep. Med. Chem.*, pp. 298-308.
- Sims, R., Taylor, M., Saddler, J., Mabee, W., (2008) From 1st- to 2nd-Generation Biofuel Technologies IEA Bioenergy.
- Smith, A.T., Doyle, W.A., Dorlet, P., Ivancich, A., (2009) Spectroscopic evidence for an engineered, catalytically active Trp radical that creates the unique reactivity of lignin peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, pp. 16084-16089.
- Soden, D.M., Dobson, A.D.W., (2001) Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, pp. 1755-1763.
- Solomon, E.I., Augustine, A.J., Yoon, J., (2008) Oxygen Reduction to water by the multicopper oxidases. *Dalton Trans.*, pp. 3921-3932.

Spadiut, O., Posch, G., Ludwig, R., Haltrich, D., Peterbauer, C.K., (2010) Evaluation of different expression systems for the heterologous expression of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor* in *E. coli*. *Microb. Cell Fact.*

Sponholz, W.R., Muno, H., (1994) Der Korkton - ein mikrobiologisches Problem? , *Wein Wiss.*, pp. 17-22.

Sprecher, E., Hanssen, H.P., (1982) Influence of Strain Specificity and Culture Conditions on Terpene Production by Fungi. *Planta Med.*, pp. 41-43.

Stajić, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S.P., Nevo, E., Vukojević, J., (2006) Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus species*. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 65-73.

Studier, F.W., (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, pp. 207-234.

Sugano, Y., (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell. Mol. Life Sci.*, pp. 1387-1403.

Sugumaran, M., Giglio, L.B., Kundzicz, H., Saul, S., Semensi, V., (1992) Studies on the Enzymes Involved in Puparial Cuticle Sclerotization in *Drosophila Melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, pp. 271-283.

Sundaramoorthy, M., Youngs, H.L., Gold, M.H., Poulos, T.L., (2005) High-resolution crystal structure of manganese peroxidase: Substrate and inhibitor complexes. *Biochemistry*, pp. 6463-6470.

Suresh, B., Ritu, T., Ravishankar, G.A., (2003) Vanilla flavour production through biotransformation using *Capsicum frutescens* root cultures. *Biocatalysis and Biotransformation*, pp. 333-340.

Tadesse, M.A., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., Sergi, F., (2008) An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates. *Org. Biomol. Chem.*, pp. 868-878.

Takao, S., Yokota, A., Tanida, M., (1984) Enzymatic production of tryptophan coupled to pyruvic acid fermentation. *J. Ferment. Technol.*, pp. 329-334.

Takemori, T., Ito, Y., Ito, M., Yoshama, M., (1992) Flavor and taste improvement of cacao nib by enzymatic treatment. JP 04126037

Tariq, V.N., Irvine, W.T., (1995) Ligninolytic Enzyme-Activity - a Comparison of the Veratryl Alcohol and Azure-B Assay Systems. *Biotechnol. Tech.*, pp. 197-202.

Thurston, C.F., (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, pp. 19-26.

Tonegawa, M., Dec, J., Bollag, J.M., (2003) Use of additives to enhance the removal of phenols from water treated with horseradish and hydrogen peroxide. *J. Environ. Qual.*, pp. 1222-1227.

Tønnesen, H.H., Karlsen, J., (1985) Studies on Curcumin and Curcuminoids .5. Alkaline-Degradation of Curcumin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, pp. 132-134.

Tønnesen, H.H., Karlsen, J., Vanhenegouwen, G.B., (1986) Studies on Curcumin and Curcuminoids .8. Photochemical Stability of Curcumin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, pp. 116-122.

Tsuchiya, R., Petersen, B.R., (2005) Zusammensetzung zur Reduzierung von schlechten Gerüchen und enthaltend eine Laccase. DE69828175T2

Uhlig, H., (1998) *Enzymes in flour processing and baking. Industrial Enzymes and their Application.* Wiley, New York.

Ullrich, R., Huong, L.M., Dung, N.L., Hofrichter, M., (2005) Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 357-363.

Uthandi, S., Saad, B., Humbard, M.A., Maupin-Furlow, J.A., (2010) LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 733-743.

Valeriano, V.S., Silva, A.M.F., Santiago, M.F., Bara, M.T.F., Garcia, T.A., (2009) Production of laccase by *Pycnoporus sanguineus* using 2,5 - xylydine and ethanol. *Braz. J. Microbiol.*, pp. 790-794.

van Haandel, M.J.H., Sarabér, F.C.E., Boersma, M.G., Laane, C., Fleming, Y., Weenen, H., Rietjens, I.M.C.M., (2000) Characterization of different commercial soybean peroxidase preparations and use of the enzyme for *N*-demethylation of methyl *N*-methylantranilate to produce the food flavor methylantranilate. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 1949-1954.

Vite-Vallejo, O., Palomares, L.A., Dantán-González, E., Ayala-Castro, H.G., Martínez-Anaya, C., Valderrama, B., Folch-Mallol, J., (2009) The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. *Enzyme Microb. Technol.*, pp. 233-239.

Wagner, C., (2008) Induktion von Oxidoreduktasen aus Basidiomyceten. Bachelorarbeit, Institut für Lebensmittelchemie, Leibniz Universität Hannover, Hannover.

Walker, J.R.L., McCallion, R.F., (1980) The selective inhibition of *ortho*- and *para*-diphenol oxidases. *Phytochemistry*, pp. 373-377.

Wang, Y.J., Pan, M.H., Cheng, A.L., Lin, L.I., Ho, Y.S., Hsieh, C.Y., Lin, J.K., (1997) Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, pp. 1867-1876.

Ward, G., Hadar, Y., Bilkis, I., Konstantinovsky, L., Dosoretz, C.G., (2001) Initial steps of ferulic acid polymerization by lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.*, pp. 18734-18741.

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.*, pp. 23688-23695.

Wu, G.X., Heitz, M., Chornet, E., (1994) Improved alkaline oxidation process for the production of aldehydes (vanillin and syringaldehyde) from steam-explosion hardwood lignin. *Ind. Eng. Chem. Res.*, pp. 718-723.

Xiao, Y.Z., Chen, Q., Hang, J., Shi, Y.Y., Xiao, Y.Z., Wu, J., Hong, Y.Z., Wang, Y.P., (2004) Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes sp* AH28-2. *Mycologia*, pp. 26-35.

Xu, F., (1996) Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, pp. 7608-7614.

Xu, F., (1997) Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.*, pp. 924-928.

Xu, F., (2005) Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind. Biotechnol.*, pp. 38-50.

- Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster, J.R., Brown, S.H., Palmer, A.E., Solomon, E.I., (1998) Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochem. J.*, pp. 63-70.
- Xu, Y.H., Hong, Y.H., Xiao, Y.H., Fang, W., (2007) Preparation and application of polyclonal antibody against a recombinant laccase. *Cell. Mol. Immunol.*, pp. 315-317.
- Xu, Z., Horwich, A.L., Sigler, P.B., (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature*, pp. 741-750.
- Yamanaka, K., (1999) Cold shock response in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 193-202.
- Yin, J.C., Li, G.X., Ren, X.F., Herrler, G., (2007) Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J. Biotechnol.*, pp. 335-347.
- Yokota, S., Ohiwa, S., Fujita, K., Yoshizawa, N., (1998) Reactions between β -O-4 lignin substructure model dimers and extracellular enzyme preparation or cells of a white-rot fungus *Porodaedalea pini*. *Proceedings of the International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, pp. B157-B160.
- Yoon, S.H., Lee, E.G., Das, A., Lee, S.H., Li, C., Ryu, H.K., Choi, M.S., Seo, W.T., Kim, S.W., (2007) Enhanced vanillin production from recombinant *E.coli* using NTG mutagenesis and adsorbent resin. *Biotechnol. Prog.*, pp. 1143-1148.
- Yoshida, H., (1883) LXIII. - Chemistry of lacquer (Urushi) Part I: Communication from the Chemical Society of Tokio. *J. Chem. Soc., Trans.*, pp. 472-486.
- Yoshida, T., Tsuge, H., Konno, H., Hisabori, T., Sugano, Y., (2011) The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. *FEBS J.*, pp. 2387-2394.
- Zelena, K., Hardebusch, B., Hülzdau, B., Berger, R.G., Zorn, H., (2009a) Generation of Norisoprenoid Flavors from Carotenoids by Fungal Peroxidases. *J. Agric. Food Chem.*, pp. 9951-9955.
- Zelena, K., Krings, U., Berger, R.G., (2011a) Functional expression of a Valencene Dioxygenase from *Pleurotus sapidus* in *E. coli*. *Bioresour. Technol.*

Zelena, K., Lehnert, N., Krings, U., Horváth, G., Molnár, P., Turcsi, E., Deli, J., Berger, R.G., (2011b) Degrading of carotenoids by the DyP peroxidase MsP2 from *Marasmius scorodoni*. 16th Intl. Symp. Carotenoids, Acta Biol. Cracoviensia, p. 60.

Zelena, K., Zorn, H., Nimtz, M., Berger, R.G., (2009b) Heterologous expression of the msp2 gene from *Marasmius scorodoni*. Arch. Microbiol., pp. 397-402.

Zheng, L.R., Zheng, P., Sun, Z.H., Bai, Y.B., Wang, J., Guo, X.F., (2007) Production of vanillin from waste residue of rice bran oil by *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. Bioresour. Technol., pp. 1115-1119.

Zorn, H., Langhoff, S., Scheibner, M., Nimtz, M., Berger, R.G., (2003) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β,β -carotene to flavor compounds. Biol. Chem., pp. 1049-1056.

Zorn, H., Scheibner, M., Hülzdau, B., Berger, R.G., Boer, L.D., Meima, R.B., (2011) Enzymes for use in enzymatic bleaching of food products. US 7981636

Zumárraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Plow, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M., (2007) In vitro evolution of a fungal laccase in high concentrations of organic cosolvents. Chem. Biol., pp. 1052-1064.

6 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname	Schmidt, Gunnar
Geburtsdatum, -ort	27.03.1982, Wismar
Familienstand	ledig, eine Tochter

Schulbildung

14.07.2000	Abitur, Große Stadtschule „Geschwister-Scholl-Gymnasium“, Hansestadt Wismar (Mecklenburg-Vorpommern)
------------	--

Wehrdienst

11.2000-08.2001	4. ABC-Abwehrbataillon, Albersdorf, Schleswig-Holstein
-----------------	--

Studium

10.2001-09.2003	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Grundstudium der Biochemie
-----------------	---

10.2003 bis 08.2006	Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Hauptstudium der Biochemie, Diplomarbeit: „Untersuchungen zur katalytischen Promiskuität von Esterasen“
---------------------	--

Promotion

01.2007 bis 12.2011	Leibniz Universität Hannover, wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Lebensmittelchemie bei Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger
---------------------	--