

**Identifizierung und Charakterisierung neuartiger α -Amylasen
aus Basidiomycota für die Waschmittelindustrie**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Florian Döring, M. Sc.

2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. R. G. Berger

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. H.-P. Braun

Tag der Promotion: 16.10.2018

Danksagung

Herzlichst danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die wissenschaftliche Betreuung in Verbindung mit steter und offener Diskussionsbereitschaft, das entgegengebrachte Vertrauen und den eingeräumten Freiraum zur Bearbeitung des Themas sowie die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. Diana Linke und Herrn PD Dr. Ulrich Krings für ihre herausragende Betreuung und allzeit offene Tür für Anliegen aller Art. Ihre geduldigen Erklärungen und wertvollen Tipps waren eine wesentliche Voraussetzung für das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit.

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

Der Henkel AG & Co. KGaA und dem BMBF Cluster BIODIVERSITY2021 danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit durch das Projekt.

Des Weiteren gilt mein ausdrücklicher Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, gute sowie hilfsbereite Zusammenarbeit und die gemeinsam verbrachte Zeit. Unsere Gemeinschaft hat mir immer Freude bereitet.

Vorbemerkung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom April 2014 bis Mai 2018 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. R. G. Berger angefertigt.

Teile dieser Dissertation wurden auf der Biokatalyse 2016 in Form eines Posters vorgestellt. Eine Patentanmeldung für eine α -Amylase mit einer verbesserten Waschleistung wurde 2017 veröffentlicht; fünf weitere sind aktuell (2018) in Vorbereitung.

Posterpräsentation:

Döring, F., Behrens, C., Leonhardt, R., Linke, D., Berger, R.G. (2016) Enzymes from Basidiomycota for industrial detergent applications, 8th International Congress on Biocatalysis, 28.8-1.9.2016, Hamburg, Deutschland.

Patent:

Mussmann, N.; O'Connell, T.; Herbst, D.; Berger, R. G.; L., Diana; Doering, F.
Improved washing performance using a novel alpha-amylase from *Rhizoctonia solani*
Ger. Offen. (2017), DE 102016208466 A1 20171123.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VI
1. Einleitung	1
1.1 Amylytische Enzyme	1
1.2 α -Amylasen	2
1.3 Enzyme in der Waschmittelindustrie	5
1.3.1 Anpassung der Enzyme für die Waschmittelindustrie	6
1.4 Basidiomycota als Quelle für neuartige Enzyme	7
1.5 Ziele der Arbeit	10
2. Ergebnisse	11
2.1 Screening waschaktiver Enzyme	11
2.2 Molekularbiologische Identifizierung der waschaktiven Enzyme	20
2.2.1 <i>Fomes fomentarius</i>	21
2.2.2 <i>Fomitopsis pinicola</i>	22
2.2.3 <i>Irpex lacteus</i>	24
2.2.4 <i>Lentinus strygosus</i>	26
2.2.5 <i>Pleurotus sajor-caju</i>	26
2.2.6 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	26
2.2.7 <i>Rhizoctonia solani</i>	27
2.2.8 <i>Trametes hirsuta</i>	28
2.3 Vergleich der waschaktiven α -Amylasen	30
2.4 Heterologe Expression der α -Amylase-Gene	34
3. Diskussion	37
3.1 Screening	37
3.2 Molekularbiologische Identifizierung waschaktiver Amylasen	38
3.3 Versuche zur Heterologen Expression	45
4. Ausblick	51
5. Material und Methoden	52
5.1 Material	52
5.1.1 Chemikalien und Reagenzien	52
5.1.2 Verwendete Puffer und Lösungen	52
5.1.3 Verwendete Medien	52
5.1.4 Antibiotika	53
5.1.5 DNA und Protein Längenstandards	54
5.1.6 Verwendete Oligonukleotide	55
5.1.7 Verwendete Vektoren	56

5.1.8	Enzyme	57
5.1.9	Verwendete Organismen.....	57
5.2	Methoden	60
5.2.1	Screening nach waschaktiven α -Amylasen.....	60
5.2.1.1	Kultivierung der Basidiomycota	60
5.2.1.2	Assay zur Aktivitätsbestimmung	60
5.2.1.3	Waschtests.....	60
5.2.1.4	Reinigung der waschaktiven Enzyme	61
5.2.1.5	SDS-PAGE	62
5.2.1.6	Zymografie.....	63
5.2.1.7	Proteinidentifizierung mittels ESI-MS/MS.....	64
5.2.1.8	Analyse der Hydrolyseprodukte	64
5.2.2	Molekularbiologische Arbeiten	65
5.2.2.1	Anlegen einer Flüssigkultur von <i>E. coli</i>	65
5.2.2.2	Bestimmung der OD ₆₀₀	65
5.2.2.3	Anlegen einer Dauerkultur von <i>E. coli</i>	65
5.2.2.4	Herstellen chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	65
5.2.2.5	Transformation von <i>E. coli</i>	66
5.2.2.6	Kolonie-PCR.....	66
5.2.2.7	Aufreinigung von DNA aus Plasmidpräparation und nach enzymatischen Reaktionen	67
5.2.2.8	Horizontale Gelelektrophorese	67
5.2.2.9	Mengenbestimmung von Nukleinsäuren	68
5.2.2.10	Amplifizierung der Zielgene (<i>gene fishing</i>).....	68
5.2.2.11	Bioinformatische Arbeiten	69
5.2.3	Expressionsversuche in <i>K. phaffii</i>	70
5.2.4	CRISPR/Cas9.....	70
5.2.4.1	Kultivierung und Lagerung von <i>A. oryzae</i>	70
5.2.4.2	Transformation von <i>A. oryzae</i> und Selektion der Transformanten.....	71
5.2.4.3	Vektordesign und Verifizierung von CRISPR-Ereignissen.....	71
6.	Literaturverzeichnis	74
7.	Anhang.....	85
	Lebenslauf	111

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
Cas9	<i>CRISPR-associated nuclease 9</i>
CAZy	<i>Carbohydrate-active enzymes</i>
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre)DNA
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatografie
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>Ion exchange chromatography</i>
IUBMB	<i>International union of biochemistry and molecular biology</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i> (Lysogene Brühe)
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i> (Nationales Zentrum für Biotechnologische Informationen)
Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i> (Nickel-Nitrilotriessigsäure)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

pI	isoelektrischer Punkt
QTOF	<i>Quadrupole time of flight</i> (Quadropol-Flugzeitmassenspektrometer)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SNL	Standardnährlösung
ssDNA	<i>single stranded</i> (Einzelstrang-) DNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
UV	Ultraviolett
v/v	<i>Volume by volume</i>
w/v	<i>Weight by volume</i>
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i> (Hefeextrakt Pepton Glucose)

Zusammenfassung

Der Einsatz von Enzymen in Waschmittelformulierungen steigt seit Jahrzehnten beständig an. Zu den am meist verwendeten Enzymen gehören die α -Amylasen, wobei deren bakterieller Ursprung überwiegt. Zudem sind Pilze in der Lage eine Vielfalt an extrazellulären Enzymen zu bilden, um sich ihren Lebensraum zu erschließen. In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige pilzliche α -Amylasen für den Einsatz in Waschmittelformulierungen gesucht. Insgesamt wurden dabei über 50 verschiedene Basidiomycota kultiviert und deren Sekretom nach waschaktiven α -Amylasen gescreent. Dafür wurden sowohl Aktivitätsassays als auch Applikationsstudien durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass mit *Rhizoctonia solani*, *Trametes hirsuta*, *Irpex lacteus*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pycnoporus sanguineus* und *Lentinus strygosus* acht Stämme α -Amylasen mit einer verbesserten Waschleistung produzierten. Es gelang dabei nach einer Reinigung mittels IEX und anschließender Analyse mittels SDS-PAGE sowie Zymografien, die waschaktiven Enzyme zu separieren und mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Anhand der durchgeführten *de-novo* Sequenzierung konnten die α -Amylasen von *R. solani*, *T. hirsuta*, *I. lacteus*, *F. fomentarius*, *F. pinicola*, und *P. sanguineus* identifiziert werden. Ausgehend von den korrespondierenden Genomdaten wurden Primer abgeleitet und schließlich die codierenden Gene amplifiziert. Bei einem Vergleich der α -Amylasen zeigte sich, dass Amylasen mit einer Stärke bindenden Domäne, der CBM20, die besten Waschleistungen im isoaktiven Vergleich erzielten. Von sechs identifizierten α -Amylasen weisen *R. solani*, *T. hirsuta*, *F. fomentarius* und *F. pinicola* diese Domäne auf, was verglichen mit der natürlichen Auftretswahrscheinlichkeit von zehn Prozent eine Anhäufung zeigt. Der Versuch einige ausgewählte α -Amylase-Gene in *Komagataella phaffii* zu exprimieren, führte nicht zum gewünschten Erfolg, auch nicht mit Hilfe von molekularbiologischen Varianten, wie der Anpassung der *codon usage*, der Änderung der Signalsequenzen oder der Produktion als Fusionsprotein. Daher sollte mit *Aspergillus oryzae* ein neuer Expressionsstamm designt werden, bei welchem mittels der CRISPR-Technik die wirtseigenen Amylasen ausgeknockt werden sollten. Nach der Sequenzierung der Genombereiche, stellte sich heraus, dass es zu keinen CRISPR vermittelten Deletionen im Bereich der Zielgene gekommen war.

Schlagnworte: Screening, Sekretom, Basidiomycota, α -Amylase, Waschmittel

Abstract

For decades, there is a continuous increase in the usage of enzymes in detergent formulations. α -Amylases, especially of bacterial origin, are one of the most used enzymes. Also fungi can produce a variety of extracellular enzymes to tap their habitats. In the present work, it was searched for novel fungal α -amylases as ingredients for detergent formulations. In total, over 50 different Basidiomycota were cultivated and their secretome was screened for washing active amylases. Therefore, activity assays and application tests were performed. It was shown, that *Rhizoctonia solani*, *Trametes hirsuta*, *Irpex lacteus*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pycnoporus sanguineus* and *Lentinus strygosus* produced α -amylases with an improved washing efficiency. After purification by means of IEX and analysis by means of SDS-PAGE and zymography the wash active enzymes were separated and subsequently identified by use of mass spectrometry. The *de-novo* sequencing led to an identification of the α -amylases from *R. solani*, *T. hirsuta*, *I. lacteus*, *F. fomentarius*, *F. pinicola*, and *P. sanguineus*. Primer were designed from the corresponding genome data. Afterwards the coding genes were amplified. The comparison of the α -amylases showed that α -amylases with a starch binding domain, the CBM20 domain, had the best washing performance in iso-active comparison. The identified α -amylases from *R. solani*, *T. hirsuta*, *F. fomentarius* and *F. pinicola* possessed this domain. This is an accumulation compared to the natural probability of occurrence. Since the try to express some selected α -amylases genes into *Komagataella phaffii* was not successful, a new expression strain was designed with *Aspergillus oryzae*. In this the host amylases should be knocked out using the CRISPR technique. After sequencing of the genome regions it was apparent that there were no deletions through CRISPR in the area of the target genes.

Keywords: Screening, secretome, Basidiomycota, α -amylase, detergent

1. Einleitung

1.1 Amylytische Enzyme

Stärke zählt zu den Hauptspeicherprodukten von Pflanzen und dient somit als wichtiger Bestandteil des Kohlenstoffkreislaufes. Sie setzt sich dabei aus zwei Polykondensaten zusammen, der Amylose, einer unverzweigten α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosekette und dem Amylopektin, welches zusätzlich zu den α -1,4-Verknüpfungen auch α -1,6-verknüpfte Seitenketten aufweist. Das Amylopektin hat mit 70 - 90 % einen höheren Anteil verglichen zur Amylose mit 10 - 30 % (Kossmann & Lloyd, 2000; Pérez & Bertoft, 2010). Die Anteile von Amylopektin und Amylose variieren zwischen den Pflanzenarten. Form und Größe der Stärkekörner sind ebenfalls von ihrem Ursprung abhängig und weisen Durchmesser von 0,1 bis 200 μm auf (Pérez & Bertoft, 2010).

Stärke abbauende Enzyme kommen ubiquitär in Pflanzen, Pilzen und anderen Eukaryoten, Bakterien und Archaea vor (Lombard *et al.*, 2014). Zu den amylytischen Enzymen zählen unter anderem α -Amylasen, α -Glucosidasen, β -Amylasen, Pullanasen und Isoamylasen. Alle genannten Enzyme sind in der Lage, Stärke als Substrat abzubauen. Dabei agieren sie an unterschiedlichen Orten des Polysaccharids (Møller & Svensson, 2016). Im Vergleich zu allen anderen amylytischen Enzymen sind Pullanasen in der Lage, die α -1,6-Verknüpfungen zu hydrolysieren (Abbildung 1.1).

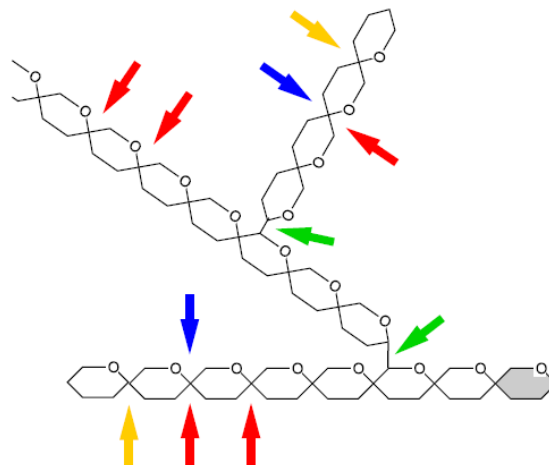


Abbildung 1.1 Amylopektin mit den spaltbaren glycosidischen Verbindungen. Rote Pfeile zeigen für α -Amylase spaltbare Verbindungen an, blaue Pfeile die für β -Amylasen, gelbe Pfeile für α -Glucosidasen und grüne Pfeile für Pullanasen spaltbare Verbindungen nach (Møller & Svensson (2016).

1.2 α -Amylasen

Amylasen sind in der Lage, Stärke in diverse Produkte wie Dextrine oder kleinere Moleküle wie Maltose zu hydrolysieren. Bereits 1811 wurden erstmals Stärke abbauende Enzyme von Kirchoff entdeckt. Es dauerte jedoch über ein Jahrhundert, bis 1930 Ohlsson die Einteilung in α - und β -Amylasen vornahm (Gupta *et al.*, 2003). Mit durchschnittlich 25 μm Größe ist das Stärkekorn als Substrat etwa 3000 mal größer als die α -Amylase selbst. (Dhital *et al.*, 2017).

Die katalytische Domäne der α -Amylasen setzt sich aus acht parallelen β -Faltblättern zusammen, welche von acht α -Helices umschlossen sind. Die $(\alpha/\beta)_8$ -Struktur wird von variablen Schleifen umgeben, die in ihrer Länge und Zusammensetzung variieren können. Die Gesamtheit dieser Struktur wird als Domäne A bezeichnet. In der Primärstruktur wird diese Domäne A nach dem dritten β -Faltblatt von der Domäne B unterbrochen, welche in der 3D-Struktur des Enzyms leicht vor der Domäne A hervorsteht. In der Domäne B sind sehr oft Calciumionen gebunden, die die Stabilität des Enzyms erhöhen (Gopinath *et al.*, 2017). Diese Domäne zeichnet sich durch mehrere β -Faltblätter aus, die keiner besonderen Ordnung unterliegen. Die Größe und Struktur dieser Domäne ist zwischen den α -Amylasen sehr variabel (Prakash & Jaiswal, 2010). Die nach innen liegende Seite der Domäne formt einen Großteil der Substratbindetasche (Prakash & Jaiswal, 2010). Am C-Terminus der α -Amylasen sitzt die Domäne C. Diese weist repetitive β -Faltblattstrukturen auf, die auch als *Greek key motif* bezeichnet werden (Machius *et al.*, 1995). Die katalytisch aktiven Aminosäuren befinden sich über die komplette Sequenz verteilt. Am Ende des dritten β -Faltblattes der Domäne A befindet sich ein Histidin, welches mit dem Substrat interagiert. Das vierte β -Faltblatt beinhaltet die an der Reaktion (Abbildung 1.3) beteiligte Asparaginsäure während das fünfte β -Faltblatt die beteiligte Glutaminsäure trägt. Das siebte β -Faltblatt weist ein Histidin und eine Asparaginsäure auf, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Substrat eingehen können (Prakash & Jaiswal, 2010) (Abbildung 1.2). Weiterhin gehören α -Amylasen zu den Metallo-Enzymen (MacGregor *et al.*, 2001) und zeigen eine Vielzahl von Amylasen mit Strukturen für stabilisierende Ca^{2+} oder Cl^- Ionen (Nielsen and Borchert, 2000).

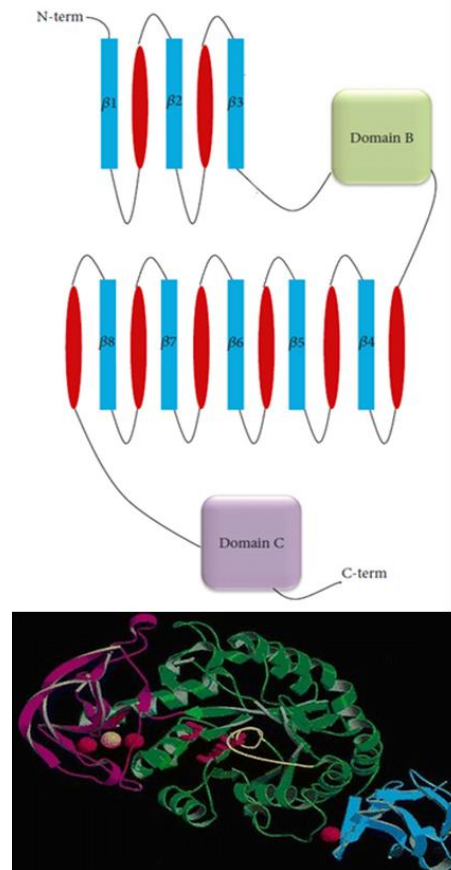


Abbildung 1.2 Abfolge der Domänen A, B und C von α -Amylasen (Gopinath *et al.*, 2017). Darunter ist eine 3D-Struktur einer α -Amylase mit den Domänen A (grün), B (rot) und C (blau) dargestellt (Prakash & Jaiswal, 2010).

Der Vorgang der α -Amylase vermittelten Hydrolyse von Stärke ist einzigartig. Im Vergleich zu anderen amylolytischen Enzymen können α -Amylasen zufällige α -1,4-glycosidische Bindungen spalten und sind damit nicht von reduzierenden Zuckerresten abhängig (Gupta *et al.*, 2003). Es wurde allerdings gezeigt, dass eine optimale Substratbindung vorliegt, wenn Maltose die Abgangsgruppe darstellt (Brayer *et al.*, 2000). Die Hydrolyse von Stärke beinhaltet den Abbau eines unlöslichen Substrats zu wasserlöslichen Produkten wie Maltose, Maltotriose und weiteren Oligosacchariden, welche sowohl α -1,4- als auch α -1,6-Bindungen aufweisen können (Li *et al.*, 2004; Souza & Magalhães, 2010). Bei der Hydrolyse von Stärke im aktiven Zentrum des Enzyms sind maßgeblich die beiden Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure beteiligt. Die Spaltung eines Polysaccharid erfolgt in insgesamt fünf Teilschritten (van der Maarel *et al.*, 2002) (Abbildung 1.3). Der glycosidische Sauerstoff wird von der Glutaminsäure protoniert. Dies induziert einen nukleophilen S_N1 -Angriff der Asparaginsäure am C1-Kohlenstoff des Polysaccharids (Kuriki & Imanaka, 1999). Es entsteht eine „Oxocarbenium-Ion“-artige Zwischenstufe mit kovalenten Bindungen. In einem

dritten Schritt wird die kovalente Bindung durch den Angriff eines Wasser- oder Glucosemoleküls zerstört. Die „Oxocarbenium-Ion“-Zwischenstufe bildet sich erneut aus. Durch die Übertragung eines Wasserstoffatoms von einem Wassermolekül auf das Glutamat wird die Bindung wieder gespalten. Die Glucose-Aspartat-Oxocarbenium-Ion-Bindung wird so durch eine neue OH-Gruppe ersetzt. Da das Zwischenprodukt zwei Mal neu gebildet wird, wird dieser Mechanismus auch „*double displacement mechanism*“ genannt (Koshland, 1953; Prakash & Jaiswal, 2010).

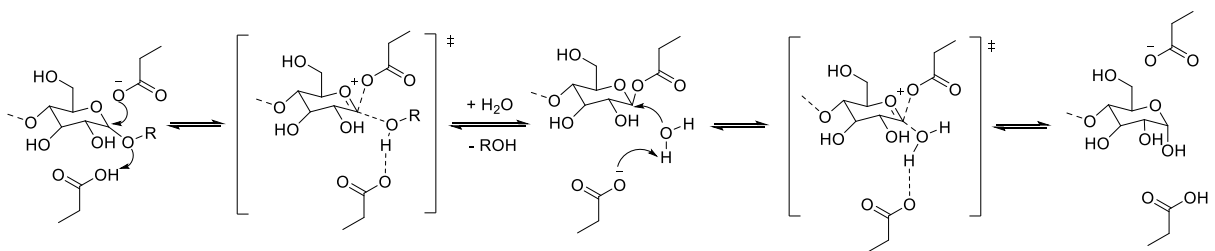


Abbildung 1.3 Reaktionsschema der fünf Teilschritte der enzymatischen Stärkehydrolyse mit der zweifachen Ausbildung der „Oxocarbenium-Ion“-artigen Zwischenstufe (Prakash & Jaiswal, 2010).

Der Abbau von Stärke und anderen schwer wasserlöslichen Polysacchariden ist aus enzymatischer Sicht eine Herausforderung, da die Substratkette für das aktive Zentrum oft sehr schwer zugänglich ist. Stärke abbauende Enzyme weisen des Öfteren Stärkebindedomänen auf (*starch-binding domains*, SBDs), welche die Bindung an Stärkekörnern oder anderen Substraten vermitteln. Die SBDs unterteilen sich dabei in neun Familien von Kohlenhydrat-Binde-Modulen (*carbohydrate-binding module*, CBM) (Christiansen *et al.*, 2009). Die generelle Zuordnung der CBMs in die einzelnen Familien basiert auf deren Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäurebasis sowie deren Strukturähnlichkeiten und unterteilt sich mittlerweile in 54 verschiedene Familien. Im Sekretom von Pilzen wurde zuerst die CBM20 Familie entdeckt, welche die am besten untersuchte ist. Diese Domäne ist sehr oft mit katalytischen Domänen der GH-Familien 13, 14, 15 und 77 verknüpft. Das wachsende Interesse an dieser Familie spiegelt sich in den Einträgen der CAZy Datenbank wieder. Waren es 2009 noch etwas über 300 Einträge, so sind es 2018 bereits 1343 Einträge (http://www.cazy.org/CBM20_all.html, letzter Aufruf 10.04.2018). Die bakteriellen CBMs sind mit 1053 Einträgen am meisten vertreten, gefolgt von den eukaryotischen Bindedomänen (267) sowie denen der Archaea (7) und 16 nicht klassifizierten CBM20.

Die grundlegende Funktion der SBD ist die Bindung an Stärkekörner. Dies ermöglicht dem Enzym eine Interaktion mit dem unlöslichen Substrat. Des Weiteren führt es das Substrat zum katalytischen Zentrum des Enzyms und kann so die Oberfläche des Stärkekorns aufbrechen (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005).

1.3 Enzyme in der Waschmittelindustrie

Die Nachfrage nach Enzymen steigt stetig an. Wurde 2016 die 5-Milliarden-Marke des weltweiten Umsatzes mit Enzymen für die industrielle Anwendung überboten, so wird für 2021 ein Umsatz von 6,7 Milliarden US-Dollar prognostiziert (BBC Market Research Report, Januar 2017). Der Weltmarkt für Waschmittel wird voraussichtlich von einem Umsatz von 8,8 Milliarden US-Dollar in 2017 auf geschätzte 10,8 Milliarden US-Dollar bis 2022 anwachsen (BBC Market Research Report, Mai 2018).

Enzyme nehmen auch in der Waschmittelindustrie eine immer größer werdende Rolle ein (Niyonzima & More, 2014). Gupta *et al.* (2003) beschreiben eine mögliche Verringerung der Waschttemperatur in der Gegenwart von Enzymen. In aktuellen Waschmittel-formulierungen finden sich Vertreter mehrerer Enzymklassen. Peptidasen, Amylasen, Lipasen und Cellulasen gehören zu den bekanntesten Enzymen (Gaubert *et al.*, 2016). Des Weiteren werden auch Mannanasen und Pektinasen Waschmitteln zugesetzt (Wagner Seite 125). Peptidasen wurden bereits 1913 vom deutschen Chemiker Otto Röhm für das Entfernen proteinhaltiger Flecken als aktive Reinigungskomponente in Waschmitteln eingesetzt (Showell, 1999; Vojcic *et al.*, 2015). Das erste kommerziell erhältliche Waschmittel mit dem Zusatz einer bakteriellen Peptidase kam von den Gebrütern Schnyder 1959 auf den Markt (Vojcic *et al.*, 2015). α -Amylasen nehmen mit 30 % Marktanteil den zweiten Platz nach den Peptidasen unter den zugesetzten Waschmittelenzymen ein (Niyonzima & More, 2014) und sind seit 1975 in Waschmitteln zu finden (Wagner Seite 128). Die Hälfte des Anteils machen dabei α -Amylasen der Spezies *Bacillus* aus (Schallmey *et al.*, 2004). Die Nachfrage nach α -Amylasen mit verbesserten Eigenschaften für die Detergenzindustrie steigt konstant an, da momentan verwendete α -Amylasen noch nicht alle geforderten Eigenschaften aufweisen. Der biotechnologische Fokus bei den Screenings und der molekularbiologischen Optimierung von α -Amylasen lag auf der von der Waschmittelindustrie geforderten pH-Stabilität und der Aktivität bei hohen Temperaturen. Da sich jedoch der Waschprozess in den letzten Jahren hin zu niedrigeren Waschttemperaturen entwickelt hat, ist die Entwicklung von Waschmittelenzymen mit einem weiten Temperaturbereich, auch unterhalb von 20 °C in den

Vordergrund gerückt (Vojcic *et al.*, 2015; Madhavan *et al.*, 2017). Novozymes bietet mit Duramyl[®], Termamyl[®] und Stainzyme[®] drei waschaktive α -Amylasen an. Genencore International vertreibt die PurafectOxAm und ABEnzymes das BIOTOUCH[®] AML 900 (Niyonzima & More, 2014).

Die Zugabe von α -Amylasen zu Waschmitteln kann die Fleckentfernung stärkehaltiger Verschmutzungen verbessern. Oftmals sind diese Verschmutzungen auf körnige oder nur teilweise verkleisterte Stärke zurückzuführen. Diese kristallinen Strukturen zu zerstören erfordert den Einsatz hoher Temperaturen und einen Überschuss an Wasser (Wang & Copeland, 2013). Diese Studie zeigt ebenfalls, dass die Verkleisterung bei Temperaturen von 50 – 80 °C beginnt, aber noch nicht abgeschlossen ist. Dies hat zur Folge, dass Verschmutzungen von verarbeiteten Lebensmitteln oftmals nicht vollständig verkleisterte Stärke beinhalten. Für die Entfernung der Verschmutzungen bei modernen Waschprogrammen mit Temperaturen unterhalb der Verkleisterungstemperatur ist die enzymatische Hydrolyse der Stärke unumgänglich.

Da sich Enzyme als natürliche Biokatalysatoren nicht in ihren Reaktionen verbrauchen, erzielen sie ein sehr gutes Volumen-zu-Wirkungs-Verhältnis (Ahuja *et al.*, 2004). Des Weiteren verringert sich mit ihrer Zugabe zum Waschmittel neben der Waschzeit auch der Energieverbrauch (Hasan *et al.*, 2006).

1.3.1 Anpassung der Enzyme für die Waschmittelindustrie

Enzyme müssen sowohl eine hohe Aktivität als auch eine hohe Spezifität aufweisen. Zusätzlich müssen die Biokatalysatoren stabil gegenüber harschen Bedingungen sein (Madhavan *et al.*, 2017). Enzyme sind in Waschmittelformulierungen Inhaltsstoffen wie anionischen Tensiden (SDS), nicht-ionischen Tensiden (Tween 20, 40, 60, 80, Triton X), Natriumhypochlorit, Wasserstoffperoxiden sowie Natriumperboraten ausgesetzt (Niyonzima & More, 2014; Mussmann *et al.*, 2017). Eine α -Amylase für den Einsatz in Waschmittel muss demnach stabil und kompatibel mit Emulgatoren, Bleichen und Oxidationsmitteln in geringen Konzentrationen sein. Zusätzlich muss das Enzym ein weites Temperaturoptimum sowie eine Toleranz gegenüber alkalischen Bedingungen aufweisen (Niyonzima & More, 2014).

Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden, ist die Suche nach neuartigen Enzymen für die Waschmittelindustrie seit Jahrzehnten im Gange. Die zielgerichtete Evolution (*directed*

evolution) hat den großen Vorteil einer enormen Geschwindigkeit im Vergleich zu der natürlichen Evolution (Wang *et al.*, 2012). Bei dieser Variante wird zuerst eine Mutanten-Bibliothek erstellt. Diese wird beforscht und es folgt die Auswahl der Mutanten mit einer verbesserten Enzymeigenschaft. Abschließend erfolgt die Identifizierung des mutierten Gens. Jedoch generiert diese Vorgehensweise einen enorm hohen Aufwand, allein die Anzahl der zu untersuchenden Mutanten betreffend. Werden beispielsweise nur 10 Aminosäuren verändert, ergibt sich daraus eine Anzahl von 2010 Mutanten (Madhavan *et al.*, 2017). Aufgrund dessen bietet es sich an, zielgerichtete Mutationen durchzuführen. Diese erhöhen die Spezifität, Stabilität, Aktivität, Löslichkeit und Produktion von Proteinen (Winkler & Kao, 2014). Ziel dieser gerichteten Mutation kann die Erhöhung von Disulfidbrücken oder die Erhöhung der posttranslationalen Modifikationen wie Glycosidierungen sein. Ebenso werden nach außen ragende Loop-Strukturen oftmals gekürzt und im Allgemeinen ein kompakteres Enzym angestrebt, um die Thermophilie zu erhöhen. Negativ geladene Aminosäurereste erhöhen die Aktivität bei höheren Temperaturen ebenfalls (Vojcic *et al.*, 2015). Diese Erkenntnisse werden genutzt, um im Gegenzug die Aktivität der Enzyme bei geringeren Temperaturen zu erhöhen. Das Verhältnis von geladenen und ungeladenen Aminosäuren wird angepasst, um die Löslichkeit oder die Bindung an das Substrat in der spezifischen Anwendung zu verbessern. Neben der Änderung der Aminosäuren wird oftmals die DNA-Sequenz geändert, um die Expression zu steigern. Präferierte Codons werden verwendet, ebenso werden GC-Gehalte angepasst. Um eine bessere Bindung der Ribosomen an die mRNA zu ermöglichen, wird der 5' untranslatierte Bereich oftmals sehr AT-reich gestaltet (Gilis, 2006; Prakash & Jaiswal, 2010; Litzka *et al.*, 2012; Vojcic *et al.*, 2015). Das *de novo* Design von Enzymen ist die neueste Form der Proteinanpassung. Dazu wird zuerst das aktive Zentrum des Enzyms erstellt. Für die Berechnungen muss sowohl der Reaktionsmechanismus als auch die Interaktion zwischen dem katalytischen Zentrum und dem Substrat bekannt sein. Grundlage für die Berechnungen bilden Proteindatenbanken. Wenn sowohl das aktive Zentrum als auch das Rückgrat des Enzyms erstellt wurden, werden verschiedenste Mutationen im aktiven Zentrum simuliert und die Bindung zum Substrat berechnet. Aus diesem Prozess generierte Enzyme können dann heterolog produziert und getestet werden (Madhavan *et al.*, 2017).

1.4 Basidiomycota als Quelle für neuartige Enzyme

Für die Suche nach Enzymen für die Waschmittelindustrie sind intrazelluläre Proteine nicht von primärem Interesse, da diese bei physiologischen Umgebungsbedingungen ihre höchste

Aktivität aufweisen und insbesondere keine hohe Toleranz gegenüber alkalischen pH-Werten zeigen (Madhavan *et al.*, 2017).

Pilze sekretieren eine große Vielfalt an Enzymen (Gopinath *et al.*, 2017). Die Sekretion ermöglicht eine Analyse des Kulturüberstandes während der Kultivierung sowie eine direkte Ernte der Enzyme ohne die Gefahr einer Zellyse (Krupodorova *et al.*, 2014). Verglichen mit Bakterien zeigen Pilze oftmals ein anderes Arsenal an Enzymen (Erjavec *et al.*, 2012). Es wird davon ausgegangen, dass 99 % der mikrobiellen Vielfalt unter Laborbedingungen nicht dargestellt werden kann (Madhavan *et al.*, 2017). Basidiomycota hingegen wachsen auf vielen unterschiedlichen Substraten wie industriellen Nebenströmen und besetzen in der Natur biologische Nischen (Da Lage *et al.*, 2004; Polizeli & Rai, 2013). Ungeachtet der vorliegenden Substrate sekretieren Basidiomycota eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme, um sich ihren Lebensraum zu erschließen (Bouws *et al.*, 2008).

Zusätzlich unterliegen die sekretierten Enzyme posttranslationalen Modifikationen und weisen sehr oft Glycosidierungen auf, die die Löslichkeit und die Stabilität der Proteine verbessern (Shental-Bechor & Levy, 2008; Welinder & Tams, 2010). Des Weiteren besitzen pilzliche Enzyme eine große Toleranz gegenüber einem pH-Wert von zwei bis elf (Polizeli & Rai, 2013).

Zeitgleich ist die Suche nach kalt-aktiven Enzymen in den Fokus gerückt (Santiago *et al.*, 2016). Es gibt noch keinen Beweis für Pilzwachstum über 45 °C (Morgenstern *et al.*, 2012), sodass davon ausgegangen werden kann, dass die zu untersuchenden Enzyme bei niedrigen Temperaturen aktiv sein werden.

Bei den Vorteilen ist es nicht überraschend, dass die Basidiomycota immer mehr in den Fokus der Forschung geraten. Davon ausgehend, dass es in etwa 1,5 Millionen Arten im Reich der Pilze gibt und davon weniger als 10 % beschrieben worden, lässt sich das große Potential erahnen. Hinzu kommt, dass etwa 70 % der beschriebenen Arten aus dem Phylum der Ascomycota stammen und damit die Forschung an den Basidiomycota bisweilen drastisch unterrepräsentiert ist (Blackwell, 2011; Schmidt-Dannert, 2016).

Basidiomycota dienen allerdings nicht nur als Quelle für neuartige Enzyme, sondern rücken immer weiter in den Fokus der Gentechnik. Bereits seit mehreren Jahrzehnten können Basidiomycota wie beispielsweise *Coprinopsis cinerea*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus marmoreus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus* sp. gentechnisch modifiziert werden. Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation (mittlerweile neu bezeichnet als *Rhizobium radiobacter*) wurde dabei erfolgreich für *H. marmoreus*, *F. velutipes*, *G. frondosa* (Hatoh *et al.*, 2013), *P. chrysosporium* (Li & Zhang, 2005) sowie für *P. ostreatus* (Ding *et al.*, 2011) und *Rhizoctonia solani* gezeigt (Wu & Brien, 2009). *Lyophyllum decastes* wurde mittels Partikel-Bombardment erfolgreich transformiert (Sunagawa *et al.*, 2007). Diese Transformationstechniken haben den zufälligen Insertionsort der Fremd-DNA gemeinsam. Mit dem Aufkommen der CRISPR-Technik war es möglich zielgerichtet das Genom von Basidiomycota zu modifizieren. Die Bezeichnung CRISPR ergibt sich aus *Clustered regular interspaced short palindromic repeat* (Adli, 2018). Bereits 1987 wurde diese Genstruktur in *E. coli* und 1993 in Mycobakterien gefunden. Erst im Jahr 2002 wurde diese Abfolge von variablen Nukleotiden mit einer Länge von 23 bis 47 Basen sowie der Unterbrechung dieser durch palindromische Sequenzwiederholungen von 21 bis 72 Basen als CRISPR bezeichnet. Als Werkzeug für die Gentechnik wurde diese Methode 2012 durch Emmanuelle Charpentier und Jennifer Doudna bei der Erforschung des Immunsystems verschiedener Bakterien und Archaea entdeckt. Dieses beruht darauf, dass die variablen Bereiche Sequenzabschnitte von Phagen-DNA abdecken. Für den Einsatz als Genschere in der Molekularbiologie werden CRISPR-assoziierte Nukleasen wie beispielsweise die Cas9- oder Cpf1-Nuklease verwendet (Adli, 2018; Clarke *et al.*, 2018). Für die Genomeditierung werden sehr oft crRNA und tracrRNA in einem selbstthyridisierenden RNA-Strang vereint (*single guide RNA*, sgRNA). Die sgRNA muss frei von einem poly-A-Teil sowie vom 5'Cap sein. Dafür wird diese entweder mittels eines U6-Promotors transkribiert oder gezielt von Ribozymen prozessiert (Schuster *et al.*, 2016). Für die Modifizierung von Eukaryoten wird der Endonuklease eine Signalsequenz angehängt, sodass diese in den Zellkern transportiert wird (Nødvig *et al.*, 2015). Das Prinzip dieser Technik beruht auf einem Strangbruch der DNA und der anschließenden Reparaturmechanismen. Sehr oft kommt es dabei zum *non-homologous end joining* (NHEJ) des DNA-Stranges (Clarke *et al.*, 2018). Bei der Zusammenführung der DNA kommt es dabei häufig zu Deletionen, welche eine Gen-*knockout* zur Folge haben. Seltener kommt es zur *homology directed repair* (HRD), bei der der betroffene Genabschnitt mittels homologer

Rekombination, bei gleichzeitiger Vorlage eines Templates, zum Austausch des Genabschnittes führt (Nødvig *et al.*, 2015; Adli, 2018).

Diese Technik wurde bereits erfolgreich in verschiedenen Basidiomycota angewendet. Zum einen wurde ein Laccase-Gen von *Agaricus bisporus* inaktiviert, sodass die Fruchtkörper sich nicht mehr braun färben (Waltz, 2016). *Ustilago mayidis* wurde ebenfalls erfolgreich gezielt gentechnisch modifiziert (Schuster *et al.*, 2016). Der Modellorganismus *Coprinopsis cinerea* konnte ebenfalls mit CRISPR/Cas9 editiert werden. Die Nutzung dieser Technik bei der gleichzeitig steigenden Anzahl der vollständig sequenzierten Genome von Basidiomycota ermöglicht die Etablierung der gentechnischen Modifikation dieses Phylums. So können Synthese-Wege verändert werden und Biotransformationen mit höheren Ausbeuten erzielt werden. Es ist ebenso denkbar Basidiomycota als Expressionswirte zu nutzen, da diese eine effiziente Proteinsekretion bieten. Ähnlich wie bei Pflanzen kann das Glycosidierungsmuster angepasst werden (Sukenik *et al.*, 2018), um die Forschung an oral applizierbaren Vakzinen weiter voran zu treiben (Pérez-Martínez *et al.*, 2015).

1.5 Ziele der Arbeit

Der Einsatz von Enzymen in Waschmitteln hat in den letzten Jahrzehnten enorm an Bedeutung hinzugewonnen. Die größtenteils aus bakteriellen Ursprungs stammenden α -Amylasen, die heutzutage in Waschmitteln zu finden sind, erfüllen noch nicht alle Anforderungen. Ein Teilziel war es, Basidiomycota und deren Sekretom nach neuartigen α -Amylasen für die Waschmittelindustrie zu beforschen. Mittels Applikationsstudien sollte der Nachweis der Verbesserung der Waschleistung erbracht werden. Die dafür verantwortlichen Enzyme sollten identifiziert sowie deren korrespondierende Gensequenz amplifiziert werden. Eine heterologe Überexpression der identifizierten Gene in einem Expressionswirt und die Charakterisierung der resultierenden Enzyme waren weitere Teilziele.

2. Ergebnisse

2.1 Screening waschaktiver Enzyme

Für das Screening nach neuartigen α -Amylasen für die Verwendung im Waschmittel wurden 51 Basidiomycota untersucht. Die Kultivierung wurde wie in 5.2.1 beschrieben durchgeführt. Es erfolgte eine tägliche Probenahme, mit welcher sowohl Stärkegehalt als auch α -Amylase-Aktivität untersucht wurden. Zeigte sich eine α -Amylase-Aktivität, wurde ein erster Waschtest über 16 h bei 30 °C durchgeführt. Insgesamt zeigten 19 Basidiomycota, verglichen mit der Negativkontrolle, eine Verbesserung der Waschleistung. Diese Kandidaten wurden bis zum Tag der höchsten Aktivität kultiviert und der Kulturüberstand aufkonzentriert. Mit dem so erhaltenden Kulturüberstand wurden aktivitätsgleiche Waschttests mit einer Aktivität von 100 mU (5.2.1.2) durchgeführt und die Bleichung der Lämpchen wurde mittels Farbmessgerät detektiert (5.2.1.3). Hierbei stellten sich mit *Rhizoctonia solani*, *Trametes hirsuta*, *Irpex lacteus*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pycnoporus sanguineus* und *Lentinus strygosus* insgesamt acht Basidiomycota heraus, welche sowohl beim Waschleistungstest am Institut für Lebensmittelchemie (Hannover) als auch beim Kooperationspartner Henkel AG & Co. KGaA (Düsseldorf) überzeugen konnten. Die Ergebnisse des Screenings sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst. Zeigten Kulturüberstände bei 30 °C und 16 h Inkubation keine Aufhellung der Teststoffe, wurde diese beim Test bei 40 °C nicht mehr berücksichtigt.

Tabelle 2.1 Waschleistung bei 30 °C für 16 h und bei 40 °C für 1 h der getesteten Basidiomycota. Beurteilt wurde die Verbesserung der Waschleistung zur Negativkontrolle ohne die Zugabe von Enzym. Sehr gute Waschleistung ++, sichtbare Waschleistung +, keine Waschleistung -.

Interne Nr.	Basidiomycota	Abkürzung	Waschleistung	
			30 °C, 16 h	40 °C, 1 h
1	<i>Armillaria mellea</i>	Ame	-	
6	<i>Collybia fusipes</i>	Cfu	-	
14	<i>Lepista nuda</i>	Lnu	-	
17	<i>Fomitopsis pinicola</i>	Fpi	++	++
18	<i>Ganoderma applanatum</i>	Gap	-	
19	<i>Trametes versicolor</i>	Tve	+	-
20	<i>Gloeophyllum odoratum</i>	God	-	
23	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Ibe	-	

25	<i>Lentinula edodes</i>	Led	+	-
52	<i>Piptoporus betulinus</i>	Pbe	-	
64	<i>Pleurotus lampas</i>	Pla	-	
71	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Psan	++	++
72	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	Psch	-	
76	<i>Polyporus umbellatus</i>	Pum	-	
79	<i>Sparassis crispa</i>	Scr	-	
80	<i>Serpula lacrymans</i>	Sla	+	-
81	<i>Tyromyces floriformis</i>	Tfl	-	
83	<i>Trametes suaveolens</i>	Tsu	-	
88	<i>Wolfiporia cocos</i>	Wco	-	
206	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Lsu	-	
213	<i>Agrocybe aegerita</i>	Aae	-	
218	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pos	+	-
231	<i>Tremella mesenterica</i>	Tme	-	
232	<i>Flammulina velutipes</i>	Fve	++	+
241	<i>Phallus impudicus</i>	Pim	-	
246	<i>Grifola frondosa</i>	Gfr	-	
248	<i>Fomes fomentarius</i>	Ffo	++	++
250	<i>Stereum rugosum</i>	Sru	-	
257	<i>Auriporia aurea</i>	Aau	-	
262	<i>Schizophyllum commune</i>	Sco	+	-
265	<i>Psilocybe cubensis</i>	Pcu	-	
272	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Gtr	++	+
275	<i>Irpex lacteus</i>	Ila	++	++
276	<i>Funalia trogii</i>	Ftr	-	
277	<i>Ganoderma lucidum</i>	Glu	-	
280	<i>Coprinus comatus</i>	Cco	-	
284	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Psaj	++	++
286	<i>Polyporus squamosus</i>	Psq	-	
291	<i>Postia placenta</i>	Ppi	-	
292	<i>Microporus affinis</i>	Maf	-	
293	<i>Ustilago maydis</i>	Uma	-	
295	<i>Agaricus bisporus</i>	Abi	-	

299	<i>Hypholoma sublateritium</i>	Hsu	-	
300	<i>Lentinus strygosus</i>	Lst	++	++
305	<i>Trametes gibosa</i>	Tgi	-	
308	<i>Trametes hirsuta</i>	Thi	++	++
309	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rso	++	++
311	<i>Hymenochaete rubiginosa</i>	Hru	-	
312	<i>Asterostroma cervicolor</i>	Ace	-	
314	<i>Phellinus pini</i>	Ppi	-	
315	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pch	++	+

Die Basidiomycota *R. solani*, *T. hirsuta*, *I. lacteus*, *F. fomentarius*, *F. pinicola*, *P. sajor-caju*, *P. sanguineus* und *L. strygosus*, welche die größte Verbesserung der Waschleistung zeigten (Tabelle 2.1), stammen aus dem Reich der Agaricomycotina, wobei vier der Familie der Polyporaceae (*F. fomentarius*, *T. hirsuta*, *L. strygosus*, *P. sanguineus*) und mit *I. lacteus* und *F. pinicola* insgesamt sechs der Ordnung der Polyporales zuzuordnen waren. Die Aufteilung der Basidiomycota mit dem höchsten Potential für die Anwendung in Waschmittelformel ist in der Abbildung 2.1 dargestellt.

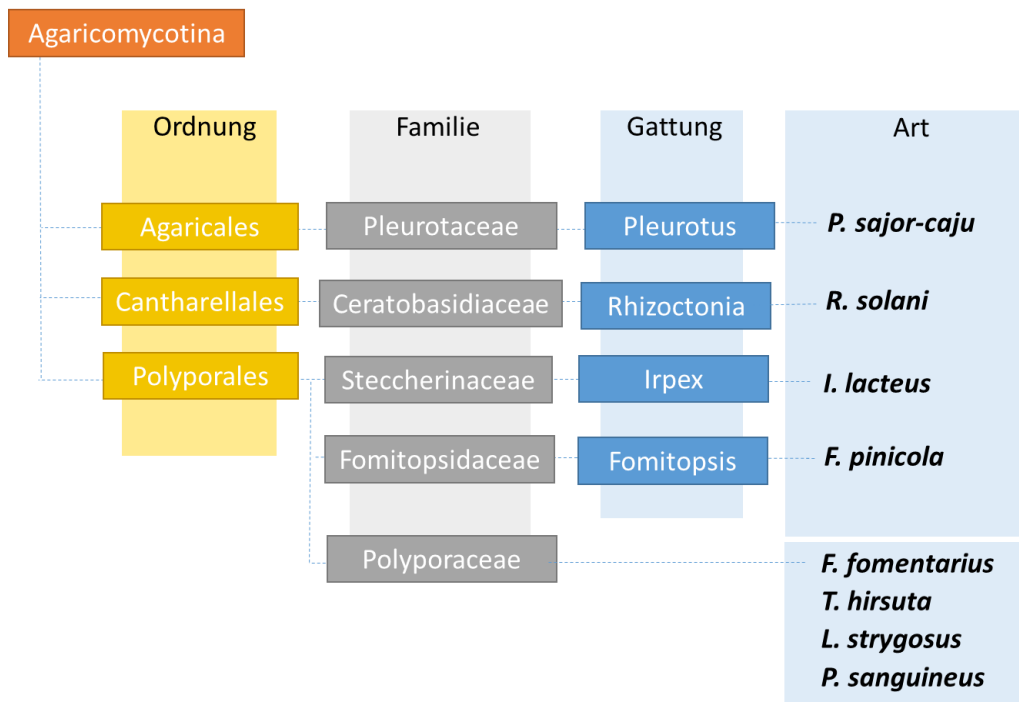


Abbildung 2.1 Übersicht der Systematik der Basidiomycota, welche waschaktive α -Amylasen sekretieren.

Der Zeitpunkt der höchsten Aktivität schwankt bei den Basidiomycota zwischen 48 h (*R. solani*) und 158 h (*F. fomentarius*) (Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2 Auflistung der acht Basidiomycota mit der besten Waschleistung und deren Zeitpunkt maximaler Aktivität während der Kultivierung.

Interne Stammnummer	Basidiomycota	Zeit der höchsten Aktivität
17	<i>Fomitopsis pinicola</i>	96 h
71	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	86 – 102 h
248	<i>Fomes fomentarius</i>	134 – 158 h
275	<i>Irpex lacteus</i>	72 h
284	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	134 h
300	<i>Lentinus strygosus</i>	86 – 102 h
308	<i>Trametes hirsuta</i>	72 h
309	<i>Rhizoctonia solani</i>	48 h

Für die weitere Analyse und der Identifizierung der waschaktiven Enzyme wurde der Kulturüberstand mittels FPLC gereinigt. Dazu wurden zunächst die isoelektrischen Punkte der stärkeabbauenden Enzyme bestimmt. Darauf aufbauend folgte eine chromatographische Trennung mittels Anionen-Austauscher (5.2.1.4). Alle Fraktionen wurden nach der Trennung mittels Aktivitätsassay (5.2.1.2) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass eine IEX-Auftrennung der Kulturüberstände ausreichte, um die waschaktiven Enzyme zu isolieren. Für die Basidiomycota *F. fomentarius*, *F. pinicola*, *I. lacteus*, *L. strygosus*, *R. solani* und *T. hirsuta* eluierte die Stärke abbauende Aktivität bei 10 % Natriumchlorid. Bei *P. sanguineus* eluierte diese bei 20 % Natriumchlorid (Abbildung 2.2).

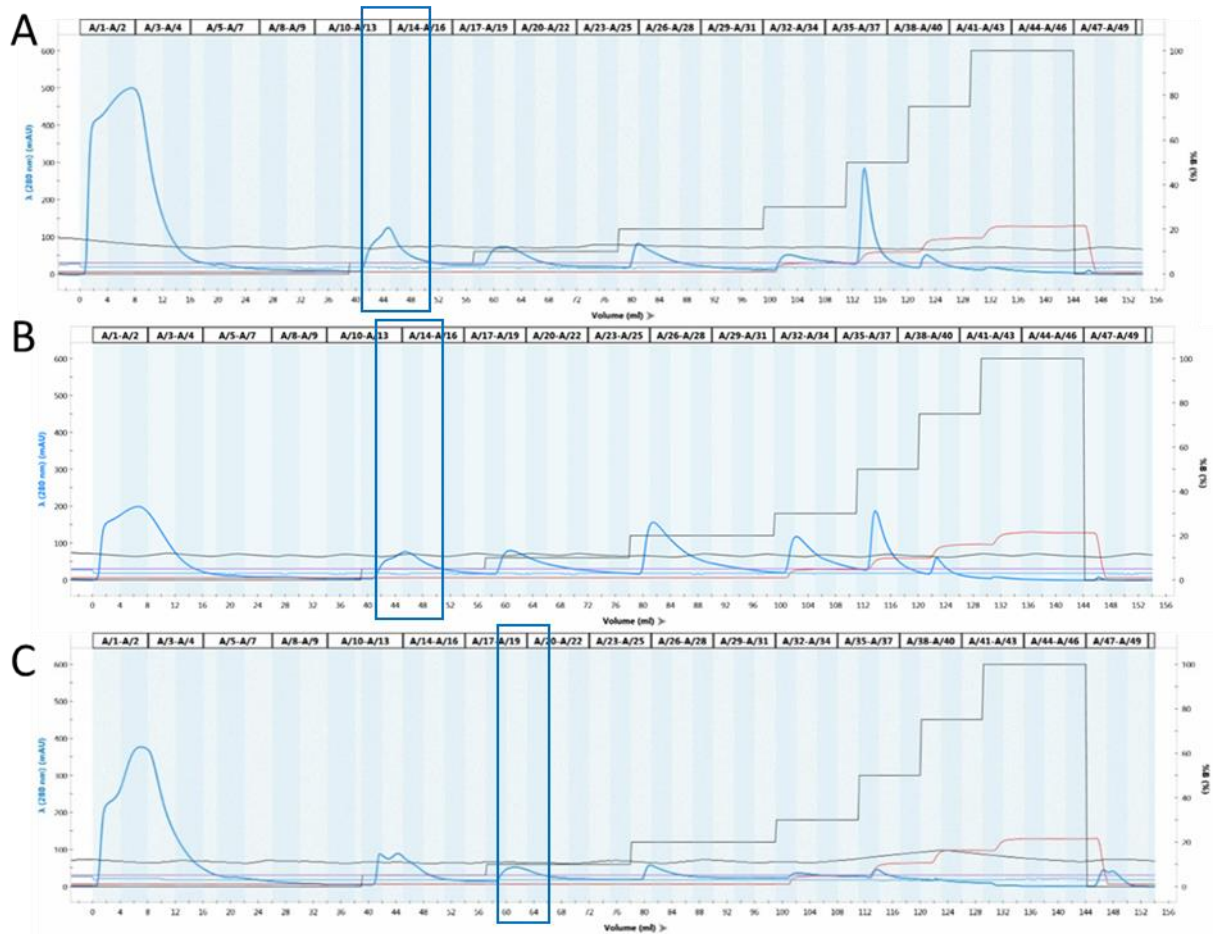


Abbildung 2.2 FPLC-Chromatogramme für die IEX Reinigung der Kulturüberstände von Ffo (A), Thi (B) und Psan (C). Die schwarze Linie zeigt den Stufengradienten der erhöhten NaCl Zugabe. In rot ist die Leitfähigkeit dargestellt. Die Messung der Proteinmenge ist mit der blauen Linie dargestellt. Die blauen Rechtecke zeigen die Fraktion mit α -Amylase-Aktivität sowie Waschaktivität an. Als Puffer A wurde 20 mM Bis-Tris, pH 7 verwendet. Für den Elutionspuffer B wurde 1 M NaCl zum Puffer A hinzugegeben.

Wie in den Chromatogrammen (Abbildung 2.2) sichtbar, führte eine stufenweise Erhöhung der NaCl Zugabe zu einer Basislinien getrennten Fraktionierung der in den Proben enthaltenen Proteine. Die ersten vier Fraktionen zeigen den ungebundenen Durchfluss an.

Die Fraktionen der jeweiligen teilgereinigten Kulturüberstände mit detektierter Amylase- und Waschaktivität (Abbildung 2.2) wurden zusammengelegt und aufkonzentriert (5.2.1.4). Die Retentate der jeweiligen Proben wurden anschließend mittels SDS-Page (Abbildung 2.4) und Zymografie (Abbildung 2.3) analysiert.

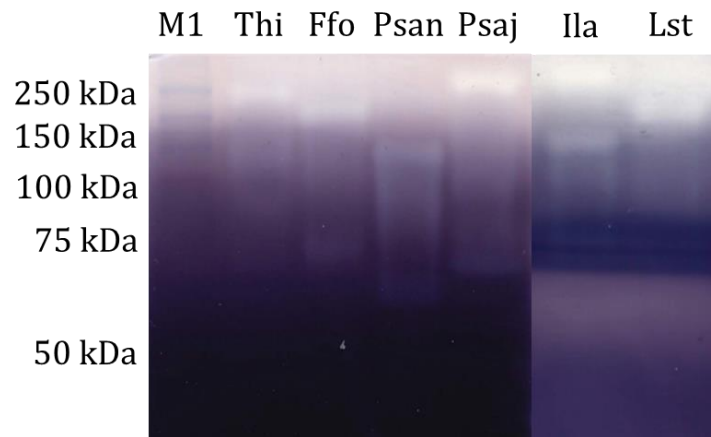


Abbildung 2.3 Semi-native PAGE mit den teilgereinigten Kulturüberständen von Thi (26 µg), Ffo (31 µg), Psan (40 µg), Psaj (40 µg), Ila (41 µg) und Lst (26 µg). In das Trenngel wurde 1 % (w/v) Stärke einpolymerisiert. Die Auftrennung erfolgte bei 4 °C und 10 mA für 3 h 20 min. Nach einer Inkubation von 4 h bei RT wurde das Gel mit Lugol'scher Lösung gefärbt.

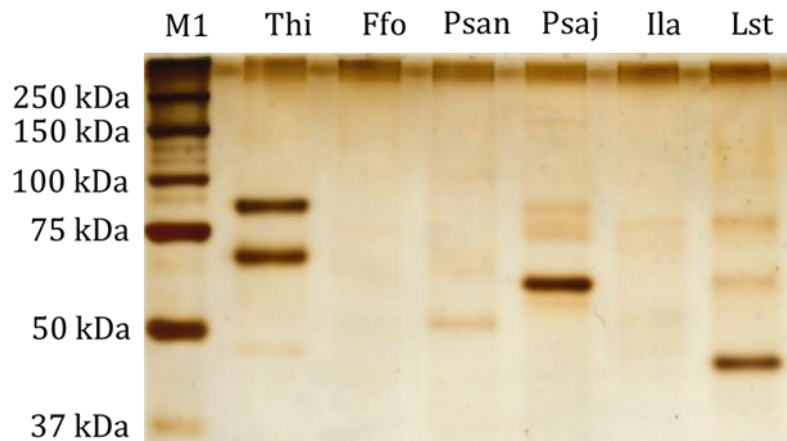


Abbildung 2.4 SDS-PAGE der teilgereinigten Kulturüberstände von Thi (26 µg), Ffo (31 µg), Psan (40 µg), Psaj (40 µg), Ila (41 µg) and Lst (26 µg). Die Auftrennung erfolgte bei RT und 12 mA für 2 h. Das Gel wurde silber-gefärbt mit einer Entwicklungszeit von 60 min. Als Marker wurden 7 µL des Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Biorad, Hercules, Kalifornien) verwendet (M1).

Die Zymografie (Abbildung 2.3) zeigte nach der Färbung der einpolymerisierten Stärke mit Lugol'scher Lösung Aktivität in allen Proben. Da ein denaturierender Proteinmarker verwendet wurde, dient dieser nur der Beschreibung der Proteine und lässt keinen Rückschluss über deren tatsächliche molare Masse zu. Eine Aufhellung zeigte sich bei allen Proben über der 100 kDa Markerbande. Des Weiteren zeigten sich nicht gefärbte Bereiche im niedermolekularen Bereich. Aufgrund der einpolymerisierten Stärke konnte das Gel nicht für eine weitere massenspektrometrische Analyse verwendet werden.

In der SDS-PAGE (Abbildung 2.4) waren für alle teilgereinigten Kulturüberstände von Thi, Ffo, Psan, Psaj, Ila und Lst mehrere Proteinbanden zuerkennen. Die meisten Banden fanden sich dabei im Bereich von 50 bis 100 kDa. Da das Silber gefärbte Gel nicht für die Analyse

mittels Massenspektrometrie geeignet war, wurde ein weitere Elektrophorese parallel und mit gleichen Bedingungen durchgeführt. Das zweite Gel wurde mit Coomassie gefärbt und der Bereich zwischen 50 und 100 kDa wurde für die MS verwendet. Zusätzlich wurden alle sichtbaren Proteinbanden oberhalb von 100 kDa für die MS-Analyse ausgeschnitten.

Für die Verifizierung der Enzymaktivität wurden die Hydrolyseprodukte nach einer Inkubation von Stärke mit den jeweiligen Kulturüberständen bestimmt. Dabei wiesen alle teilgereinigten Kulturüberstände die gleichen Hydrolyseprodukte wie die Benchmark α -Amylase auf (Abbildung 2.5). Es zeigte sich dabei, dass von den jeweiligen teilgereinigten Kulturüberständen als auch von der Benchmark α -Amylase sowohl Glucose (Retentionszeit 27 min), Maltose (Retentionszeit 22,5 min) als auch Oligosaccharide gebildet wurden. Eine Auftrennung war hierbei bis zum achtfach-Zucker möglich.

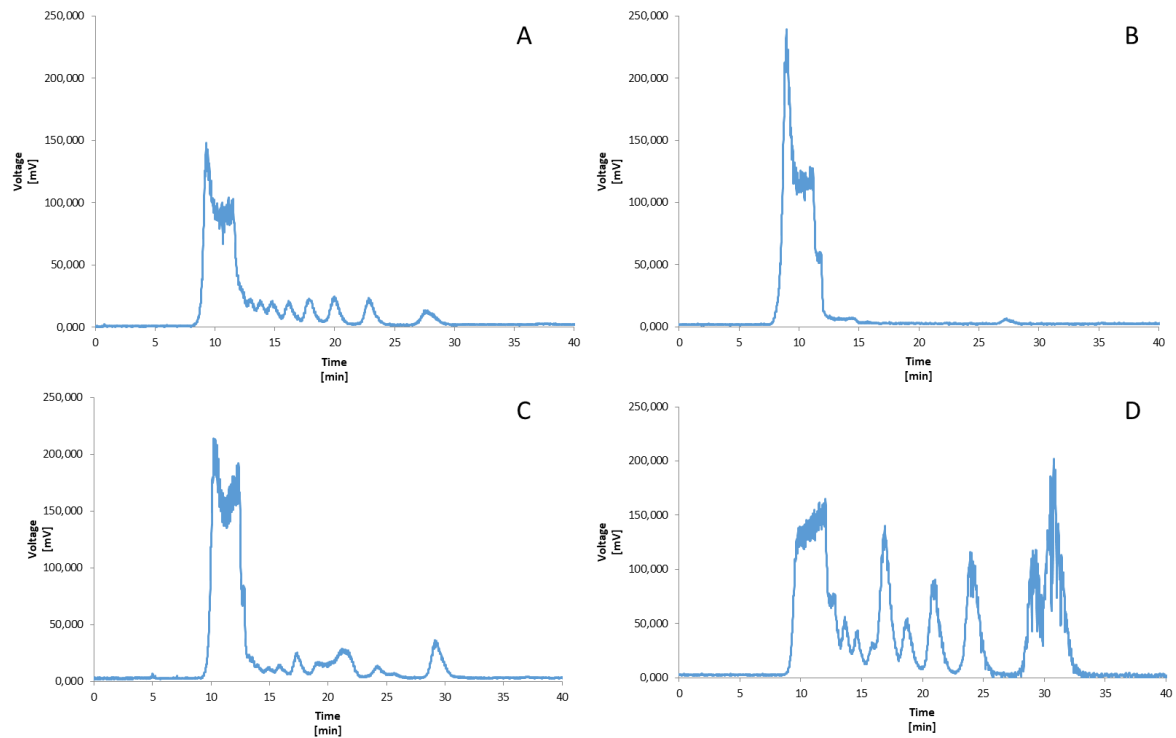


Abbildung 2.5 HPLC-Chromatogramme nach der Hydrolyse von Stärke. Dextrin wurde als Standard verwendet (A), Stärke als Kontrolle (B), 30 min Inkubation von Stärke mit teilgereinigtem Kulturüberstand von *R. solani* (C) und eine Positivkontrolle mit einer 30 minütigen Inkubation mit Benchmark α -Amylase (D). HPLC-System bestehend aus einem binären Pumpensystem (Agilent 1200, Agilent Technologies, Waldbronn), einem Triathlon-Autosampler (Spark Holland, Emmen, Niederlande), einem Säulenofen, sowie einem Corona CAD-Detektor (ESA Biosciences) und einem LaChrom L-7490 RI-Detektor (Merck). Es wurde die Merck Polyspher Na 300x7.8 Säule verwendet. Die Chromatographie erfolgte mit Wasser als Eluenten bei einem Fluss von $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ und bei $85 \text{ }^\circ\text{C}$. Injiziert wurde jeweils ein Volumen von $20 \text{ }\mu\text{L}$.

Zusätzlich wurde ein weiterer Waschleistungstest mit isoaktiv eingesetzten teilgereinigten Proben durchgeführt. Für die Waschleistungsvergleiche wurden die teilgereinigten Kulturüberstände erneut aufkonzentriert. Die Detergenzlösung wurde in 20 mM Bis-Tris (pH 7) verdünnt. Die Endkonzentration des Waschmittels nach Zugabe der Enzymlösung betrug $4,58 \text{ g L}^{-1}$. Der Waschversuch wurde jeweils mit 100 mU iso-aktiv durchgeführt. Für die Kontrolle wurden Wasser anstelle von Enzymlösung verwendet. Diese Waschttests dienten als Grundlage für spätere Patentanmeldungen (Abbildung 2.6 und Abbildung 2.7).

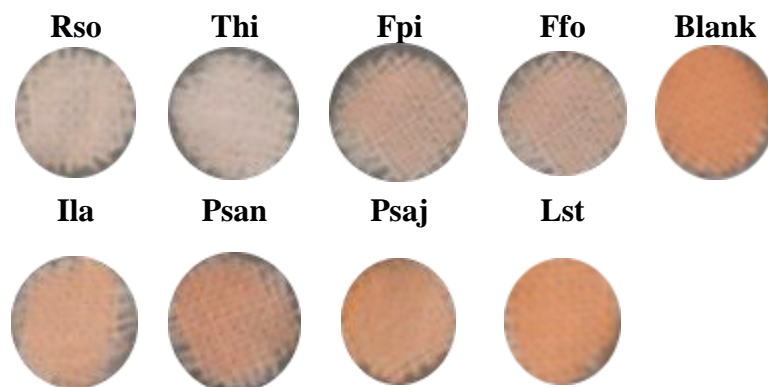


Abbildung 2.6 Applikationsstudie mit den teilgereinigten Kulturüberständen von Rso, Thi, Fpi, Ffo, Ila, Psan, Psaj und Lst. Eingesetzt wurden jeweils 100 mU. Die Inkubation erfolgte bei $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ und 350 UpM für 1 h bei pH 7.

Da die visuelle Beurteilung der gewaschenen Stoffe nicht ausreichend war, wurden diese zusätzlich mit einem Farbmessgerät vermessen (ColorLite sph900, ColorLite GmbH, Katlenburg-Lindau). Das Gerät wurde gegen weißes Papier kalibriert. Die Verbesserung der Waschleistung wurde in Bezug zur Kontrolle ohne Enzymzugabe gezeigt (Abbildung 2.7).

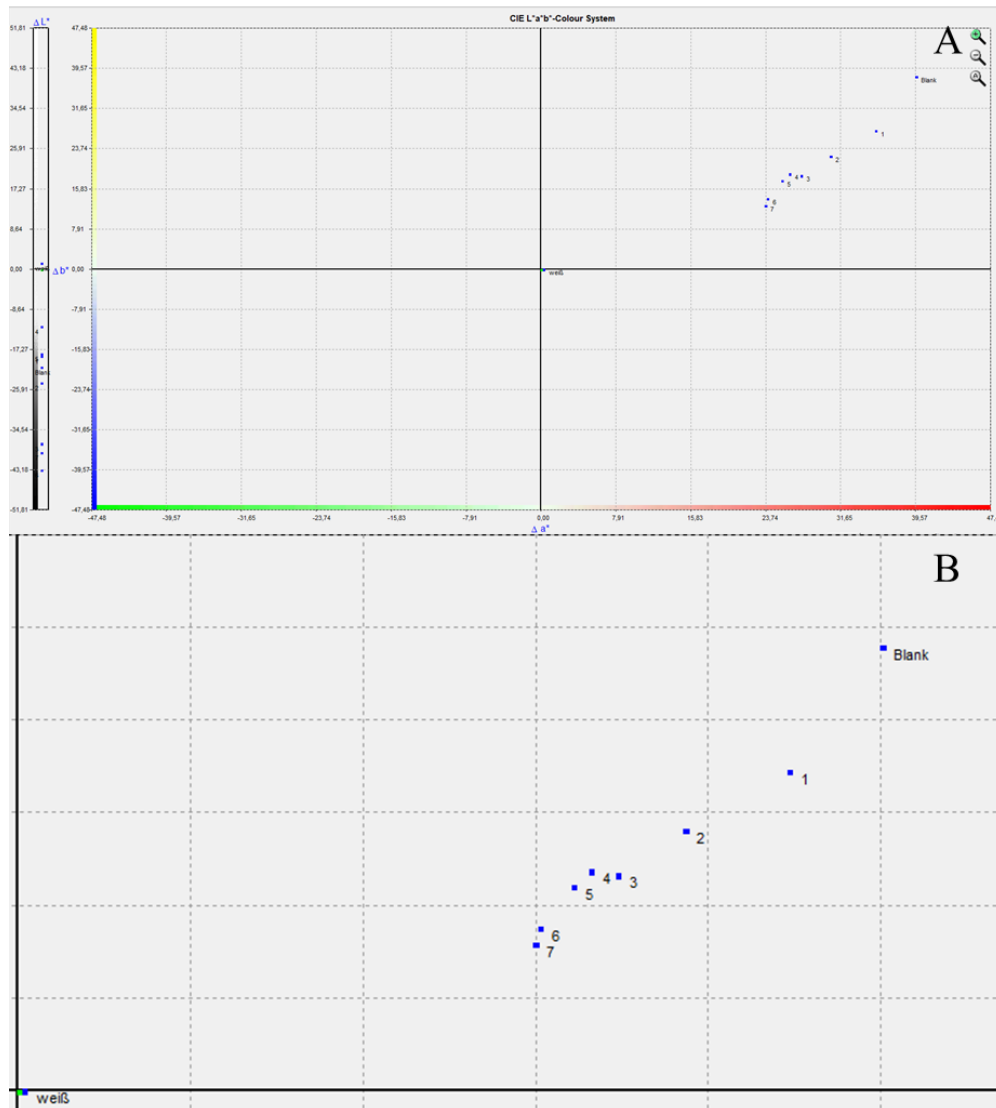


Abbildung 2.7 Ergebnisse der Farbmessung der mit teilgereinigtem Kulturüberstand (jeweils 100 mU) von Rso (7), Thi (6), Fpi (5), Ffo (4), Ila (3), Psan (2) und Psaj (1) gewaschenen Läppchen. Es wurde gegen weißes Papier kalibriert, die Kontrolle (Blank) ist ohne die Zugabe von Enzym geschwaschener Stoff (A). Die Probe von Lst wurde nicht berücksichtigt, da die Mittelwertabweichungen zu hoch waren. Vergrößerter Ausschnitt der Farbmessungsergebnisse (B).

Beim Waschleistungstest zeigten Rso und Thi die beste Aufhellung der Läppchen. Die Kulturüberstände von Fpi, Ffo und Ila zeigten in etwa die gleiche Aufhellung. Die Messungen der Stoffe, welche mit Kulturüberstand von Psan und Psaj inkubiert wurden, zeigten eine schwächere Aufhellung (Abbildung 2.7). Der Kulturüberstand von Lst wies die im Vergleich geringste Verbesserung des Waschergebnisses auf (Abbildung 2.6). Die Farbmessung ergab zu große Schwankungen, sodass die Ergebnisse von Lst in der Abbildung 2.7 nicht berücksichtigt wurden.

2.2 Molekularbiologische Identifizierung der waschaktiven Enzyme

Die SDS-Gele (Abbildung 2.4) waren die Grundlage sowohl für die Überprüfung der Reinigung als auch für die Identifizierung der waschaktiven Enzyme. Die einzelnen Proben der teilgereinigten Kulturüberstände wurden elektrophoretisch separiert, mit Coomassie gefärbt und die Proteinbanden zwischen 50 kDa und 250 kDa ausgeschnitten. Es folgte ein tryptischer Verdau und eine anschließende Analyse mittels LC-MS/MS-Analyse. Die *de novo* sequenzierten Peptide wurden bioinformatisch mittels MASCOT-Software mit Proteindatenbanken abgeglichen (Tabelle 2.4). Es wurden nur Peptide mit einem Score von mindestens 50 berücksichtigt. Da mit der MASCOT-Software nur die Proteindatenbanken von NCBI und Swiss-Prot verbunden waren, wurden zusätzlich eigene Datenbanken erstellt. Dazu wurden alle verfügbaren Daten für *Fpi*, *Ila*, *Psa* und *Rso* von der JGI Plattform im Fasta-Format übernommen und als Datenbank hinterlegt. Da die Genomdaten von *Psaj*, *Lst* und *Thi* zu diesem Zeitpunkt nicht vorlagen, wurden Sequenzen nah verwandter Arten in die eigene Datenbank übernommen. Dazu wurden die Proteomdaten von drei *Lentinus* sp., drei *Pleurotus* sp. und neun *Trametes* sp. in die Datenbank übernommen (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3 Genome für die Erstellung der Datenbanken.

Basidiomycota	Genome
<i>L. strygosus</i>	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-6 v1.0
	<i>Lentinus tigrinus</i> ALCF2SS1-7 v1.0
	<i>Lentinus tigrinus</i> v1.0
<i>P. sajor-caju</i>	<i>Pleurotus eryngii</i> ATCC 90797 v1.0
	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15 v2.0
	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC9 v1.0
<i>T. hirsuta</i>	<i>Trametes betulina</i> CIRM-BRFM 1801 v1.0
	<i>Trametes cingulata</i> BRFM 1805 v1.0
	<i>Trametes gibbosa</i> CIRM-BRFM 1770 v1.0
	<i>Trametes ljubarskyi</i> CIRM1659 v1.0
	<i>Trametes maxima</i> CIRM-BRFM 1813 v1.0
	<i>Trametes meyenii</i> CIRM-BRFM 1810 v1.0
	<i>Trametes polyzona</i> CIRM-BRFM 1798 v1.0
	<i>Trametes pubescens</i> FBCC735
<i>Trametes versicolor</i> v1.0	

Es konnten für die Basidiomycota *F. fomentarius*, *F. pinicola*, *I. lacteus*, *R. solani* und *T. hirsuta* Peptide für α -Amylasen identifiziert werden (Tabelle 2.4).

Tabelle 2.4 Übersicht der *de novo* sequenzierten Peptide für pilzliche α -Amylasen.

Basidiomycota	Peptide
Ffo	HIATGDIANIL
Fpi	FATSDGSSPACDTGD
Ila	ANVFVTNHDTE
Lst	Keine Peptidtreffer
Psaj	Keine Peptidtreffer
Psan	Keine Peptidtreffer
Rso	VFVSNHDTERG
Thi	LAQYGNDLLSLGADGLRLDASKHIPVGDIANILSR KETDGSVWVESDPNR

2.2.1 *Fomes fomentarius*

Da für *Fomes fomentarius* zum Zeitpunkt der Arbeit kein öffentliches Genom vorlag, wurde ein noch nicht annotiertes der Arbeitsgruppe von Dr. Harald Kellner (TU Dresden) verwendet. Auf dessen Grundlage wurde die Datenbank für diesen Stamm erstellt und die mittels MS/MS erhaltenen Peptide gegen diese abgeglichen. Da keine Annotierung vorhanden war, wurden alle von der MASCOT-Software erhaltenen Proteinsequenzen mittels Blastp gegen die NCBI-Datenbank abgeglichen. Es wurde erfolgreich eine α -Amylase identifiziert und das korrespondierende Gen mittels tblastn im Genom von *F. fomentarius* identifiziert.

Nachdem das Gen identifiziert und der Genomabschnitt in SnapGene konvertiert wurde, erfolgte die Erstellung der Primer. Das Gen wurde ausgehend von Peptidtreffer zunächst teilweise von genomischer DNA amplifiziert, bis es schließlich vollständig amplifiziert wurde.

Die waschaktive α -Amylase des Basidiomyceten *Fomes fomentarius* wurde erfolgreich von cDNA amplifiziert und mittels Sequenzierung verifiziert (FfoAmy). Die verwendeten Primer waren zum einen der Vorwärtsprimer 5' ATGTCTCCTTGGTCCAAGCTTGTTG GGCTC 3' und zum anderen der Rückwärtsprimer 5' TTATCTCCAGGAAGAGGAAAGA

TTCTGAGT 3'. Das Gen setzte sich aus 1770 codierenden Basen zusammen, welche im Genom durch zwölf Introns unterbrochen waren. Der Vergleich zum Referenzgenom (JGI) zeigte eine Sequenzidentität von 99 %. Das resultierende Protein wies 589 Aminosäuren auf, welche einer berechneten molaren Masse von 62 kDa entsprachen. Das Enzym trug die Cellulose-Bindedomäne CBM20 am C- Terminus.

>Ffo α -Amylase CDS

ATGTCTCCTTGGTCCAAGCTTGTGGGCTCACGAGCCTCGGCGCCCTGTTCTCAGCCGCTGGCGCTGCGCC
GTTCCCTCCGTTTCGACTGACGGTCACTCGTTGGCTGCCCGCGCTCCCTCCACAAACAAAACGGTCATCGTCC
AGATATTCGAGTGGTCATGGGACAGCGTCGCCACCGAGTGCACCAACTTCATCGGGCTGCCGGGTATGGG
TTTGTTC AAGT GAGCCCTCCGGCGGAGCACATCCAGGGCAGTCAATGGTGGACGGACTACCAGCCGGTCTC
ATACACGCTCACCTCCAAGCGTGGCAATCGCGACCAATTTGCGAACATGATCAATACCTGCCATGCCGCCG
GTGTTGGTGTTCATCGTTGACACTATTTGGAACCACATGGCCGGCGTCAATCTGGCACGGGCGTTGCTGGG
TCCTCCTTTACGACTACAAC TACCAGGCATCTATCAAACCCAGGATTTCCATCACTGCGGCCTTACCAG
CGGTGACGACATCGTCGACTACTCTAGCCGAGCTCAAGTCCAAACGTGTGAGCTTGTCAACCTTGCCGACC
TCGCAACTGATACCGAGTACGTTCCGAGCCGCTTGCTGCGTACGAAACGACCTCTTGTTCGCTGGGCGCC
GATGGCTTCCGTTCCGACCGCGAAACATATCGTACTGGTGACATTGCCAACATCTTGTTCGAGGTTGAA
CTCTACCCCATATATCTCGCAAGAGGTCATTTATGGCGCTGGCGAGCCGGTCACTCCTAGCGAATACACCG
GCAATGGTGATGTCCAGGAATTCGGGTACACCTCGGCTATAAAGGATGCTTTCCTAAACGGCGATATCTCC
AGCCTTCAAAGTTTTGACAATCGCGGTTGGGTGGCAGGCTCAGGCGCGAATGTGTTTCGTCGTA AACCATGA
CACGAAAGGAACGGCGATTTCGCTCAATAACAATTTCTCCCTCCAACACCTATGTCAC TGTACGATCTTCT
CGCTTGCGCATCCATATGGTACACCGACGATCCTGTCCAGCTACAGTGGCTTCACCAATACCGATGCTGGT
GCACCAATGGTGGGGCTGGGACGTGCTCAGGCAGCGGTGGATCGAACGGATGGCTGTGTTCAGCACCGTTG
GACCGCGTTTGCCGGCATGGTTGGCTTCAGGAACAACGTCCGCAACGCGGCGCTTACCAACTGGCAGTCAC
CTCAAGGTCGACAGATCGCCTTTGGTTCGCGGCGCATTTGGGCTTTGTTCGCTATCAATAACGACGACTCTGCT
TGGTCGACGACGTTTCAGACTCAGCTTCCCGACGGCTCATACTGCGATGTTGTTCAGTGGCGCGTCTTCTGG
AGGCAACTGCTCCGGTACATCCATCACCGTCTCTGGCGGTTTCGTTACAGCGGACGGTGCCTGCGAGAAGCG
CCGTCGCGATCCACACCGGCGCGAAGGGCAGTAGCAACAACGGCGGTGGCGGCGGAGaCAACGTCAC TGTGA
AACTTCTCTGTAACCGCCACAACCACATTCGGCGGAGAACATCTTCTTCGTCGGAAGCATTTTCACAGCTCGG
AAGCTGGAACGCCCGGAACGCCATCGCATTTGCTTCTGCTTCGTACCCGACGTTGGACCGTGTTCGGTCAGCA
TTCCC GCAAGCACTACCTTTGAGTACAAAATTCATCAGGAAAGAGACTGATGGAAGCATCGTGTGGGAGTCC
GATCCCAACCGTCTGCCACAACCCCTCTGCGGGTACTCAGAATCTTTCCTCTTCTGGAGATAA

>Ffo α -Amylase Proteinsequenz

MSPWSKLVGLTSLGALEFSAAGAAPFLRSTDGHS LAARAPSTNKTIVIVQIFEWSDSVATECTNF IG P A G Y G
FVQVSPPAEHIQGSQWWTDYQPVS Y T L T S K R G N R D Q F A N M I N T C H A A G V G V I V D T I W N H M A G V E S G T G V A G
S S F T H Y N P G I Y Q T Q D F H H C G L T S G D D I V D Y S S R A Q V Q T C E L V N L A D L A T D T E Y V R S R L A A Y G N D L L S L G A
D G F R L D A A K H **L A T G D I A N I L** S R L N S T P Y I S Q E V I Y G A G E P V T P S E Y T G N G D V Q E F R Y T S A I K D A F L N G D I S
S L Q S F D N R G W V A G S G A N V F V N H D T E R N G D S L N N N S P S N T Y V T A T I F S L A H P Y G T P T I L S S Y S G F T N T D A G
A P N G G A G T C S G S G S N G W L C Q H R W T A F A G M V G F R N N V G N A A L T N W Q S P Q G R Q I A F G R G A L G F V A I N N D D S A
W S T T F T T Q L P D G S Y C D V V S G A S S G G N C S G T S I T V S G G S F S A T V P A R S A V A I H T G A K G S S N N G G G G D N V T V
N F S V T A T T T F G E N I F L V G S I S Q L G S W N A A N A I A L S S A S Y P T W T V S V S I P A S T T F E Y K F I R K E T D G S I V W E S
D P N R S A T T P S A G T Q N L S S S W R *

2.2.2 *Fomitopsis pinicola*

Genom- und Proteomdaten für *F. pinicola* waren sowohl bei NCBI als auch bei JGI verfügbar. Die Auswertung der MASCOT-Ergebnisse zeigte eine α -Amylase in der

teilgereinigten Probe, welche bis *dato* als hypothetisches Protein verzeichnet war (Abbildung 2.8). Ein Blastp dieser Sequenz bestätigte, dass es sich bei diesem um eine α -Amylase handelte. Das mittels MS/MS identifizierte Peptid deckte die korrespondierende Aminosäuresequenz zu zwei Prozent ab.

Protein sequence coverage: 2%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MWGSLLAASA LAASALAATT AEWQQRSIYQ LVTDRFATSD GSSPACDTGD
51 RVYCGGSWQG VINKLDYIQY MGFDAVWISP VVKNLEGSTG DGYSYHGYWA
101 VDQNSVNEHF GTADDLNALS SALHARGMYL MVDVVVNHMA ANTLPPDYST
151 FTPFSAESDF HTFCWITDYN NQTNVEQCWL GDSSVPLADC DTEANNVDF
201 FYNWIGELRA NYTVDGFRID TLKHVRQTFW PDFQTNAGVY AVGEVFDGDV
251 NYVSPYTEVI DGVLDYPTY YQLTSAFESTS GSIQNLVDVI QSAQSTYSTK
301 LFQVATFLEN QDNPRFQSIT TDQGLVKNAM TWPFIADGIP ILYYQGQGY
351 TGGNDPDNRE ALWLSGYEEN KPLVQHARIL NAARKAAIAA SSSFLSTAVT
401 FPLVGSNTLA ASKYPLLSLL SNVGASGTPA WDVSSGTGYD EGTTELIDALT
451 CTTYTAESSG SVSVTGSSGD FVILLPTSAY NASYCELTG TNSGTSSDTV
501 SVTFEVEYNT TYGENLYLTG SVAEVLDWSV DDALLMSSAD YPTWSLTVDL
551 PPSTAIQYKY LTKYNGDVTW EDDPNNELTT PASGSVIQSD SWH

```

Abbildung 2.8 Hypothetisches Protein (KE504255.1) mit dem rot markierten, identifizierten Peptid.

Nach der Blastp Suche mit der Blosum62 Matrix wurde zum identifizierten Peptid das korrespondierende Protein mit der ID 1038982 (JGI) gefunden. Das korrespondierende Gen auf dem *scaffold_134:33521-35901* wurde analysiert und in SnapGene konvertiert.

Die waschaktive α -Amylase aus *F. pinicola* (FpiAmy) wurde mittels des Primerpaares ATGTGGGGCAGCCTTCTCGCAGCCTCTGC und TCAATGCCAGCTGTCGCTCTGC GTGACG erfolgreich amplifiziert und durch eine Sangersequenzierung verifiziert. Das Gen setzte sich aus 1782 codierenden Basen zusammen, welche in einem Protein mit 593 Aminosäuren und einer molaren Masse von 64,4 kDa resultierten. Die Gensequenz wies elf Introns auf und zeigte zum Referenzgenom eine Identität von 96,3 %. FpiAmy zeigte eine Cellulose-Bindedomäne am C-Terminus.

>Fpi α -Amylase CDS

```

ATGTGGGGCAGCCTTCTCGCAGCCTCTGCCCTCGTGGCTTCCGCGCTTCTGCTGCGACTACGGCGGAATGGCA
GCAACGCTCGATCTACCAGCTCGTCACGGATAGATTTCGCGACCTCGGACGGCTCGTCCGCCGCTTGGCACA
CCGGCGATCGCGTGTATTGTGGCGGGTCTGGCAGGGGGTTCATCAATAAGCTGGATTACATCCAGTACATG
GGCTTCGACGCCATCTGGATTTTACCAGTCGTGAAGAACC TAGAAGGCAGCACGGGAGATGGCTACTCGTA
CCATGGATACTGGGCGGTTCGACCAGAACTCGGTCAACGAGCACTTCCGGCACTGCAGACGATCTGAATGCC
TTAGCAGCGCTTGCACGCGCGGGATGTACCTGATGGTCGACGTCGTCTGTAACCACATGGCGGCCAAC
ACGCTCCCGCCGGACTACTCGACCTTACGCCGTTTACGCTCCGAGTCGGACTTCCACACCTTCTGCTGGAT
CACGGACTACGACAACCAGACGAACGTCGAGCAGTGTGGCTCGGCGACTCGAGCGTCCGCTCGCGGACT
GCGACACCGAGGCTGACAACGTCATCGACTTCTTCTACAACCTGGATCGGCGAGCTCCGCGCGAACTACACT
GTGGATGGTTTTAGGATCGACACGCTGAAGCATGTCAGGCAGACGTTCTGGCCAGATTTCCAGACCAACGC
GGGCGTGTACGCCGTCGGTGGAGTCTTTGACGGCGACGTCGAACATATGTTTCGCCCTACACTGAGGTTATCG
ACGGAGTGTGGACTACCCGACGTAATATCAGCTCACCTCCGCTTCGAGTCCACCAGCGGCTCAATTCAG
AACCTCGTCGACGTCGATTCAGTCTGCGCAGTCCACTTACTCCACGATGCTCTTCCAAGTCGCGACGTTCT

```

```

CGAGAACCAGGACAACCCGCGGTTCAGAGTCTTACCACTGATCAAGGCCTAGTGAAGAACGCGATGGCGT
GGCCGTTTATCGCGGATGGCATCCCCATTTCTTACTACGGTCAGGAGCAAGGCTACACTGGCGGCAACGAC
CCCATAACCGTGAAGCGCTGTGGCTGTCCGGATACGAGGAAAACAAGCCTCTCGTGCAGCACGCCCCGCAT
CCTCAACGCTGCCCCGAAGGCCGCATCGCCGCCAGCAGCAGCTTCCCTCTCCACCGCCGTGACCTTCCCGT
CGGTGGGCAGCAACACGCTCGCCGCGTCCAAATACCCGCTGCTCTCGCTCCTGACCAACGTAGGCGCAAGC
GGCATGCCCCGTTTGGGACGTCTCCTCGGGAACGGGATACGACGAGGGCACGGAGCTGATTGATGCGCTCAC
GTGCACGACGTACACCGCTGGGAGCAGCGGCAGCGTGAGCGTCACGGGCAGTAGCGGGGACCCCCGCATCC
TGCTCCCCGACGAGCGCATACAACGCGTCGTACTIONGACGAGCTGACGGGCACGGACTCGACCGGCAGCTCG
GACACGGTGTCCGTGACGTTTCGAGGTGGAGTACAACACGACGTACGGCGAGAATTTGTATCTCACCGGCTC
CGTCTCTGAGCTCGTGGACTGGTCCGTCGATGACGCACTCCTTATGTCGTCGCCGACTACCCGACCTGGA
GCCTGACGGTGGACCTCCCCCGAGCACGGCGATCCAGTACAAGTATCTGACGAAGTACAATGGCGACGTC
ACGTGGGAGGACGACCCCAACAACGAGCTCACGACGCTGCGAGCGGCTCCGTCACGCAGAGCGACAGCTG
GCATTGA

```

>Fpi α -Amylase Proteinsequenz
MWGSLLAASALVASALAAATTAEWQQRS IYQLVTD**R**F**ATS**D**SGSS**P**ACDT**G**DR**VYCGGSWQGVINKLDYIQYM
GFDAIWI SPVVKNLEGSTGDGYSYHGYWAVDQNSVNEHFGTADDLNALSSALHARGMYLMVDVVVNHMAAN
TLPPDYSTFTFPSSSESDFHTEFCWITDYDNQTNVEQCWLGDSSVPLADCDEADNVIDFFYNWIGELRANYT
VDGFRIDTLKHVRQTFWPDFQTNAGVYAVGEVFDGDVNYVSPYTEVIDGVLDYPTYQYQLTSAFESTSGSIQ
NLVDVIQSAQSTYSTMLFQVATFLENQDNPRFQSLTDDQLVKNAMAWPFIADGIPILYYQEQGYTGGND
PDNREALWLSGYEENKPLVQHARILNAARKAAIAASSFLSTAVTFPSVGSNTLAASKYPLLSLLTNVGAS
GMPVWDVSSGTGYDEGTELIDALCTTYTAGSSGSVSVTGSSGDPVILLPTSAYNASYCSELTGTDSTGSS
DTVSVTFEVEYNTTYGENLYLTGSVSELVDWSVDDALLMSSADYPTWVSLTVDLPPSTAIQYKYLTKYNGDV
TWEDDPNNELTTPASGSVTQSDSWH*

2.2.3 *Irpex lacteus*

Im teilgereinigten Kulturüberstand von *I. lacteus* konnte ein Peptid einer α -Amylase identifiziert werden (Abbildung 2.9). Die dazugehörige Aminosäuresequenz entstammte einer α -Amylase aus *Pleurotus ostreatus*. Die Sequenz konnte zu zwei Prozent abgedeckt werden.

Protein sequence coverage: 2%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MRLTWYSPAL  FAVGTFVQCA  KSAPQSSLGT  LADRAPSGAK  LVIIQMFWEY
51  WDSVAAECTS  FIGPAGYGFV  QVSPPAEHIQ  GSQWWTDYQP  VSYTLNSKRG
101 NRSQFANMVS  TCHSAGVKVI  TDTIFNHMAG  VESGTGVGGS  SFTHYNYPGI
151 YQTQDFHHC  LEPGDDIVNY  SNRLEVQTC  LVNLADLATD  TEYVRGRLLA
201 YANDLRSLGV  DGFRLDAVKH  IASGDLANIL  SRVTGPFYVT  QEVIFGAGEA
251 VQPSEYVDIG  DVQEFRYTSE  LKNAFSGGGI  ANLQDLENRG  WVTGSKANVF
301 VTNHDTERNG  ASLNANSPSN  TYVTATIFSL  AHPYGTPTIL  SSSYGFTNTD
351 AGAPNGGVGT  CSGTGGANGW  FCQHRWVAFS  GMVGFRTVVG  SAGITNWVSP
401 QSQQIAFGRG  SAGFVAINNA  DSSWTATFAT  SLPAGAYCDV  ISGSANAGTC
451 SGLSITVAGG  SFSATVPARS  AIAIHTGATG  TGSGNGNGGS  DTVAVTFEET
501 ATTLGENIY  LVGSIPQLGV  WVPEAAILLS  AATYPVWRVT  VNIPAGTSFT
551 YKFIRKETDG  GVVWESDPNR  QLTVGASGTQ  TVSSSWK

```

Abbildung 2.9 Rot markiertes identifiziertes Peptid und die in der NCBI-Datenbank passende Sequenz einer α -Amylase aus *Pleurotus ostreatus* (KDQ30003.1).

Für diesen Basidiomycota war kein Genom vorhanden, jedoch ein Transkriptom. Da die Konvertierung in SnapGene in 129.000 Einzeldateien resultierte und damit Blast-Suchen nicht möglich waren, wurde das komplette Transkriptom in die lokale Blast Software geladen. Das identifizierte Peptid diente als Grundlage für einen tblastn. Dieser resultierte in

der Identifizierung der korrespondierenden CDS, welche in SnapGene konvertiert wurde. Auf Grundlage dessen wurden, ausgehend vom Peptidtreffer, Primer zu den jeweiligen Enden der Sequenz abgeleitet und das Gen partiell von genomischer DNA amplifiziert. Nach der vollständigen Amplifizierung des Gens mit allen Introns, erfolgte die Amplifizierung der CDS von cDNA.

Irpex lacteus wies eine aus 480 Aminosäuren bestehende waschaktive α -Amylase (IIaAmy) auf, welche sich aus 1443 codierenden Basen zusammensetzte. Auf genomischer Ebene war das Gen von fünf Introns unterbrochen. Erfolgreich amplifiziert wurde das Gen mittels der Primer 5' ATGGTCAAGTTGACACTCCCTTTTCG 3' und 5' TTATGAGAGCTTGGCG TTGGTATGAATGGC 3'. Diese α -Amylase zeigte keine Cellulose-Bindedomäne und hatte eine berechnete molare Masse von 51 kDa.

>IIa α -Amylase CDS

```

ATGGTCAAGTTGACACTCCCTTTTCGTTCTCGCCGCCGTCAGCTCTATGGCGGGCGGGCATTGTCATCCCCGA
GAACAGTGCTCTCGAAAACCGCTCTACTGGCCAGTCCAAGGCTGTCATCGTTCAGATGTTTGAGTGGACTT
GGGACAGTATCGCGTCCGAGTGCACCAACTTCCCTCGGGCCCCGGGTACGGTTATGTTTCAGACGAGTCCCT
CCTCAGGAGCACGTCACTGGCAACCAGTGGTGGACTGATTACCAGCCCCGCTCTCGTATACCCCTCACCTCGAA
GCGCGCAACCGATCACAGTTTGCTAACATGATCTCCACTTGCCACAAGGCGGGCGTCAAGGTTATCGCAG
ACACTATCTTCAACCATATGACTGGCTCCGACTCGGGCACTGGTGTGCTGGCTCGTTCGACACCCACTAC
AACTACCCTGGTATCTACCAAAAACAGGACTTCCATCACTGTGGGCTGGAGCCCAATGACGATATTGTCAA
TTATGACAATGCTGTGGAAGTCCAGACGTGCCAGTTGGAAGACTTGCAGATTTGGCTACCGATACAGAAT
ACGTCCCGCAGTAGGCTCGCGCAGTATGGTAACGATCTGCTTTCCCTGGGAGTGGACGGACTCAGGCTGGAT
GCTTCTAAGCACATTGCCGTGACTGACCTTACCAATATCACCTCTCGCCTGAATGGCTCTCCTTACCTCAC
TCAGGAGGTCATCTATGGTGAGGGTGAGCCTATCACCCCCAACCAATACGTCCGGCATTTGGTGATGTTCAAG
AGTTCGGTTACACAACCGCTCTCAAGAACGCTTTCCTTGAAACGGAGCTATCAACGGCCTACAAAGCTTCGAC
AACCTTGGCTGGGTGTCGGGTGACAAGGCTAACGCTTTCGTTACCAACCACGACACAGAGCGAAACGGTGC
TGCCCTCACCAACTCCTCACCTTCCAATACCTACGTTCTTGCCACCATATCTCCCTCGCCCACCCCTACG
GCACTGTCAACCGTCCCTCATCCTATTCCGGCTTCGACACCAACTCTGATGCAGGCGCACCCAACGGCGGC
ACCGTACTTGTCTTGGCACCGGCGGCTCCAACGGCTGGTTCGCCAGCATCGATGGATTGCTTTCCAGGG
TATGACTGCCTTCAGGAACACTGTCGGCAGTGTGCCATCGCCAACCTGGCAGACTGGTCAGAACTCGCAAA
TCGCCCTTCGACCGTGGTACCCTGGGTTCGTTGCTATCAACAACGCCGACTCGCAGTGGGATGCCACCTGG
AAGACTGGCTTGCCCGACGGTGTGTACTGCAACGTCATCTCCGGCGTCTTCTCGAGTGGTTCGTGCTCCGG
TGGCACTGTCACTGTCAAGAACGGTGGTCAAATCCCCTACAACCTGTCTTCTCGCAATGCTGTGCCATTC
ATACCAACGCCAAGCTCTCATAA

```

>IIa α -Amylase Proteinsequenz

```

MVKLTLFPVLAAVSSMAAGIVIPENSALETRSTGQSKAVIVQMFIEWTWDSIASECTNFLGPAGYGYVQTSF
PQEHVTGNQWWTDYQPVSYTLTSKRGNRSQFANMISTCHKAGVKVIADTIFNHMTGSDSGTVAGSSYTHY
NYPGIYQNQDFHHCGLEPNDDIVNYDNAVEVQTCQLEGLADLATDTEYVRSRLAQYGNDDLSSLGVDGLRLD
ASKHIAVTDLTNITSRLNGSPYLTQEVYIGEPEITPNQYVIGIDVQEFRYTTALKNAFLNGAINGLQSF
NLGWVSGDKANVFVTNHDTERNGAALTNSSPSNTYVLATIFSLAHPYGTVTVLSSYSGFDTNSDAGAPNGG
TGTCSGTGGSNWFCQHRWIAFQGMTAFRNTVGSAAIANWQTGQNSQIAFDRGTAGFVAINNADSQWDATW
KTGLPDGVYCNVISGVFSSGSCSGGTVTVKNGGQIPYNLSSRNAVAIHTNAKLS*

```

2.2.4 *Lentinus strygosus*

Die Analyse des teilgereinigten und waschaktiven Kulturüberstandes von *L. strygosus* zeigte eine α -Amylase-Aktivität. Es wurde nach der Analyse der Mascot-Datensätze kein Peptid für eine α -Amylase detektiert. Da für *L. strygosus* keine Genomdaten vorhanden waren, wurden Proteinsequenzen der vorhandenen Genome von *Lentinus* sp. (Tabelle 2.3) verwendet, um ein Sequenzalignment zu erstellen. Konservierte Bereiche wurden genutzt, um degenerierte Primer zu erstellen. Die durchgeführten PCRs führten nicht zu der Amplifizierung eines α -Amylasegens. Eine Analyse der Expressionsmuster für α -Amylase war somit nicht möglich.

2.2.5 *Pleurotus sajor-caju*

Der Kulturüberstand von *P. sajor-caju* zeigte eine α -Amylase-Aktivität. Es wurden nach der Auswertung der Mascot-Daten keine Peptide für α -Amylasen identifiziert. Da für diesen Basidiomycota keine Genomdaten vorhanden waren, wurde ein Sequenzalignment auf Aminosäureebene mit allen bekannte α -Amylasen aus *Pleuroten* erstellt (Tabelle 2.3), um konservierte Bereiche zu lokalisieren. Ausgehend von zwei konservierten Bereichen wurden mehrere degenerierte Primer abgeleitet, um korrespondierende α -Amylasegene von *P. sajor-caju* zu amplifizieren. Die verschiedensten PCR-Varianten führten nicht zu den erwarteten Ergebnissen, sodass keine α -Amylase im Genom von *P. sajor-caju* identifiziert wurde. Somit war eine Expressionsanalyse der α -Amylasegene nicht möglich.

2.2.6 *Pycnoporus sanguineus*

Für diesen Basidiomycota konnten keine Peptidtreffer für eine α -Amylase detektiert werden. Da das Genom vollständig vorlag, war es möglich, alle vier α -Amylasen zu identifizieren, erfolgreich von genomischer DNA zu amplifizieren und mittels Sangersequenzierung zu verifizieren. Ausgehend von isolierter RNA am Tag der höchsten Waschaktivität und der anschließenden cDNA-Synthese konnte eine waschaktive α -Amylase aus *Pycnoporus sanguineus* identifiziert werden (PsanAmy). Diese wurde mit dem Primerpaar 5'ATGCTACGCCTCACGCTCCTTGCTCT 3' und 5'TCAGACAATGATGAGGCTG GATTGCGCAGC 3' amplifiziert. Die drei übrigen α -Amylase-Gene wurden zu diesem Zeitpunkt nicht exprimiert. Das Enzym setzte sich aus 530 Aminosäuren zusammen, welche eine berechnete molare Masse von 57 kDa ergaben. Codiert wird das von sieben Introns unterbrochene Gen von 1593 Basen, welche verglichen mit dem Referenzgenom eine Identität von 97,2 % aufwiesen.

>Psan α -Amylase CDS

ATGCTACGCCTCACGCTCCTTGCCCTCTCTGCTTGCCGCGTCCGCCTTCGCGGCCCTCTCCGGATCAATGGCGG
 GAATCGGTCAATATACCAGTTGGTAACAGATCGATTTCGCCACCTCGGATGGGTCAAGTCCATGCGGATA
 CCTCCCAGCGCCAGTATTGTGGCGGTACTTGGCAAGGCATCGTCAAGAAGCTCGATTACATCCAGAACATG
 GGCTTCGATGCTATCTGGATCTCCCCTATTGTTCGCGAACTTGGAGGGAAATACGTCTTACGGTGAAGCCTA
 TCATGGGTACTGGACGCAGAACATTAACGCGCTTAATTACACTTCGGTAGCGCGGATGATCTCAAGGCGC
 TGAGCGATGCTCTGCATAAACGCGGCATGTACCTGATGGTTCGACGTCGTCGTGAACCACATGGCGGGCACC
 GCGGATCCTCCCAATTTCTCTGCGTTCAGCCATTTTCTTCTCAATCAAACATCACTCCGAGTGCTTCAT
 ATCGAACTACGACAACCAAACCGAGGTCGAGCAATGCTGGCTGGGAGACAAGAATGTTCCCTTGGTGGATT
 TGGATACTGAGGATACGAACATCGTTCAGCGCCATGAACACTTGGGTATCCACTTTGGCTAGCAACTTCAGC
 GTCGATGGCCTTCGGATCGACACTGTCAAACACGTGCGGAAGGATTTCTGGCCTGATTTCCGCAAGGCTTC
 GGGTGTCTTACGATAGGCGAGGTCCTTACATAACGAGACAGACTATGTGTCAGCATACTGAGGTGATTG
 ATAGCGTACTGGACTATCTACATGGTTCCCCTCGTGGCAGCTTTTCAAACCACGGGGGGCAATCTGTCA
 GCGCTCTCCGCCACTGTACAACAAGCCAGTCGGCTACAAGAACGGCGAATTCATGACCGGTTCTTTCCCT
 CGAGAACCACGACCAACCTCGGTTCCAGTCTCTTACCCAGGACGACGCTTTGATCAGGAATGCAATGACAT
 GGCCATTCGTTCAAGACGGAGTGCCATCATGTACTATGGTCAGGAACAGTCTTACGGTGGAGGGCCTGAC
 CCAGCCAATCGCGAAGCCTTATGGCTGTCCGGATACGTCGAAGACAAACCTCTCGTCAAACACGTGCAGGC
 AATGAACGGCGCAAGAAAGGCGGCCATATCAGCGAACAGCAACTACCTCACTACTGCGGTTAAGTTTTTGT
 CCAGCGGCTCCGAATCTACTCTTGGCGTCTCAAACCACCCATGCTCGCTCTTCTCACCAATGGCGGCAGT
 TCCTCCAATCCGTCATGGTCTGTTCGAAGTGCCGGCTTCAGCGGAATGAGGAACCTGTGATGTGTTGAC
 CTGCAGCAAGCTCAATGCGGATAGCAACGGAGGTGTGAGCGTGCAAGGGTCTGCTGGGAGTCCCTCAGGTCC
 TCATGCCGGTTTTCGTCTGTTGAGCAAGTCCGGGACGTGTGCTCGAGCCTCGCGACGGGCGGTCAGGCCTCG
 TCTGCGCGGATGGTTCGGAGGCGAGTGGAGTCTGCCACTCATCGCGGCTTCTTGTCTCGCCGGTTG
 GGCTGCGCAATCCAGCCTCATCATGTCT**TGA**

>Psan α -amylase Proteinsequenz

MLRLTLLASLLAASAFAASPDQWRNRSIYQLVTDRFATSDGSSPACDTSQRQYCGGTWQGIKKLDYIQNM
 GFDAIWISPIVANLEGNNTSYGEAYHGYWTQININALNSHFGSADDLKALS DALHHRGMYLMVDVVVNHMAGT
 ADPPNFSAFQPFSSQSNYHSECFISNYDNQTEVEQCWLGDKNVPLVDLDTEDTNIVSAMNTWVSTLASNFS
 VDGLRIDTVKHVRKDFWPDFAKASGVFTIGEVLHNETDYVSAYTEVIDSVLDYPTWFPLVAAFQTTGGNLS
 ALSATVQQAQSAYKNGEFMTGSFLENHDQPRFQSLTQDDALIRNAMTWPFVQDGVPIIMYYGQEQSYGGGPD
 PANREALWLSGYVEDKPLVKHVQAMNGARKAAISANSNYLTAVKFLSSGSESTLAVSKPMLALLTNGGS
 SSNPSWSVPSAGFSANEELVDVLTCSKLNADSNNGVSVQGSAGSPQVLMPVSSLSKSGNVCSSLATGGQAS
 SARGWFGGAVESLPLIAAFLLAGWAAQSSLIIV*

2.2.7 *Rhizoctonia solani*

In dem teilgereinigten Kulturüberstand von *R. solani* wurde ein Peptid für eine α -Amylase identifiziert (Tabelle 2.4). Die Proteinsequenz (KEP45305.1) stammte von dem sequenzierten *R. solani*-Isolat 123E. Da am Institut für Lebensmittelchemie der Stamm *R. solani* AG-3 vorhanden war und diese in den Genomdaten Unterschiede aufwies, wurden degenerierte Primer für die Amplifizierung des Zielgens von genomischer DNA erstellt. Nach der erfolgreichen Verifizierung des α -Amylasegens wurde die korrespondierende CDS von cDNA amplifiziert.

R. solani wies eine waschaktive α -Amylase auf, welche mit Hilfe der Primer 5' ATGTTTGAGTGGTCATGGGATAGTATTGCT 3' und 5' TCACCGCCAAGTATCG CTAAGCGTCAA 3' amplifiziert und nach einer Sangersequenzierung verifiziert wurde. Das Enzym setzte sich aus 536 Aminosäuren zusammen, welche zu einer berechneten molaren Masse von 56,4 kDa führte. Das Gen wurde von 16 Introns unterbrochen und zeigte

eine Sequenzidentität von 74,9 % zum Referenzgenom. Am C-Terminus wies die α -Amylase eine CBM20 Struktur auf.

>Rso α -Amylase CDS

ATGTTTGAGTGGTCATGGGATAGTATTGCTGCAGAATGCACCAGCTTCATCGGTCCCTGCTGGATATGGATA
TGTCCAGGTGTCTCCCCAGCCGAACACATCACCGGCTCGCAGTGGTGGACTGACTATCAGCCTGTTTCGT
ACATACTTACCTCGAAGCGAGGGAGCAGAAGCCAGTTCCAGAAATATGATTACCACGTGCAAGGCTGCCGGG
GTTGGTGTGATTGCAGATACTCTGTTAAACCATATGGCCGGTATCGATAGTGGAACTGGCGTTGCCGGGTC
TTCGTTACACGCACTATAACTACCCCGGAATCTACCAGACCCAGGACTTCCATCCTGCGGCCCTGGAATCAG
GTGACGACATAGTCAACTATAGCAATCGCGTCGAACTCCAGACTTGCGAACCTGGTGAACCTGGCTGACCTT
GCTACTGATACCGAGTATGTGCGTGCTCGGCTTGCAACCTACGTAAACGATCTACTGTCGTTGGGTGTGGT
AGGCTACGACTTGATGCCGCGAAAACATATTCCTGCTGGTGACATTGCCAACATTTCTGGTCTGTTTGGT
CGGCACCCTATGTTACTCAAGAGGTTATTTATGGCAGCGGAGAGCCGATTCAACCCCTCGGAATATAACCGGG
AATGGTGTGTACAGGAGTTCGCTACACATCGGCACCTTCAGAGTGCCTTCCAGAGTGGTGGGATCTCATC
ACTGAACGATCTTGACAGCAGAGGATGGGTTTCTTCCAGCAATGCGAATGTATTTGTCTCCAACCACGATA
CCGAACGAGGCGGGTCTCTTAACTACAAGTCTGGCTCGACCTACACACTTGGCTCACATCTTCATGCTT
GCATAACCTTATGGAACTCCTACCGTCTTGCTCTTACACCTTCTCAGACAACGATGCTGGCAGTCCATC
GAGTGGTGCAGGCTCTTGCTCCGGATCTGGCGGTGCGAACGGATGGCAATGCCAGCACCGCTGGACTGCAA
TCGCAGGAATGGTCAAGTGGCGCAATGGAGTGACTGGCAGTGTCAACAACCTGGGTACCCGGTACCAACCAG
CAGATTGCCCTTTGGTCGCGGGTCCACTGGGTTTGTAGTTATCAACAACGCGGACTCTGCATGGACCAGGAC
GTTACGACACCCCTCGCTGCCAACTCATACTGCGACATAATCTCCGGGGCAGCAGGAAGTGGGACGT
GTACTGGAGCATCGTACACGATCTCCGGTGGAACTTTACCGCTACAGTCCCTGCGAGGTCTGCAATTGCT
TTGTTTACTGGGGCGATTGGGTCCGGATCGAGCAATAGCGGATCCGTGTCTATCTCTTTCAGTGTATATGC
AGAGACCACTTTTGGTGACAATATCTTCGTGTCTGGAAGTATTTGCAACTCGGTACATGGGCACCAGGTA
GCTCGATCGCAATGTCTCAGCTTCTATCTACATGGACTGCCACTGTGACTCTCCAGCTGGTACTGCG
TTCTCTTATAAATATCTCCGTAAGACCTCCAGCGGCACGGTCTGATGGGAATCGGATCCTAACCGCTCTGC
TACCGCTCCTCGTCCGGCACATTGACGCTTAGCGATACTTGGCGGTGA

>Rso α -Amylase Proteinsequenz

MFEWSDSIAAE**CTSF**IG**PAGY**GYVQVSPPAEHITGSQWWTDYQPVSYILTSKRGSRSQFQNMITTC**KAAG**
VGVIADTLLNHMAGIDSGTGVAGSSFTHYNYPGIYQTQDFHHCGLSEGGDDIVNYSNRVEVQTCELVNLADL
ATDTEYVRARLATYVNDLLSLGVVGLRLDAAKHIPAGDIANILGRLSSAPYVTQEVIIYSGEPIQPSEYTG
NGDVQEFRYTSALQSAFQSGGISSLNDLDRGWVSSSNAN**VFVSNH**DERGSSSLNYKSGSTYTLAHI**FML**
AYPYGTPTVLSSYTFSDNDAGSPSSGAGSCSGSGGANGWQCQHRWTAIAGMVKWRNGVTGSVNNWVTGTNQ
QIAFGRGSTGFVVINNADSAWTRTF**FTPLA**ANSYCDIISGAAGTSGTCTGASYTISGGT**FTATV**PARSAIA
LFTGAIGSGSSNSGSVSI**SFSV**YAETTFGDNI**FV**SGSISQLGTWAPGSSIAMSSASYP**TWTATV**TL**PAGTA**
FSYKYL**RKTSS**SGTVVWESDPNRSATASS**SCTL**TL**SDTW**R*

2.2.8 *Trametes hirsuta*

Es zeigte sich nach der Auswertung der Mascot-Daten mit der selbst erstellten *Trametes* sp. Proteindatenbank, dass die identifizierten Peptide mit einem Score von mindestens 50 zu den Genomdaten von *T. versicolor* passten. Zwei Peptide konnten der α -Amylase EIW55835.1 zugeordnet werden, welche zudem in der NCBI Datenbank hinterlegt war. Diese beiden Peptide deckten die Aminosäuresequenz zu acht Prozent ab (Abbildung 2.10).

Protein sequence coverage: 8%Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MSKWIKLAAL TALGVFFTA A DARPAFDAG ADAHSLHTRA PTGSKDVIIQ
51 MFEWTWDSVA SECTNFIGPA GYGFBVQVSP QETIQGDQWW TDYQPVSYIL
101 TSKRGSRTSF ANMITTCHAA GVGVIIVDTIW NHMAGVDSGT GIAGSSFTHY
151 VYPGIYQNQD FHHCGLEPGD DIVNYDNAVE VQTCELVNLA DLATDTEYVR
201 GRLAQYGN DL LSLGADGLRL DASKHIPVGD IANILSRLNR TVYITQEVIF
251 GSGEPITPNQ YTGNGDVQEF RYTSALKDAF SSGISSLQD FENRGWVPGT
301 GANVFVVNHD TERNGNSLNN NSPSNTYVTA MIFSLAHPYG TPSILSSYTG
351 FTNTDLGAPN GGTGTCSSG GTNGWLCQHR WTAVAGMVG F RNQVGSAAALN
401 NWWAPQSQQI AFGRGSLGFV AINNADSAWT STFTTSLPDG TYCDVVSQGT
451 SGTTCGSSF TVSSGSLSAT VPARSAIAVH TGQLGTGSGS GTGSGGSTTP
501 SGSVTVNFAE TATTTFGENI FLVGSIAQLG TWNTANAIAL SSASYPTWTV
551 SVSIPAGTTF QYKFIRKETD GSVVWESDPN RQATAPASGT STLGSWR

```

Abbildung 2.10 Aminosäuresequenz der α -Amylase aus *T. versicolor* (AN: EIW55835.1). Die identifizierten Peptide von *T. hirsuta* sind rot markiert.

Das Genom von *T. hirsuta* lag nicht annotiert bei NCBI vor. Die Peptide konnten allerdings eindeutig einem Genombereich zugeordnet werden. Ausgehend von diesem wurde der Sequenzbereich zwischen den bekannten Peptiden mit degenerierten Primern erfolgreich amplifiziert. Dazu war es nötig, für beide Primer am 3' Ende die letzten drei Codons variabel zu gestalten. Der verifizierte Genabschnitt zeigte eine Sequenzidentität von 63 % zum Referenzgenom. Mit dem erhaltenden Sequenzabschnitt konnte das 3' Ende spezifisch amplifiziert werden. Die fehlenden ca. 600 Basen des 5' Endes des Gens konnten auch nicht unter der Verwendung verschiedener degenerierter Primer und *Touchdown*-PCRs amplifiziert werden. Da die Abweichung zwischen dem Referenzgenom und dem *T. hirsuta* Stamm der Stammsammlung des Instituts für Lebensmittelchemie so groß war, wurde das nächstliegende Gen *upstream* zu der α -Amylase mittels Blastn identifiziert. Es handelte sich dabei um eine ATP-Synthase, welche einen sehr konservierten C-Terminus aufwies. In diesem Bereich wurde ein Vorwärtsprimer abgeleitet sowie ein sequenzspezifischer Rückwärtsprimer für das α -Amylasegen. Mit dieser Kombination konnte das 5' Ende des α -Amylasegens vollständig amplifiziert und sequenziert werden. Mit diesen Sequenzinformationen konnte die waschaktive α -Amylase des Basidiomyceten *Trametes hirsuta* erfolgreich von cDNA amplifiziert und mittels Sequenzierung verifiziert (ThiAmy) werden. Die verwendeten Primer waren zum einen der Vorwärtsprimer 5' ATGTCAA ACTGGGTCAAGCTCGC 3' und zum anderen der Rückwärtsprimer 5' TCACCGCCAGCTGGACGTGA 3'. Der codierende Bereich des Gens setzte sich aus 1800 Basen zusammen, welche im Genom durch acht Introns unterbrochen waren. Der Vergleich zum Referenzgenom (NCBI) zeigte eine Sequenzidentität von 63 %. Das

resultierende Protein wies 599 Aminosäuren auf, welche eine berechnete molare Masse von 63,1 kDa entsprachen. Das Enzym trug die Cellulose-Bindedomäne CBM20 am C-Terminus.

>Thi α -Amylase CDS

```

ATGTCAAACCTGGGTCAAAGCTCGCCGCACTCGCCGCCCTCGGAGTGTTCTGCACCGCCGCCGTCGACGCCCG
CCCTACTGTCTTTGACGCCGGTGCGGACGCACACTCGCTGCATGCCCGGGCCCCCTCCGGCAGCAAGGATG
TCATCATCCAGATGTTTGTAGTGGAAGTGGGACAGCGTCGCTGCCGAGTGCCTAACTTCATCGGCCCGCC
GGGTACGGCTTCGTGCAAGTGAGCCCGCCCCAGGAGACCATCCAGGGCGCGCAGTGGTGGACCGACTACCA
GCCGGTGTGCTACACGCTCACTGGGAAGCGGGGCGACCGCTCCAGTTTGCGAACATGATTACTACGTGCC
ACGCCCGGGGCGTCGGCGTGATCGTTGACACCATCTGGAACCACATGGCGGGCGTCGACTCCGGCAGGGT
ACCGCGGGCTCGTCCCTCACGCACTACAACCTACCCCGGCATCTACCAAACCAGGACTTTACCACCTGCCG
CCTCGAGCCCGGGCGATGACATCGTCAACTACGACAACCGCGTTGAGGTCCAGACCTGCCGAGCTTGTCAACC
TCGCTGACCTCGCCACCGACACGGAGTATGTGCGCGGTCGCCCTTGCCAGTACGGAACGACCTGCTCTCG
CTCGGTGCCGATGGCCTGCGTCTTGACGCTTCCAAACACATTCCTGTGGGCGACATCGCGAACATCCTGTC
TCGCCCTCAGTCGCTCTGTCTACATCACCCAGGAAGTCATCTTTGGGGCCGGCGAGCCCATCACGCCGAACC
AGTACACCGGGAACGGCGACGTTTACAGGAGTTCGCTACACCTCTGCGCTAAAGGACGCCTTCTTGAGCTCG
GGCATATCCAACCTGCAGGACTTCGAAAACCGTGGATGGGTACCTGGCTCGGGCGCCAACGTGTTTCGTCTGT
CAACCATGACACCGAGCGGAACGGCGCGTTCGCTGAACAACAACCTGCCCTTCGAACACCTACGTCACCGCGA
CGATCTTCTCGCTCGCACACCCGTACGGCACGCCACGATCCTCTCCTCGTATGATGGCTTACGAACACC
GACGCCGGCGCGCCGAACAACAACGTCGGCACATGCTCGACCAGCGGTGGTGCGAACGGGTGGCTCTGCCA
GCACCGCTGGACCGCGATCGCCGGCATGGTCCGGCTTCCGCAACAACGTCGGCAGCGCTGCACTCAACAACCT
GGCAGGCCCCCGAGTCGCAGCAGATTGCGTTCGGTTCGGCGCGCACTTGGCTTCGTTCGCGATCAACAACGCC
GACTCGGCCTGGTCTACGACGTTTACCACCTTCCCTCCCCGATGGTTCCTACTGCGATGTCATCAGCGGCAA
GGCCTCCGGCAGTAGCTGCACCGGTTCTTCGTTTACCGTCTCCGGCGGGGAAGCTGACCGCCACGGTCCCGG
CGCGTAGCGCCATCGCCGTGCACACCGGTCAGAAAGGTTCTGGTGGTGCACGCCACCTCCGCCCTTAGT
ACTACACCAACCAGCGGCACCTGTCAGCGTGACCTTCGCTGAGCAGGCGACGACCACCTTCGGCGAGAACAT
CTTCTCGTTCGGCAGTATTTTCGAGCTCGGGAACCTGGAACCCGGCCAGCGGATCGCCCTGTCTCTGCGG
CGTACCCCTACGTGGTCTGTGCTGTGAACATTTCCCGCCGGAACGACCTTCCAGTACAAGTTTCATCCGCAAG
GAGACCGGACGGTAGCGTCTGTTGGAGTCGGACCCCAACCGCCAGGCTACCAGCGCCCGCGTCCGGTACCAC
CACGCTCACGTCCAGCTGGCGGTTGA

```

>Thi α -amylase Proteinsequenz

```

MSNWVKLAALAAALGVFCTAAVDARPVTFVDAGADAHSLHARAPSGSKDVI IQMFEWNWDSVAAECTNF IGPA
GYGFVQVSPPEQETIQGAQWWDYQPVSYTLTGKRGDRSQFANMITTCHAAAGVGVIVDTIWNHMAGVDSGTG
TAGSSFTHYNYPGIYQNQDFHHCGLPEGDDIVNYDNAVEVQTCELVNLADLATDTEYVVRGRLAQYGNDLLLS
LGADGLRLDASKHIPVGDIANILSRLSRSVYITQEVIFGAGEPITPNQYTGNGDVQEFYRTSALKDAFLLS
GISNLQDFENRGWVPGSGANVFVNHDTERNGASLNNNSPSNTYVTATIFSLAHPYGTPTILSSYDGFTNT
DAGAPNNNVGTCSTSGGANGWLCQHRWTAIAGMVGFRNNVGSAAALNNWQAPQSQQIAFGRGALGFVAINNA
DSAWSTTFTTSLPDGSYCDVISGKASGSSCTGSSFTVSGGKLTATVPARSAIAVHTGQKGGGATPTSSAPS
TTPTSGTVSVTFAEQATTTFGENIFLVGSISQLGNWNPASAIALSSAAYPTWSVSVNIPAGTTFQYKFIRK
ETDGSVVWESDPNRQATAPASGTTTTLTSSWR*

```

2.3 Vergleich der waschaktiven α -Amylasen

In Tabelle 2.5 sind alle identifizierten waschaktiven α -Amylasen aufgelistet. FfoAmy, FpiAmy, RsoAmy und ThiAmy wiesen die Bindedomäne CBM20 auf. Die jeweiligen Signalpeptide hatten eine Länge von 17 bis 23 Aminosäuren. Die berechneten molaren Massen erstreckten sich von 51 kDa für α -Amylasen ohne die CBM20 bis hin zu 64,4 kDa.

Tabelle 2.5 Zusammenfassung der identifizierten α -Amylasen. Aufgeführt sind deren Aminosäureanzahl, berechneter molare Masse, die Länge des Signalpeptides, das Vorhandensein der CBM20 sowie deren experimentell bestimmter pI.

α -Amylase	AS	Molare Masse	Signalpeptid	CBM20	pI
FfoAmy	589	62,0 kDa	22 AS	Ja	4,2 – 4,5
FpiAmy	593	64,4 kDa	17 AS	Ja	4,5
IlaAmy	480	51,0 kDa	19 AS	Nein	4,2 – 3,5
PsanAmy	530	57,0 kDa	17 AS	Nein	4,5
RsoAmy	536	56,4 kDa	23 AS	Ja	3,5
ThiAmy	599	63,1 kDa	23 AS	Ja	3,5

Zur Lokalisierung konservierter Bereiche wurde ein Alignment den identifizierten α -Amylasen durchgeführt (Abbildung 2.11).

```

IlaAmy      ---MVKL-----TLPFVLAAVSSMA-----AGIVIPENSALETRSTGQSKAVIVQMFE
RsoAmy      -----MFE
ThiAmy      MSNWVKLAALAAALGVFCTAAVDARPT-----VFDAGADAHSLHARAPSGSKDVI IQMFE
FfoAmy      MSPWSKLVGLTSLGALFSAAG---AA-----PFLRSTDGHS LAARAPSTNKTIVIVQIFE
FpiAmy      --MW-GSLLAASALV--ASALAATTAEWQQRSIYQLVTD RFATSDGSSPACDTGDRVYCG
PsanAmy     --ML-RLTLLASLLA--ASAF AASPDQWRNRSIYQLVTD RFATSDGSSPACDTSQRQYCG

IlaAmy      WTWDSIASECTNFLGPAGYGYVQTSPPQEHVTGNQ-----WWTDYQPVSYTLT SKRG
RsoAmy      WSWDSIAAECTSFIFGAGYGYVQVSPPAEHITGSQ-----WWTDYQPVSYILT SKRG
ThiAmy      WNWDSVAAECTNFIFGAGYGFVQVSPPEETIQGAQ-----WWTDYQPVSYTLT GKRG
FfoAmy      WSWDSVATECTNFIFGAGYGFVQVSPPAEHIQGSQ-----WWTDYQPVSYTLT SKRG
FpiAmy      GSWQGVINK-LDYIQYMGFDAIWISPVVKNLEGSTGDGYSYHGYWAVDQ---NSVNEHFG
PsanAmy     GTWQGIVKK-LDYIQNMGFDAIWISPIVANLEGNTSYGEAYHGYWTQNI---NALNSHFG
      .*:.: : :.: *.: : ** : * :*: :.: : *

IlaAmy      NRSQFANMISTCHKAGVKVIADTIFNHMTGSDSGTG VAGSSYTHYNYPGIYQNQDFHHCG
RsoAmy      SRSQFQNMITTC KAAGVGIADTLLNHMAGIDSGTG VAGSSFTHYNYPGIYQTQDFHHCG
ThiAmy      DRSQFANMITTCH AAGVGVIVDTIWNHMAGVDSGTGTAGSSFTHYNYPGIYQNQDFHHCG
FfoAmy      NRDQFANMINTCH AAGVGVIVDTIWNHMAGVESGTG VAGSSFTHYNYPGIYQTQDFHHCG
FpiAmy      TADDLNALSSALHARGMYLMVDVVVNHMAANTLPPDY--STFT PFS-----SESDFHT--
PsanAmy     SADDLKALSDALH KRGMYLMVDVVVNHMAGTADPPNF--SAFQPFS-----SQSNYHS--
      .: : : : * : :.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *.: *

IlaAmy      LEPNDDIVNYDNAVEVQTCQLE----GLADLATDTEYVRSRLAQYGN DL-LSLGVDGLRL
RsoAmy      LESGDDIVNYSNRVEVQTC ELV----NLADLATDTEYVRARLATYVNDL-LSLGVVGLRL
ThiAmy      LEPGDDIVNYDNAVEVQTC ELV----NLADLATDTEYVRGRLAQYGN DL-LSLGADGLRL
FfoAmy      LTSGDDIVDYSSRAQVQTC ELV----NLADLATDTEYVRSRLAAYGN DL-LSLGADGFRL
FpiAmy      ---FCWITDYDNQTNVEQCWLGDSSVPLADC DTEADNVIDFFYNWIGELRANYTV DGFRI
PsanAmy     ---ECFISYDNQTEVEQCWLGDKNVPLVDLDTEDTNI VSAMNTWVSTLANSFV DGLRI
      * :*. . :*: * * *.* * : : : . * . . *.:*

IlaAmy      DASKHIAVTDLTNITSRLNGSPYLTQEVIIYGE GEPITPNQYVIGIDVQEF RYTTALKNAF
RsoAmy      DAAKHIPAGDIANILGR LSSAPYVTQEVIIYGS GEPIQPSEYTGNGDVQEF RYTSALQSAF
ThiAmy      DASKHIPVGDIANILSRLSR SVYITQEVIFGAGE PITPNQYTGNGDVQEF RYTSALKDAF
FfoAmy      DAAKHIAATGDIANILSRLNSTPYISQEVIIYGAGE PVTPSEYTGNGDVQEF RYTSAIKDAF

```

```

FpiAmy      DTLKHVRQTFWPDFQ--TNAGVYAVGEVFDGDVNYVSPYTEVID-GVLDYPTYYYQLTSAF
PsanAmy     DTVKHVRKDFWPDFA--KASGVFTIGEVLHNETDYVSAYTEVID-SVLDYPTWFLVAAF
*: **:      : :          : **: . : : . . * : : : **

IlaAmy      LN--GAINGLQSFNDLW----VSGDKANVFVTHDTERNGAALTNSSPSNTYVLATIFS
RsoAmy      QS--GGISSLNDLDSRGW----VSSSNANVFVSNHDTERRGSSSLNYKS-GSTYTLAHIFM
ThiAmy      LS--SGISNLQDFENRGW----VPGSGANVFVNHDTERRNGASLNNNSPSNTYVTATIFS
FfoAmy      LN--GDISSLQSFNDRGW----VAGSGANVFVNHDTERRNGDSLNNNSPSNTYVTATIFS
FpiAmy      ESTSGSIQNLVDVIQSAQSTYSTMLFQVATFLENQDNPRFQSLTTDQGL-----VKNA
PsanAmy     QTTGGNLSALSATVQQAQSAYKNGEFMTGSFLENHDQPRFQSLTQDDAL-----IRNA
. . :. * . . . . * : * : * * . .

IlaAmy      LAHPYGTVTVLSSYSGFDTNSDAGA-PNGGTGT-CSGTGGSNGWFCQHRW-----IA-
RsoAmy      LAYPYGTPTVLSSYT-FS-DNDAGS-PSSGAGS-CSGSGGANGWQCQHRW-----TA-
ThiAmy      LAHPYGTPTILSSYDGFNTDAGA-PNNNVGT-CSTSGGANGWLCQHRW-----TA-
FfoAmy      LAHPYGTPTILSSYSGFNTDAGA-PNGGAGT-CSGSGGSNGWLCQHRW-----TA-
FpiAmy      MAWPFIAADGIPILYGGQEQQYTGNDPDPNREALWLSGY-EENKPLVQHARILNAARKAAI
PsanAmy     MTWPFVQDGVPIMYGGQEQSYGGGPD PANREALWLSGY-VEDKPLVKHVQAMNGARKAAI
: : * : : * . . * * . . * : : * *

IlaAmy      -----FQGMTAFRNTVGSAAIANWQTGQNSQIAFDRGTAG
RsoAmy      -----IAGMVKWRNGVT-GSVNNWVTGTNQQIAFGRGSTG
ThiAmy      -----IAGMVGFRNNVGSAAALNNWQAPQSQQIAFGRGALG
FfoAmy      -----FAGMVGFRNNVGNAAALTNWQSPQGRQIAFGRGALG
FpiAmy      AASSSFLSTAVTFPSVGSN-TLAASKYPLLSLLTNVGASGMPVWDVSSSGTGYD-----
PsanAmy     SANSNYLTTAVKFLSSGSESTLAVSKPPMLALLTNGGSSSNPSWSVPS-AGFS-----
: . . *

IlaAmy      FVAINNADSQWDATWKTGLPDGVYCNVISGVFS-SGSCSGGTVTVKNGGQIPYNLSSRNA
RsoAmy      FVVINNADSAWTRTFTTPLAANSYCDIISGAAGTSGTCTGASYT-ISGGTFTATVPARSA
ThiAmy      FVAINNADSAWSTTFTTSLPDGSYCDVISGKA-SGSSCTGSSFT-VSGGKLTATVPARSA
FfoAmy      FVAINNDDSAWSTTFTTQLPDGSYCDVVS GAS-SGGNCSGTSIT-VSGGSFSATVPARSA
FpiAmy      -----EGTELIDALTCCTTYTAGSS-----GSVSVTG-SSGDPVILLPTSAY
PsanAmy     -----ANEELVDVLTCSKLNADSN-----GGVSVQG-SAGSPQVLMPVSSL
* * . . . : . * :

IlaAmy      VAIHTNAKLS*-----
RsoAmy      IALFTGAIGSGSS-----NSGSVVISFSVYAETTFGDNI FVSGSISQLGTWAPGS
ThiAmy      IAVHTGQKGGGATPTSAPSTTPTSGTVSVTFAEQATTTFGENIFLVGSISQLGNWNPAS
FfoAmy      VAIHTGAKGSSNNGGG-----GGDNVTVNFVSVTATTTFGENIFLVGSISQLGSWNAAN
FpiAmy      N--A--SYCSELTG----TDSTGSSDTVSVTFEVEYNTTYGENLYLTGSVSELVDWSVDD
PsanAmy     S--KSGNVCSSLAT----GGQASSARG---WFGGA-----VESLPLI-AAFLLAGWAAQS
*

IlaAmy      -----
RsoAmy      SIAMSSASYPTWTATVTLPAGTAFSYKYLRKTSSGTVVWESDPNRSATASSSGTLTLLSDT
ThiAmy      AIALSSAAYPWTVSVSVNIPAGTTFQYKFIRKETDGSVWESDPNRQATAPASGTTTTLTSS
FfoAmy      AIALSSASYPTWTVSVSIPASTTFEYKFIRKETDGSIVWESDPNRSATTPSAGTQNLSSS
FpiAmy      ALLMSSADYPTWVSLTVDLPPSTAIQYKYLTKY-NGDVTWEDDPNNELTTPASGSVTQSDS
PsanAmy     SLIIV*-----

IlaAmy      ---
RsoAmy      WR*
ThiAmy      WR*
FfoAmy      WR*
FpiAmy      WH*
PsanAmy     ---
    
```

Abbildung 2.11 Alignment der sechs α -Amylasen aus Rso, Fpi, Thi, Ila, Ffo und Ila, welches mit Clustal Omega (European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK) durchgeführt wurde.

Aus dem Alignment geht hervor, dass sich die meisten Sequenzunterschiede im Bereich des N- und des C-Terminus befinden. Lücken innerhalb der Sequenzen treten entweder nur bei Fpi und Psan auf oder geschlossen bei Rso, Thi, Ila und Ffo. Die prozentuale Anzahl an identischen Aminosäuren zwischen den einzelnen α -Amylasen ist in Tabelle 2.6 dargestellt. Die Amylasen von Fpi und Psan unterscheiden sich von den anderen vier α -Amylasen am meisten und weisen untereinander verglichen dazu mehr identische Aminosäuren auf. Die α -Amylasen von Thi und Ffo zeigen die höchste Anzahl identischer Aminosäuren und unterscheiden sich im Vergleich zur RsoAmy in etwa der gleichen Größenordnung. Die IlaAmy zeigt zu Psan und Fpi die meisten Sequenzunterschiede und im Vergleich zu den restlichen dreien Identitäten im Bereich von 65,8 % bis ca. 69 %.

Tabelle 2.6 Darstellung der prozentual identischen Aminosäuren der einzelnen α -Amylasen untereinander in Form einer Matrix.

Prozentualer Anteil der jeweils identischen Aminosäuren						
α-Amylase	IlaAmy	RsoAmy	ThiAmy	FfoAmy	FpiAmy	PsanAmy
IlaAmy	100					
RsoAmy	65,8	100				
ThiAmy	68,9	71,8	100			
FfoAmy	68,8	70,5	78,3	100		
FpiAmy	21,2	27,5	27,7	27,9	100	
PsanAmy	21,1	21,8	21,7	22,0	56,9	100

Zur Visualisierung der Sequenzgemeinsamkeiten wurde ein phylogenetischer Baum in Form eines Phenogramms erstellt (Abbildung 2.12). Bei dieser Abbildung zeigt sich, dass sich die Amylasen von Fpi und Psan von den restlichen α -Amylasen am meisten unterscheiden. Die vier Enzyme von Rso, Ffo, Thi und Ila bilden einen eigenen Abschnitt. Die α -Amylasen von Thi und Ffo sind sich am ähnlichsten und bilden einen gemeinsamen Ast. An diese beiden schließt sich die IlaAmy an. Den größten Sequenzunterschied innerhalb dieser Gruppe weist die RsoAmy auf. Bei diesem Vergleich ist das Vorhandensein der CBM20 unerheblich, da sowohl Psan als auch Ila diese Domäne nicht aufweisen, jedoch in unterschiedlichen Ästen zu finden sind.

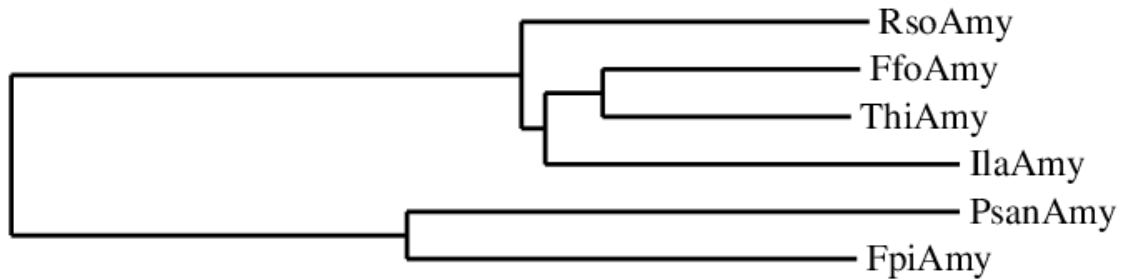


Abbildung 2.12 Basierend auf dem Alignment (Abbildung 2.7) erstellter phylogenetischer Baum (Drawgram Version 3.696, www.phylogeny.fr).

2.4 Heterologe Expression der α -Amylase-Gene

Die α -Amylase-Gene von *R. solani*, *F. pinicola* und *P. sanguineus* sollten heterolog im Expressionsorganismus *K. phaffii* erfolgen. Für jedes Konstrukt wurden 94 Transformanten auf Aktivität getestet (5.2.3). Die jeweiligen Gene wurden klassisch kloniert, entweder in das pHIL-S1-Vektorsystem oder den pPIC9k Vektor. Die linearisierten Plasmide wurden entweder in *K. phaffii* GS115 (Tabelle 2.7) oder *K. phaffii* SM1168 (Tabelle 2.8) eingebracht.

Tabelle 2.7 Expressionskonstrukte für die heterologe Produktion in *K. phaffii* GS115. Eingebrachte Sequenzen sind mit einem X markiert.

Gen	Signalsequenz	Spacer	N-terminaler His-tag	Native Signalsequenz
FpiAmy	α -Faktor	-	-	X
	α -Faktor	-	-	-
PsanAmy	α -Faktor	-	-	X
	α -Faktor	-	-	-
RsoAmy	α -Faktor	-	-	X
	α -Faktor	-	-	-
RsoAmy	-	-	-	X
Codon optimiert				
	α -Faktor	-	-	X
	α -Faktor	-	-	-
	α -Faktor	-	X	X

α -Faktor	-	X	-
α -Faktor	X	X	X
α -Faktor	X	X	-
α -Faktor	X	-	-
PHO1	-	X	X
PHO1	-	X	-
Inulinase	-	X	X
Inulinase	-	X	-

Tabelle 2.8 Expressionskonstrukte für die heterologe Produktion in *K. phaffii* SMD1168. Eingebrachte Sequenzen sind mit einem X markiert.

Gen	Signalsequenz	Spacer	N-terminaler His-tag	Native Signalsequenz
RsoAmy	-	-	-	X
Codon optimiert				
α -Faktor	-	-	-	X
α -Faktor	-	-	-	-
α -Faktor	-	-	X	X
α -Faktor	-	-	X	-

Keines der verwendeten Expressionskonstrukte (Tabelle 2.7 und Tabelle 2.8) führte zur Produktion einer aktiven heterologen α -Amylase in *K. phaffii*. Des Weiteren wurde zum Ende der Kultivierung ein Zellaufschluss durchgeführt. Es konnte ebenfalls keine intrazelluläre α -Amylase-Aktivität in einem der Konstrukte festgestellt werden.

Um einen systematischen Fehler auszuschließen, wurde ein Fusionsprotein aus einer bereits erfolgreich heterolog produzierten Laccase aus *Pleurotus pulmonarius* mit der Codon optimierten RsoAmy-Sequenz kloniert. Als Linker für beide Enzyme wurde der $3 \times \text{GGGGS}$ Linker (Elleuche, 2015) verwendet. Es konnte bereits 24 h nach der ersten Methanolinduktion eine extrazelluläre Laccase-Aktivität festgestellt werden. Diese erhöhte sich bis zum letzten Kultivierungstag nach 96 h auf $12,5 \text{ U L}^{-1}$. Es konnte zu keiner Zeit eine α -Amylase-Aktivität, weder extra- noch intrazellulär, detektiert werden. Eine Analyse des gereinigten heterologen Fusionsproteins mittels semi-nativer SDS-PAGE zeigte eine Bande unterhalb der erwarteten 40 kDa unter semi-nativen Bedingungen (Abbildung 2.13).

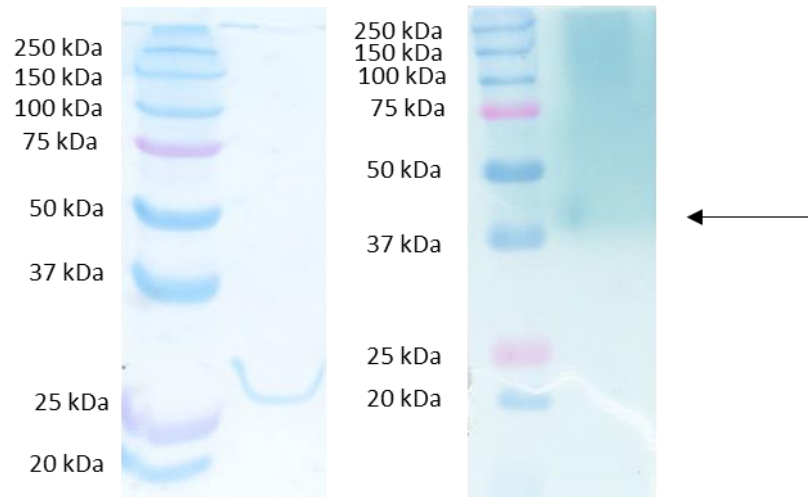


Abbildung 2.13 Coomassie gefärbte semi-native SDS-Page des His-tag gereinigten Fusionsproteins bestehend aus Laccase und α -Amylase (links) sowie semi-native PAGE derselben Probe mit ABTS-Aktivitätsfärbung (rechts). Pfeil zeigt die erwartete ABTS gefärbte Laccase-Bande. Elektrophoretische Trennung erfolgte bei 10 mA und 4 °C für 3 h.

Für die heterologe Produktion einer α -Amylase in *K. phaffii* GS115 oder *K. phaffii* SMD1168 wurden 20 verschiedene Expressionskonstrukte erstellt und insgesamt über 2300 Transformanten auf Enzymaktivitäten untersucht.

Da sich der Expressionswirt *K. phaffii* für die heterologe Produktion der α -Amylasen als nicht geeignet erwies, sollte mit *A. oryzae* ein neuer Expressionswirt getestet werden. Da dieser für eine hohe wirtseigene Amylase-Produktion bekannt ist und dadurch die Selektion sowie die Bestimmung der Aktivität der Transformanten erschwert ist, sollte der Stamm mutiert werden. Ziel war es, mit der CRISPR-Technik die wirtseigenen α -Amylasen zu deletieren, sodass keine Produktion dieser stattfindet.

Die Transformation wurde wie in 5.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Nach der Selektion mit HygromycinB wurden die Transformanten drei Mal auf CDZ-Platten übersetzt. Waren diese zu ca. 75 % bewachsen, wurde Mycel für die DNA-Isolierung entnommen. Nach der anschließenden PCR (5.2.4.3) erfolgte die Sequenzierung der Genomabschnitte. Dabei wurden insgesamt 15 Transformanten partiell sequenziert. Bei keiner der Transformanten kam es zu einer CRISPR-vermittelten Mutation. Aufgrund einer fehlenden zweiten Selektionsmöglichkeit wurden keine weiteren Transformanten im besagten Genomabschnitt sequenziert.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten neuartige α -Amylasen aus Basidiomycota identifiziert werden, welche sich für einen Einsatz in Waschmitteln eignen. Dazu wurden Stämme aus der Basidiomyceten-Sammlung des Instituts für Lebensmittelchemie (Hannover) in stärkehaltigem Medium kultiviert. Die Analyse der Kulturüberstände mittels Aktivitätsassays und Applikationsstudien sollte Aufschluss darüber geben, ob geeignete α -Amylasen sekretiert wurden. Es folgte eine Teilreinigung der vielversprechendsten Kulturüberstände mit einer anschließenden Identifizierung der α -Amylasen und deren korrespondierender Gensequenzen. Abschließend sollten die identifizierten Gene in einem geeigneten Wirtsorganismus über exprimiert und die daraus resultierenden Enzyme charakterisiert werden.

3.1 Screening

In dieser Arbeit wurden acht von 51 getesteten Basidiomycota identifiziert, welche eine Verbesserung der Waschleistung bei 40 °C und einer Stunde Waschzeit bei Stärkeansammlungen herbeiführten. Es stellte sich heraus, dass diese auf die Präsenz von α -Amylasen zurückzuführen war (Abbildung 2.5). Dabei zeigte sich, dass die teilgereinigten Kulturüberstände von *T. hirsuta* und *R. solani* die besten Waschleistungen aufwiesen (Abbildung 2.7). Im Allgemeinen wiesen die verschiedenen Pilze die höchste α -Amylase-Aktivität im Zeitraum von 48 h bis 158 h nach dem Kultivierungsbeginn auf. Die Schwankungen für den Zeitpunkt der höchsten α -Amylase-Aktivität sind darauf zurückzuführen, dass die Aktivitätslevel der verschiedenen Pilze signifikant voneinander abweichen können (Arana-Cuenca *et al.*, 2004). Für die untersuchten Basidiomycota gab es zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Patente oder Veröffentlichungen mit dem Fokus auf eine Anwendung oder ein Potential von Amylasen in Waschmittelformulierungen. In der Literatur wurde mittlerweile der *R. solani*-Stamm AG-4 als Amylase-Produzent mit einem Potential für Waschmittelanwendungen beschrieben (Uzun *et al.*, 2017), die identifizierte α -Amylase des LCI-Stammes *R. solani*-AG-3 ist jedoch bereits durch eine Patentanmeldung der Henkel AG geschützt (Musmann *et al.*, 2017). Des Weiteren wurden amyolytische Aktivitäten und deren Einfluss auf Wachstumsraten für *T. hirsuta* und *P. sanguineus* beschrieben (Bolhassan, 2013) ebenso wie die Sekretion von α -Amylasen für *F. fomentarius* (Krupodorova *et al.*, 2014). Vier von acht waschaktiven α -Amylasen stammen von Vertretern aus der Familie der Polyporaceae und wiederum sechs der acht Basidiomycota stammen aus der Ordnung der

Polyporales. Allein den Polyporaceae gehören mehr als 1800 Arten an und bieten damit ein enormes Potential für weitere Screenings (Kirk *et al.*, 2002). Ebenso ist diese Familie der Basidiomycota als ein Favorit für Kandidaten in Bezug auf industrielle Anwendungen beschrieben (Binder *et al.*, 2013). Es wurden vielfach erfolgreiche Screenings für Enzyme der Polyporales durchgeführt, darunter sind unter anderem Ligninperoxidasen (Peláez *et al.*, 1995), Laccasen (Arana-Cuenca *et al.*, 2004), Pectinasen (Xavier-Santos *et al.*, 2004) sowie Cellulasen und Xylanasen (Guillén *et al.*, 2011) zu finden. Das Potential für waschaktive Enzyme aus der Ordnung der Polyporales wurde am Beispiel zweier Peroxidasen aus *Bjerkandera adusta* gezeigt (Linke *et al.*, 2015). Dies begründet nochmals die Notwendigkeit, dass alle im Institut für Lebensmittelchemie vorhandenen Basidiomycota der Familie der Polyporaceae in dieser Arbeit untersucht wurden. Dass eine α -Amylase von einem Vertreter der Gattung *Pleurotus* stammt, ist wenig überraschend, da Enzyme dieser Gattung oftmals ihr Potential in industriellen Applikationen unter Beweis gestellt haben (Struch *et al.*, 2016). Auch die mögliche Anwendung in der Detergenzindustrie ist sowohl für eine Laccase (Behrens *et al.*, 2017) als auch für eine Peptidase (Leonhardt *et al.*, 2016) aus Pleuroten beschrieben worden.

3.2 Molekularbiologische Identifizierung waschaktiver Amylasen

Basierend auf dem sauren isoelektischen Punkten der α -Amylasen (Tabelle 2.5) konnten diese mittels einer Anionen-Austausch-Chromatographie teilgereinigt werden (SDS-PAGE) (Freer, 1993). Nach der Analyse der Proteinbanden mittels LC-MS/MS konnten sechs α -Amylasen auf Proteinebene identifiziert werden. Im Anschluss wurden die korrespondierenden Gensequenzen erfolgreich amplifiziert (2.2). Für die Identifizierung der verbleibenden Amylasen aus *P. sajor-caju* und *L. strygosus* sollte eine mindestens zweistufige Reinigung erfolgen, um die Enzyme von Interesse weiter zu isolieren und zu konzentrieren. Eine Fällung der Proteine mittels Ammoniumsulfat mit einer anschließenden HIC-FPLC kann sehr gute Trennergebnisse liefern (Pandey *et al.*, 2000). Im Falle von *P. sanguineus* könnte eine feinere Abstufung des Elutionsgradienten zu einer besseren Trennung der Proteine führen, besonders wenn man beachtet, dass die Stärke abbauende Aktivität im Vergleich zu allen anderen Kandidaten erst bei 20 % Natriumchlorid eluierte.

Nach der Separierung der teilgereinigten Kulturüberstände mittels SDS-PAGE wurden die Proteinbanden von 50 bis 120 kDa ausgeschnitten und es erfolgte eine Analyse der Proteine mithilfe der Massenspektrometrie. Es wurden dabei in sechs der acht teilgereinigten

Kulturüberstände α -Amylasen detektiert. Zusätzlich wurde in jedem Kulturüberstand eine Glucoamylase detektiert, was die Freisetzung von Glucose während der Stärkehydrolyse erklärt (Abbildung 2.5). Zum einen steigt die Produktion von Glucoamylasen mit der Freisetzung von Maltose an (Møller & Svensson, 2016), welche durch die α -Amylase aus Stärke freigesetzt wird. Zum anderen weisen Glucoamylasen eine ähnliche molare Masse verglichen mit α -Amylasen auf (Pandey, 1995; Norouzian *et al.*, 2006). Um Glycosidierungen und deren Einfluss auf die Massenspektrometrie auszuschließen, wurden alle Proben deglycosidiert. Es ist allerdings möglich, dass nicht alle Proteine deglycosidiert wurden. Dies könnte die ausbleibenden Nachweise für α -Amylasen in den Proben von *P. sajor-caju* und *L. strygosus* erklären. Die Nachweisgrenze bei der Gelfärbung mit Coomassie kann bei glycosidierten Proteinen nach oben verschoben werden (Osset *et al.*, 1989). Aus diesem Grund wurden die Proben zusätzlich silbergefärbt (Møller & Poulsen, 2002) und auch die nicht Coomassie gefärbten Gelbereiche in der Größenordnung von 50 – 80 kDa mittels Massenspektrometrie analysiert. Ein Einfluss der möglichen Glycosidierungen auf die Massenspektrometrie durch das Auftreten von Artefakten ist allerdings nicht ausgeschlossen (Lottspeich & Engels, 2012).

Die Auswertung der Massenspektrometrie-Daten und die erhaltenen Proteintreffer erläutern jedoch nicht das Phänomen, dass in der Zymografie Stärke abbauende Enzyme bei 100 – 250 kDa sowie im Bereich 50 – 75 kDa detektiert wurden. Eine gewisse Schwankung erklärt sich dadurch, dass die Proben für die Zymografie nicht deglycosidiert wurden und somit höhere molare Massen zu erwarten sind. Des Weiteren trennen sich bei der Zymografie die Proteine nicht nur nach der Größe, sondern auch nach ihrer Konformation und Ladung auf. Das Auftreten von zwei Stärke abbauenden Fraktionen in der Zymografie (Abbildung 2.3) könnte auf eine mögliche Dimerisierung Stärke abbauender Enzyme in Gegenwart ihres Substrates zurückzuführen sein (Mehta & Satyanarayana, 2013; Hameed *et al.*, 2017). Eine Analyse mittels Massenspektrometrie konnte aufgrund der einpolymerisierten Stärke nicht durchgeführt werden. Es bleibt daher Spekulation, warum sich zwei Stärke abbauende Fraktionen in der Zymografie zeigten. Zum einen ist es möglich, dass die Inkubation über vier Stunden ausreichend war, dass auch die identifizierten Glucoamylasen viel Stärke abbauten und diese somit nicht mehr mit der Lugol'schen Lösung angefärbt wurde. Zum anderen ist es denkbar, dass die Stärke abbauenden Enzyme während der Auftrennung unterschiedlich stark mit der Stärke wechselwirkten und sich dadurch eine Trennung ergab. Des Weiteren sind synergistische Effekte zwischen den α -Amylasen und den Glucoamylasen

nicht auszuschließen. Während der elektrophoretischen Trennung kann das Substrat durch die α -Amylasen teilweise abgebaut worden sein. Dies würde die leichte Aufhellung im Bereich der Laufbahnen erklären. Eine Trennung von Glucoamylasen und α -Amylasen ist aufgrund der sehr ähnlichen isoelektrischen Punkte als auch der in etwa gleich großen molaren Massen schwierig.

Auf Grundlage der Ergebnisse der Massenspektrometrie konnten die verschiedenen *de novo* sequenzierten Peptide in sechs Fällen passenden α -Amylasen zugeordnet werden. Mittels Genominformationen wurden die korrespondierenden Gene von cDNA amplifiziert und mit Sangersequenzierungen verifiziert. Dabei traten Unterschiede zwischen den Genomdaten und den Sequenzierungsergebnissen von 1 % bis 37 % auf. Die hohe genetische Vielfalt ist zum einen auf den Lebenszyklus der Basidiomycota zurückzuführen (Wallen & Perlin, 2018), zum anderen hat aber auch der Fundort der einzelnen Pilze einen Einfluss auf die genetische Diversität. So wurden genetische Unterschiede für den Basidiomyceten *Schizophyllum commune* gezeigt, bei denen jeweils zwölf Pilzisolat aus den USA und zwölf weitere aus Europa stammten (Baranova *et al.*, 2015). Der Basidiomycet *R. solani* weist ebenfalls eine hohe genetische Varianz auf. Zum einen unterteilt sich diese Art in acht verschiedene Stämme, wobei nicht alle Stämme miteinander kompatibel sind (Fiers *et al.*, 2011). Dies wiederum eröffnet die Diskussion, ob es sich bei den *R. solani* Stämmen überhaupt um eine gemeinsame Art handelt. Die natürliche Mutationsrate wurde ebenfalls untersucht, die die Sequenzabweichungen zwischen Genomdaten und den erhaltenen Sequenzierungsergebnissen erklärt (Clark & Anderson, 2004). Es konnte zudem festgestellt werden, dass die Populationen mit einer höheren genetischen Varianz und der dikaryotischen Lebensweise die größere Fitness aufwiesen (Clark & Anderson, 2004). Speziell α -Amylasen, die nicht essentiell für den Metabolismus, aber vorteilhaft für das Überleben sind, weisen oft mehrere Kopien in einem Genom auf (Chen *et al.*, 2012). Dies hat zur Folge, dass sich Mutationen nur dann durchsetzen, wenn die daraus resultierenden Unterschiede des Proteins sich positiv auf Parameter wie Stabilität oder pH-Optimum auswirken (Erjavec *et al.*, 2012). Auch wenn α -Amylasen konservierte Bereiche aufweisen, so liegt die Sequenzidentität bei den restlichen Aminosäuren nur bei 10 % (Janecek, 1994). Selbst hochkonservierte Bereiche wie die ITS – Genomabschnitte weisen eine Variation bis zu 17,3 % auf (Nilsson *et al.*, 2008).

Der Vergleich der sechs identifizierten α -Amylasen zeigt, dass vier Enzyme (RsoAmy, ThiAmy, FfoAmy, FpiAmy) eine CBM20 aufweisen (Tabelle 2.5). Die natürliche

Auftrittswahrscheinlichkeit liegt jedoch bei 10 % (Machovic & Janecek, 2006). Dies lässt vermuten, dass es einen positiven Einfluss dieser Domäne auf den Stärkeabbau auf Stoffen geben kann. Zudem sind die identifizierten CBMs sehr konserviert (Abbildung 3.1). Diese Akkumulation nach einem Screening von über 50 Basidiomycota lässt den Rückschluss auf eine verbesserte Bindung an die Stärkeverschmutzung zu. Es wurde gezeigt, dass Enzyme mit dieser Domäne Stärkekörner abbauen können (Jia *et al.*, 2017). Die Zugänglichkeit von Enzym und Anschmutzung ist entscheidend für die Verbesserung des Waschprozesses. Um die Aktivität von Enzymen zu verbessern, wurde diese Domäne bereits erfolgreich an amylolytische Enzyme ohne eine CBM-Domäne fusioniert (Walker *et al.*, 2015). Die Fusion der CBM20 mit einer Glycosyltransferase zeigte signifikante Verbesserungen der katalytischen Effizienz. Neben der Erhöhung der spezifischen Aktivität, konnte ebenso die Bindung an Stärkekörner verbessert werden (Jia *et al.*, 2017). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei der heterologen Produktion eines Enzyms mit CBM21 eine kostengünstige Reinigung für technische Enzyme möglich ist (Lin *et al.*, 2009).

FpiAmy	VSVTFEVEYNTTYGENLYLTGVSSELVDWSDALLMSSADYPTWSLTVDLPPSTAIQYK	60
RsoAmy	VSISFSVYAETTFGDNIFVSGSISQLGTWAPGSSIAMSSASYPTWTATVTLPAFTAQSYK	60
FfoAmy	VTVNFSVTATTTFGENIFLVGSISQLGSWNAANAIALSSASYPTWTVSVSIPASTTFEYK	60
ThiAmy	VSVTFAEQATTTFGENIFLVGSISQLGNWNPASAIALSSAAYPTWSVSVNIPAGTTTFQYK	60
	::: **::**::: ***:* * .:: :*** *****: :* :* .*::**	
FpiAmy	YLTKY-NGDVTWEDDPNNELTTPASGSVTQSDSWH	94
RsoAmy	YLRKTSSGTVVWESDPNRSATASSGTLTLDSTWR	95
FfoAmy	FIRKETDGSIVWESDPNRSATTPSAGTQNLSSWR	95
ThiAmy	FIRKETDGSVVWESDPNRQATAPASGTTTLTSSWR	95
	:: * .* :***.***. *: ::*: . :::*	

Abbildung 3.1 Sequenzalignement der vier identifizierten CBM20 ohne deren Schleifenstruktur zwischen der Domäne C und der eigentlichen CBM20.

Die Vorhersage von 3D-Modellen ist für die Verbesserung von Stabilität, Aktivität und Spezifität essentiell (Berman *et al.*, 2000). Für die Voraussage von Proteinstrukturen muss mindestens eine Sequenzidentität von 25 % vorliegen (Dolan *et al.*, 2012). Diese Sequenzidentitäten weisen alle sechs identifizierten α -Amylasen auf (Tabelle 2.6), sodass deren 3D-Strukturen miteinander verglichen werden können. Für die Vorhersage wurde die Plattform I-TASSER verwendet (Roy *et al.*, 2010). Da RsoAmy und PsaAmy zueinander die größten Sequenzunterschiede aufweisen, wurden deren Strukturen miteinander verglichen (Abbildung 3.2).

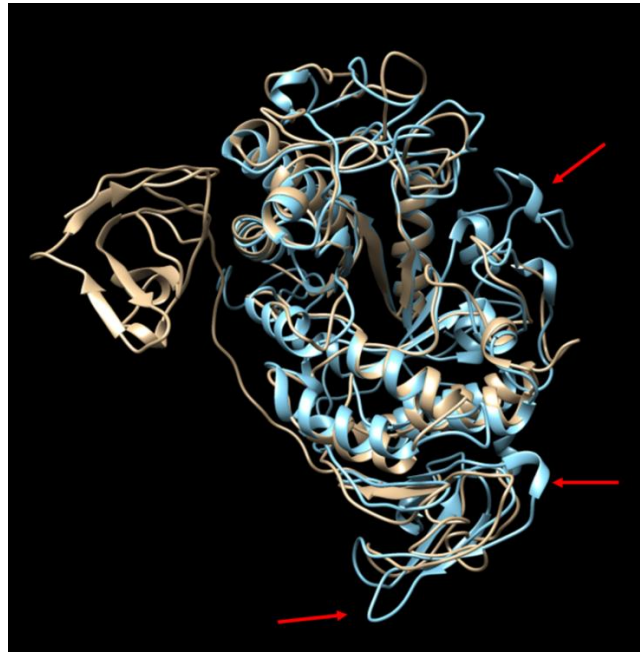


Abbildung 3.2 Überlagerung der 3D-Modelle von Psan (blau) und Rso (gold). Die Pfeile zeigen strukturelle Unterschiede der PsanAmy zur RsoAmy. Diese nach außen ragenden Strukturen zeigt die RsoAmy nicht. Zudem weist die RsoAmy die CBM20 auf.

Die Überlagerung der 3D-Modelle von Rso und Psan, welche sich sowohl in dem Vorhandensein der CBM20 als auch in 78 % der Aminosäuren unterscheiden, zeigt, dass die Struktur der α -Amylasen dennoch sehr konserviert ist (Abbildung 3.2). Die typischen Domänen A, B und C sind deutlich zu erkennen und überlagern sich sehr stark.

Für eine Erfindungsmeldung müssen Amylasen 70 % Sequenzidentität zu der Amylase AA560 aufweisen (Svendsen *et al.*, 2010; Mussmann *et al.*, 2017). Für einen Vergleich der ThiAmy und RsoAmy mit einer bereits patentierten α -Amylase mit Bezug zur Detergenzapplikation wurden sowohl ThiAmy (blau) als auch RsoAmy (gold) an eine α -Amylase (rosa) aus dem Patent EP2264160 (Sequenz 11, Svendsen *et al.*, 2010) mittels UCSF Chimera 1.11.2 verglichen (Abbildung 3.3). Die Referenzamylase (rosa) stammt aus *Bacillus* sp. und weist keine Stärke bindende Domäne auf (Sequenz 11, Svendsen *et al.*, 2010). Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden daher die CBM20 von RsoAmy und ThiAmy ausgeblendet. Zusätzlich wurden die für α -Amylasen bekannten Domänen A, B und C markiert. In der Struktur der Domäne A, welche das aktive Zentrum beinhaltet, zeigte sich eine sehr konservierte Struktur der drei Amylasen. Die Domäne C wies ebenfalls eine sehr hohe Deckung der Proteinstrukturen auf, wobei die äußerste Schleife der Referenzamylase weiter nach außen gefaltet ist. Die größten Unterschiede waren in den Strukturen der Domäne B vorhanden. Diese bildet zum Teil die Substratbindetasche. RsoAmy und ThiAmy zeigten

eine sehr hohe Deckung der Strukturen, während die Referenzamylase mehr β -Faltblätter und größere Schleifenstrukturen aufwies.

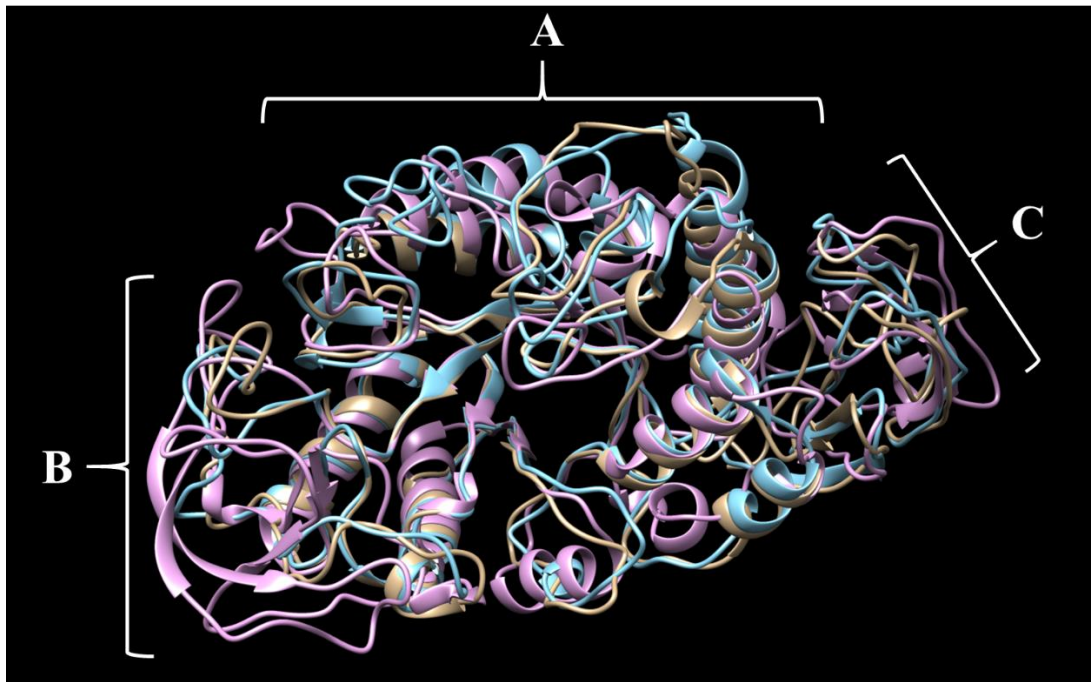


Abbildung 3.3 Überlagerung der RsoAmy (gold), ThiAmy (blau) und AA560 α -Amylase (rosa) (HI973417.1). Da die AA560 α -Amylase keine CBM20 aufweist, wurden diese für eine bessere Übersicht von RsoAmy und ThiAmy ausgeblendet. Die α -Amylase Domänen A, B und C wurden markiert.

Der Vergleich der Strukturen der ThiAmy, RsoAmy mit der Referenzamylase kann Ansatzpunkte für Mutation bieten. Nachträglich herbeigeführte Mutationen können die 3D-Struktur maßgeblich verändern. Die Möglichkeit, Aminosäuresequenzen mittels zielgerichteter Mutationen zu verändern, zielt auf die Erhöhung der Spezifität, Stabilität, Aktivität, Löslichkeit und Produktion von Proteinen ab (Winkler & Kao, 2014). Oftmals werden durch gerichtete Mutationen die Anreicherung von Disulfidbrücken oder die Veränderung der posttranslationalen Modifikationen wie Glycosidierungen angestrebt. Ebenso werden nach außen ragende *Loop*-Strukturen gekürzt und im Allgemeinen ein kompakteres Enzym bevorzugt, um die Thermophilie zu erhöhen. Negativ geladene Aminosäurereste erhöhen die Aktivität bei höheren Temperaturen ebenfalls (Vojcic *et al.*, 2015). Wird ein patentiertes Enzym gentechnisch verändert, ergeben sich zwangsläufig Änderungen in der Proteinstruktur. Eine Identifizierung derzeit in Waschmittel befindlicher Enzyme kann angelehnt an Gaubert *et al.* (2016) mittels LC-MS/MS erfolgen.

Das Vorhandensein der CBM20 bei vier von sechs identifizierten α -Amylasen weist auf deren Einfluss bei der Verbesserung des Wascheffektes hin. Die Aminosäuresequenz der vier identifizierten CBM20 zeigte viele identische oder ähnliche Aminosäuren (Abbildung 3.1).

Die Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen führen zu einer konservierten Struktur dieser Domäne (Abbildung 3.4). Da alle identifizierten CBM20 eine nahezu identische Struktur aufweisen, kann ein positiver Einfluss auf den Wascheffekt postuliert werden. Die RsoAmy, ThiAmy, FpiAmy und FfoAmy unterscheiden sich in der Länge und Struktur der Aminosäuresequenz zwischen der CBM20 und der Domäne C (Abbildung 3.4).

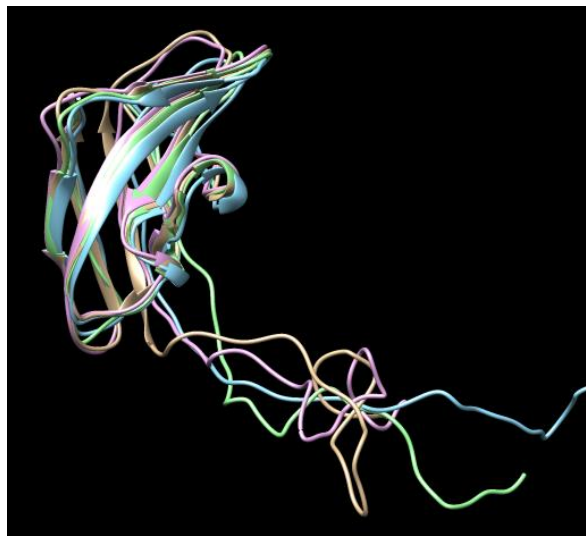


Abbildung 3.4 Überlagerung der vier identifizierten CBM20 sowie deren angehängte Schleifenstruktur bis zur Domäne C der jeweiligen Amylase. RsoAmy (blau), ThiAmy (gold), FfoAmy (rosa), FpiAmy (grün).

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Schleifen können verschiedene Ursachen haben (Abbildung 3.4). Die Erstellung der Modelle wurde mit mehreren Algorithmen berechnet, und die Ausbildung der Struktur ist abhängig von der Proteinstruktur der Domäne C (Roy *et al.*, 2010). Da die C-Domänen sich zwischen den einzelnen Amylasen unterscheiden, führt das bei der Berechnung der frei beweglichen Schleifen zu Abweichungen. Zudem weisen die Aminosäuresequenzen zwischen der Domäne C und der CBM20 unterschiedliche Längen auf. Dieses beeinflusst ebenfalls die freie Ausrichtung der Schleifen. Zudem führen Sequenzunterschiede zu unterschiedlichen Strukturen. Da die ThiAmy und die RsoAmy sowohl eine lange als auch eine kürzere Aminosäuresequenz zwischen der Domäne C und der CBM20 aufweisen und diese die besten Waschleistungen zeigten, lässt die Länge der Schleifenstruktur keinen direkten Rückschluss auf die Waschleistung zu.

Die Waschversuche und die Vergleichstests, vor allem beim Kooperationspartner Henkel AG & Co. KGaA, zu etablierten und sequenzoptimierten Enzymen zeigt das enorme Potential der α -Amylasen aus Basidiomycota. Zielgerichtete Mutationen, wie sie bereits beschrieben worden sind, können die Waschleistung der α -Amylasen weiter verbessern. So zeigten Yang *et al.* (2013) am Beispiel der α -Amylase von *B. subtilis* und deren Mutation der Histidine His275, His293 und His310 zu Asparaginsäure eine Verbesserung des k_{cat}/K_m -Wertes um das 16-fache.

3.3 Versuche zur Heterologen Expression

Die heterologe Produktion der identifizierten α -Amylasen RsoAmy, PsaAmy und FpiAmy sollte in *K. phaffii* durchgeführt werden. Gründe waren zum einen ein fehlgeschlagener Expressionsversuch einer Glucoamylase aus *R. solani* in *Escherichia coli* und zum anderen die zum Zeitpunkt der Arbeit höhere Anzahl an Publikationen von Enzymen in *K. phaffii* verglichen zu *E. coli*. *K. phaffii* war früher unter dem Namen *Pichia pastoris* bekannt. Die Art wurde jedoch bereits 1995 zu *Komagataella* geändert (Yamada *et al.*, 1995). 2005 wurde *K. phaffii* noch einmal unterteilt. Die Isolate französischen Ursprungs wurden zu *K. pastoris* klassifiziert. Die in dieser Arbeit verwendeten amerikanischen Isolate (GS115 und SMD1168) wurden *K. phaffii* zugeordnet (Kurtzman, 2005). *K. phaffii* weist im Gegensatz zu *E. coli* einen Glycosidierungsapparat auf. Der signifikante Einfluss von Glycosidierungen wurde beispielsweise an einer Laccase aus *Lentinus* sp. gezeigt. Die mutierte Laccase, welche einen durch Punktmutation herbeigeführten Wegfall einer Glycosidierungsstelle aufwies, zeigte nur noch 5 – 40 % Aktivität im Vergleich zur Wildtyp-Variante (Maestre-Reyna *et al.*, 2015). Das pPIC9 und PHIL-S1 Vektorsystem wurde gewählt, da beide mit dem AOX1 Promotor, einem induzierbaren und sehr gut beforschten Promotor, versehen sind. Dieser wird bereits erfolgreich seit 1985 verwendet (Cregg *et al.*, 1985; Piva *et al.*, 2017; Zahrl *et al.*, 2017). Die induzierbare Expression hat den Vorteil, dass die Wachstumsphase unabhängig von der Phase der heterologen Produktion ist. Zudem wird der AOX1 Promotor durch Glucose sehr stark reprimiert, sodass keine ungewollte Expression stattfindet. Des Weiteren ist durch die Kultivierung in YEPD für 72 h eine hohe Zellzahl garantiert (Ahmad *et al.*, 2014; Zahrl *et al.*, 2017). Es konnte keine aktive α -Amylase heterolog mit dem pPIC9 Vektorsystem produziert werden. Um ein Ausbleiben der heterologen Produktion aufgrund der *codon usage* oder starker Sekundärstrukturen der mRNA auszuschließen, wurde die

Sequenz der RsoAmy für *K. phaffii* Codon optimiert. Dies führte zu einer Reduktion des GC-Anteils. Zusätzlich wurden die von *K. phaffii* präferierten Codon-Triplets gewählt. Bereits Wang *et al.* (2015) zeigten, dass eine Anpassung der *codon usage* die Ausbeute des rekombinanten Proteins um das bis zu 2,6-fache steigern kann. Da auch die Anpassung der RsoAmy-Sequenz nicht die erwarteten Ergebnisse brachte, wurde das Signalpeptid ausgetauscht. Der α -Faktor, welcher zu einem posttranslationalen Transport ins Endoplasmatische Retikulum (ER) führt, wurde gegen die wirtseigene saure Phosphatase-Signalsequenz (PHO1) ersetzt (pHIL-S1 Vektor, Abbildung 5.4). Diese führt zu einem cotranslationalem Transport. Dadurch muss es zu keinem Einsatz von Chaperonen im Cytoplasma kommen, um eine Fehlfaltung des translatierten heterologen Proteins zu verhindern. Zudem wird durch die Verwendung eines anderen Signalpeptides das heterologe Protein nicht von der Kex2p Peptidase prozessiert (Govindappa *et al.*, 2014). Die Aminosäureabfolge EAEA des α -Faktors muss zudem von der STE13 Peptidase prozessiert werden. Dieser Vorgang kann vom N-Terminus des heterologen Proteins allerdings inhibiert werden (Ahmad *et al.*, 2014). Auch die Versuche mit dem PHO1-Signalpeptid führten nicht zu einer erfolgreichen Produktion des Proteins, ebenso wenig wie die Verwendung des Inulinase-Signalpeptids sowie der Produktionsversuch lediglich mit dem nativen Signalpeptid der RsoAmy. Da in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich basidiomycetische Enzyme mit dem Zusatz einer Kozak-Sequenz produziert werden konnten (Kelle *et al.*, 2014; Leonhardt *et al.*, 2016), wurde diese Sequenz als Zwischensequenz vor die CDS des Codon optimierten RsoAmy-Gens kloniert. Bei diesen Varianten blieben ebenfalls die erwarteten Ergebnisse aus.

Um einen systematischen Fehler bei den Expressionsversuchen mit *K. phaffii* auszuschließen, wurde vor die Codon-optimierte RsoAmy-Sequenz das Gen einer bereits erfolgreich heterolog produzierten Laccase kloniert (Behrens *et al.*, 2017). Es konnte jedoch nur eine Laccase-Aktivität und keine amylytische Aktivität detektiert werden. Eine Analyse des His-tag gereinigten Fusionsproteins (Abbildung 2.13) zeigte, dass der größte Teil des heterologen Proteins kleiner war als erwartet. Es war nur eine schwache Bande bei der erwarteten molaren Masse zu erkennen. Dies erklärt auch die geringe Aktivität im Vergleich zur Publikation von Behrens *et al.* (2017). Ein unvollständiges Vorliegen des Fusionsproteins kann mehrere Ursachen haben. Zum einen kann es aufgrund von ungünstigen Sekundärstrukturen der mRNA unvollständig translatiert worden sein (Ahmad *et al.*, 2014; Madhavan *et al.*, 2017). Zum anderen ist es möglich, dass das heterologe Protein

nach der Translation und während des Transports durch Peptidasen prozessiert und dadurch in der Peptidlänge gekürzt wurde (Puxbaum *et al.*, 2015). Madhavan *et al.* (2017) meinten, dass der größte Nachteil des Screenings die heterologe Produktion sei. So ist aufgrund der gewählten Vektoren ein Problem mit der Promotorerkennung zwar ausgeschlossen, da jeweils nur die Gene von Interesse hinter den vielfach verwendeten *AOX1* Promotor kloniert wurden. Die Ineffizienz der Translation, die mögliche Fehlfaltung der Proteine sowie die gehinderten posttranslationalen Modifikationen bleiben jedoch Fehlerquellen bei der heterologen Expression. Die heterologe Produktion des Fusionsproteins resultierte in einem produzierten Enzym, welches größtenteils eine niedrigere molare Masse aufwies, als erwartet wurde (Abbildung 2.13). Bei der heterologen Produktion von Proteinen kann es zu einer Überladung des ERs kommen. Dabei können nicht korrekt gefaltete Proteine die *unfolded protein response* (UPR) auslösen. Diese geht sehr oft mit der *ER-associated degradation* (ERAD) einher (Hohenblum *et al.*, 2004; Puxbaum *et al.*, 2015). Im ER bindet das Protein Kar2 ungefaltete oder nicht korrekt gefaltete Proteine (Abbildung 3.5). Liegen keine oder nur sehr wenige ungefaltete Protein im ER vor, ist das Protein Kar2 an der Endoribonuklease Ire1 assoziiert. Löst sich dieser Proteinkomplex, da sich ungefaltete Proteine im ER akkumulieren, wird Ire1 autophosphoryliert und somit aktiviert. Diese spalten die im Cytoplasma befindliche *HAC1* mRNA, sodass der Transkriptionsfaktor translatiert werden kann (Zahlr *et al.*, 2017). Dieser induziert die Expression von UPR-Genen, welche für Chaperone codieren. Erhöht sich die Anzahl von Faltungshelfern im ER und verringert sich die Anzahl der nicht gefalteten Proteine, ist Kar2 wieder an Ire1 gebunden, welches somit inaktiviert wird. Ist Kar2 zu lange an einem Protein gebunden wird die ERAD ausgelöst. Das nicht korrekt gefaltete Protein wird in das Cytosol transportiert, wo eine Ubiquitinierung des Proteins stattfindet. Dieses löst einen Transport ins Proteasom aus, wo das falsch gefaltete Protein schließlich abgebaut wird (Puxbaum *et al.*, 2015).

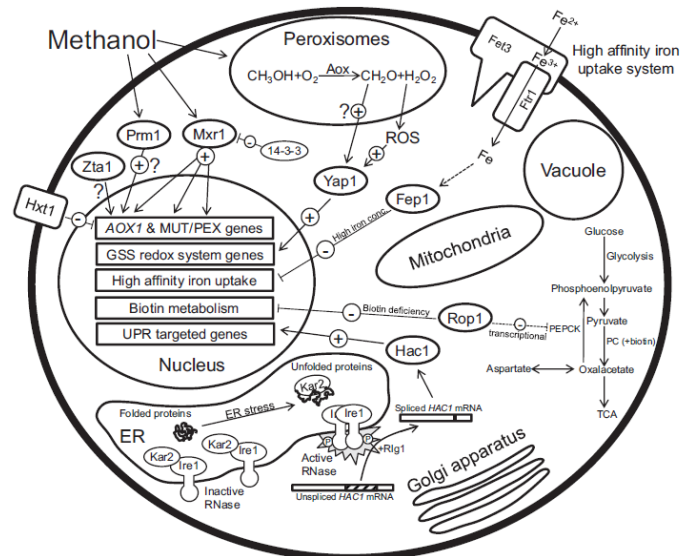


Abbildung 3.5 Einfluss der Methanolzugabe (MeOH) auf die Zelle. MeOH aktiviert zum einen Transkriptionsfaktoren, die an den AOX1 Promotor binden und die Expression der Alkoholoxidasegene 1 und 2 zur Folge hat. Des Weiteren ist der Abbau von MeOH in den Peroxisomen gezeigt. Neben dem Nucleus ist der ER dargestellt. Kommt es in Folge einer MeOH induzierten Expression zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER, bindet Kar2 an diese. Ist dieses nicht mehr an Ire1 assoziiert, wird Ire1 autophosphoryliert und kann die im Cytosol befindliche mRNA des Hac1 Gens splicing. Das translatierte Protein aktiviert im Zellkern zusätzlich die Expression weiterer Faltungshelfergene, sodass die Anzahl ungefalteter Proteine im ER abnimmt, bis Kar2 wieder frei wird und an Ire1 binden kann (Vogl & Glieder, 2013).

Es ist demnach möglich, dass die geringe Konzentration an heterologem Fusionsprotein und das Ausbleiben einer Produktion einer einzelnen α -Amylase auf die UPR und den ERAD zurückzuführen sind.

Die heterologe Überexpression kann zu einer Überladung des ERs führen, welche durch die Aktivierung von HAC1 nicht bewältigt werden kann. Daher wurde bereits mehrmals HAC1 erfolgreich überexprimiert, sodass die Anreicherung von nicht gefaltetem heterologen Protein im ER ausbleibt (Ahmad *et al.*, 2014; Zahrl *et al.*, 2017). Es wurde aber auch gezeigt, dass die Überexpression von Faltungshelfern zu einer Reduzierung der Sekretion führen kann oder gar keinen Effekt hat (van der Heide *et al.*, 2002). Die Veränderung der Hydrophobizität eines Enzyms kann ebenso einen Einfluss auf den ERAD-vermittelten Proteinabbau haben (Puxbaum *et al.*, 2015). Um eine erfolgreiche heterologe Produktion zu erzielen, wäre es denkbar, Punktmutationen durchzuführen, welche die Löslichkeit des Zielenzym erhöhen. Dies führte beispielsweise bei der Mutation der α -Amylase aus *Bacillus licheniformis* und der anschließenden Produktion in *E. coli* zu einer zweifach erhöhten Ausbeute (Wang *et al.*, 2016). Neben dem ERAD-vermittelten Abbau der heterologen α -Amylasen kann auch eine

Fehlleitung des Enzyms zur Vakuole und dem damit verbundenen Abbau stattgefunden haben (Zahrl *et al.*, 2017).

Die Degradation der heterologen Proteine kann ebenso unabhängig von den Vorgängen im ER stattgefunden haben. Es kann zur Proteolyse während des Vesikeltransports gekommen sein (Werten & Wolf, 2005; Ahmad *et al.*, 2014). Der letzte Schritt der Sekretion, die Fusion des Transportvesikels mit der Zellmembran, endet mit der Diffusion des Proteins durch die Zellmembran. Diese kann eine Barriere darstellen, muss es jedoch nicht (Zahrl *et al.*, 2017). Wäre eine heterologe Amylase in der Zellmembran verblieben, hätte Aktivität nach dem Zellaufschluss erwartet werden können. Es ist allerdings möglich, dass an der Zellmembran assoziierte Peptidasen das Enzym abgebaut haben. Die Peptidase pep4 gehört zu diesen proteolytisch aktiven Enzymen an der Zellmembran. Der *K. phaffii* Stamm SMD1168 ist eine *knockout*-Variante, bei dem das korrespondierende Gen der pep4 mutiert wurde. Um auszuschließen, dass die heterologe RsoAmy durch die pep4 abgebaut wurde, wurden Expressionsversuche in SMD1168 durchgeführt (Tabelle 2.8). Diese führten nicht zu einer heterologen Produktion der RsoAmy. Da nur eine Membran assoziierte Peptidase in dem SMD1168 Stamm entfernt wurde, ist ein Abbau an der Membran theoretisch noch möglich. Die Ursache für das Ausbleiben der heterologen Amylasen scheint jedoch eher im ER oder Cytosol zu liegen. Es ist denkbar, dass die mRNA der RsoAmy nicht vollständig translatiert wird und das Fusionsenzym daher kleiner als erwartet ist. Ebenso ist ein ungewollter Abbau der Amylasen im ER möglich oder eine Spaltung des Fusionsproteins durch proteolytische Aktivitäten.

Da die heterologe Produktion einer waschaktiven α -Amylase in *K. phaffii* fehlschlug, wurde ein neuer Expressionswirt ausgewählt. Dieser sollte den Ursprungsorganismen der α -Amylasen phylogenetisch näher sein, weshalb *A. oryzae* ausgewählt wurde. Dieser Wirt ist eine der Hauptquellen für die industrielle Herstellung von α -Amylasen und zudem vollständig sequenziert. Des Weiteren ist *A. oryzae* als Expressionswirt etabliert (Lubertozzi & Keasling, 2009). Da dieser für seine hohe wirtseigene α -Amylase-Produktion bekannt ist (Gopinath *et al.*, 2017), sollte *A. oryzae* mit der CRISPR-Technik mutiert werden. Ziel dabei waren die beiden α -Amylasegene, sodass ein Screening späterer Transformanten erleichtert wäre. Grundlage dieses Versuchs war die Publikation von Nødvig *et al.* (2015). Die getesteten Transformanten zeigten keine Mutationen in den gewünschten Genabschnitten. Der ausbleibende Erfolg kann auf die zu geringe Anzahl sequenzierter Transformanten zurückzuführen sein. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Mutation von nicht-

Zielsequenzen, welche nur durch eine vollständige Genomsequenzierung nachweisbar wären. Mutierte nicht-Zielsequenzen wurden bereits beschrieben, ebenso Methoden diese zu minimieren (Kadam *et al.*, 2018; Yin *et al.*, 2018). Nicht-Zielsequenzen könnten begünstigt sein, da das zugrunde liegende Genom für die Suche des *Protospacers* nicht das von *A. oryzae* selbst war. Aufgrund des Mangels des in die verschiedenen Online-Programme geladenen Genoms musste auf das von *A. niger* zurückgegriffen werden. Die Eingabe der Zielsequenz stammte jedoch von *A. oryzae*. Das Experiment sollte wiederholt werden, wenn in den Online-Programmen zur Bestimmung der *Protospacer*-Sequenz das Genom von *A. oryzae* aufgenommen wurde. Zusätzlich empfiehlt es sich für einen erneuten Versuch ein Zielgen zu wählen, welches einen morphologischen Effekt hat oder ein Reportgen zu inserieren, um die Genveränderung in der Zielsequenz leichter zu selektieren. Denkbar wären hier Resistenzgene oder Reporterproteine wie eGFP oder dsRED.

4. Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten wissenschaftlichen Erkenntnisse zeigen das umfassende Potential von Basidiomycota zur Sekretion von waschaktiven α -Amylasen auf und eröffnen eine Vielfalt an möglichen Anschlussarbeiten. Neben der Identifizierung der waschaktiven α -Amylasen aus Lst und Psaj könnten sich diese in erster Linie mit der heterologen Expression der Amylasen beschäftigen. Dazu kann wiederum die gentechnische Veränderung von *A. oryzae* mittels CRISPR in den Fokus geraten, um zum einen die Expression der wirtseigenen Amylasen per *Gen-knock-out* zu verhindern und somit eine erleichterte Selektion der erfolgreich generierten Transformanten zu erzielen. Zum anderen könnten weitere Peptidase-Gene deletiert werden, sodass eine wirtseigene Produktion dieser verringert wird oder gar ausgeschlossen werden kann. Die Selektion der Transformanten mit einem Reporter-gen oder der Insertion einer Resistenz mit anschließender Selektion würden sich dazu anbieten. Wenn die heterologe Expression basidiomycetischer Amylase-Gene etabliert ist, kann die Charakterisierung resultierenden Enzyme und ihrer CBM20 Aufschluss darüber geben, inwieweit diese das Waschergebnis beeinflusst. Dazu könnten Deletionsvarianten der α -Amylasen mit CBM20 kloniert werden und die Waschleistung der Enzyme mit und ohne diese Bindedomäne direkt verglichen werden. Alternativ können die verschiedenen Bindedomänen an ein oder mehrere α -Amylase-Gene fusioniert werden, um somit die Bindeunterschiede der jeweiligen Domänen zu charakterisieren und zu vergleichen. Zeigt sich ein positiver Effekt einer oder mehrerer CBM20-Domänen, können diese ebenfalls an andere waschaktive Enzyme wie Peptidasen oder Lipasen fusioniert werden. So kann getestet werden, ob bessere Waschleistungen generiert werden. Für die weitere Auswahl, welche der sechs identifizierten α -Amylasen sich am besten für den Einsatz in einem Waschmittel eignen, müssen diese biochemisch charakterisiert und verglichen werden. Dazu gehören neben der Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums auch verschiedene Stabilitätsversuche, vor allem in Gegenwart von Waschmittelformulierungen.

5. Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Abweichende Hersteller werden im Folgenden angegeben.

5.1.2 Verwendete Puffer und Lösungen

Sämtliche Puffer und Medien (Tabelle 5.1) wurden mit zweifach demineralisiertem Wasser angesetzt, welches mit dem Reinstwassersystem Synergy (Millipore, Darmstadt) aufbereitet wurde. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte mit dem pH-Meter 827 pH lab (Metrohm, Filderstadt).

Tabelle 5.1 Puffer und Lösungen.

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung	Anwendungsbereich
50x TAE-Puffer	2 M Tris Ultra Pure, 50 mM EDTA, pH 8, 5,71 % Essigsäure	Agarosegelelektrophorese
Roti TM -Gelstain Färbelösung (Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe))	10 % (v/v) Stammlösung in H ₂ O	Agarosegelelektrophorese
dNTP-Mix (Thermo Scientific)	je 2,5 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP	PCR

5.1.3 Verwendete Medien

Für die Kultivierung der Pro- und Eukaryoten kamen unterschiedliche Medien zum Einsatz. Deren Zusammensetzung ist in Tabelle 5.2 aufgelistet. Die Medien wurden mittels eines Dampfautoklaven für 20 min und 121 °C sterilisiert. Aufgrund der Hitzeinstabilität der Antibiotika (Tabelle 5.3), wurden diese nach dem Autoklavieren unter sterilen Bedingungen

zu den Medien gegeben. Für die Herstellung von Festmedien wurde diesen vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar hinzugegeben.

Tabelle 5.2 Zusammensetzung sowie Anwendungsbereich der Medien.

Medium	Zusammensetzung	Anwendungsbereich
LB-Medium (Luria-Bertani)	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % NaCl; pH 7,0	Anzucht von <i>E. coli</i>
YPD	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Pepton 2 % (w/v) Dextrose	Anzucht von <i>K. phaffii</i>
BMMY	1 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Pepton 100 mM Kaliumphosphat- Puffer pH 6,0 1,34 % YNB 4 x 10 ⁻⁵ % Biotin 1 % (v/v) Methanol	Anzucht von <i>K. phaffii</i>
SNL	3 % (w/v) Glucose 0,45 % (w/v) Asparagin 0,3 % (w/v) Hefeextrakt 0,15 % (w/v) KH ₂ PO ₄ 0,05 % (w/v) MgSO ₄ 0,1 % (v/v) Spurenelement- Lösung	Kultivierung Basidiomycota

5.1.4 Antibiotika

Für die Anzucht der *E. coli*-Zellen wurde Ampicilin verwendet (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3 Eingesetztes Antibiotikum zur Selektion der Bakterien.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration
Ampicilin	H ₂ O	100 mg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹

5.1.5 DNA und Protein Längenstandards

Die verwendeten DNA- und Protein-Größenstandards sind in Abbildung 5.1 und Abbildung 5.2 aufgeführt.

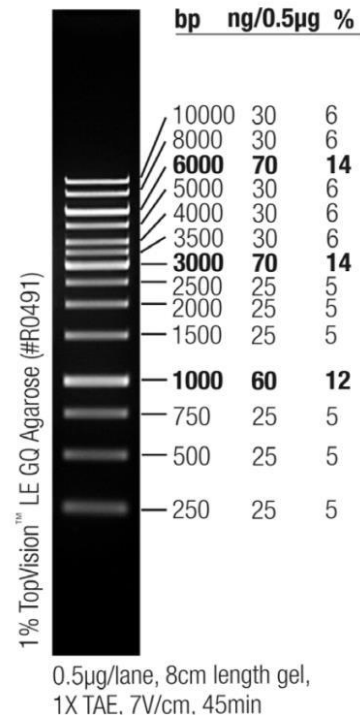


Abbildung 5.1 verwendeter DNA Längenstandard. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

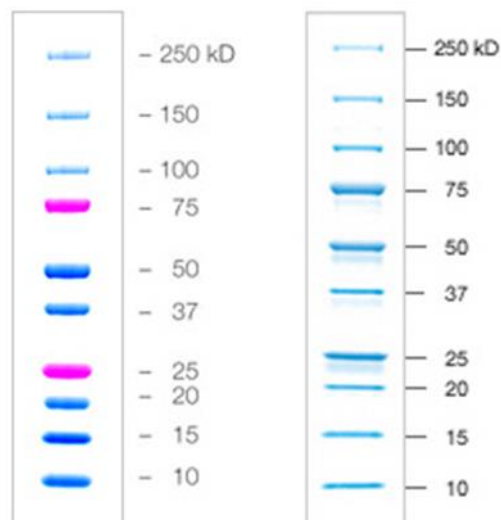


Abbildung 5.2 Proteinstandards der Firma Bio-Rad (Hercules, Kalifornien). Links der vorgefärbte Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Biorad, Hercules, Kalifornien), rechts der Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standard (Biorad, Hercules, Kalifornien).

5.1.6 Verwendete Oligonukleotide

Alle für die Versuchsdurchführungen verwendeten und durch die Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) synthetisierten Oligonukleotide sind in Tabelle 5.4 aufgeführt.

Tabelle 5.4 Verwendete Oligonukleotide sowie deren Bezeichnung.

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Bemerkung
1	Rso_for	ATGTTTGAGTGGTCATGGGATAG TATT	Vorwärtsprimer RsoAmy
2	Rso_rev	TCACCGCCAAGTATCGCTAAGC GTC	Rückwärtsprimer RsoAmy
3	Fpi_for	ATGTGGGGCAGCCTTCTCGCAG	Vorwärtsprimer FpiAmy
4	Fpi_rev	TCAATGCCAGCTGTCGCTCTGCG TGACG	Rückwärtsprimer FpiAmy
5	Psan_for	ATGCTACGCCTCACGCTCCTTGC CTCT	Vorwärtsprimer PsanAmy
6	Psan_rev	TCAGACAATGATGAGGCTGGAT TGCGCAGC	Rückwärtsprimer PsanAmy
7	Ila_for	ATGGTCAAGTTGACACTCCCTTT CG	Vorwärtsprimer IlaAmy
8	Ila_rev	TTATGAGAGCTTGGCGTTGGTAT GAATGGC	Rückwärtsprimer IlaAmy
9	Thi_for	ATGTCAAACCTGGGTCAAGCTCG C	Vorwärtsprimer ThiAmy
10	Thi_rev	TCACCGCCAGCTGGACGTGA	Rückwärtsprimer ThiAmy
11	Ffo_for	ATGTCTCCTTGGTCCAAGCTTGT TGGG	Vorwärtsprimer FfoAmy
12	Ffo_rev	TTATCTCCAGGAAGAGGAAAGA TTCTGA	Rückwärtsprimer FfoAmy
13	M13	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierprimer
14	M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierprimer
15	5'AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAG	Sequenzierprimer
16	3'AOX	GCAAATGGCATTCTGACATCC	Sequenzierprimer

5.1.7 Verwendete Vektoren

Für die Sequenzierung der amplifizierten Gene wurde diese in den pUC57 Vektor kloniert. Dieser wurde mittels EcoRV linearisiert, sodass eine Selektion der Transformanten mit einem Blau-Weiß-Screening durchgeführt werden konnte (Abbildung 5.3). Für die heterologe Expression wurden die Zielgene in pPIC9- oder pHIL-S1-Vektoren kloniert (Abbildung 5.4).

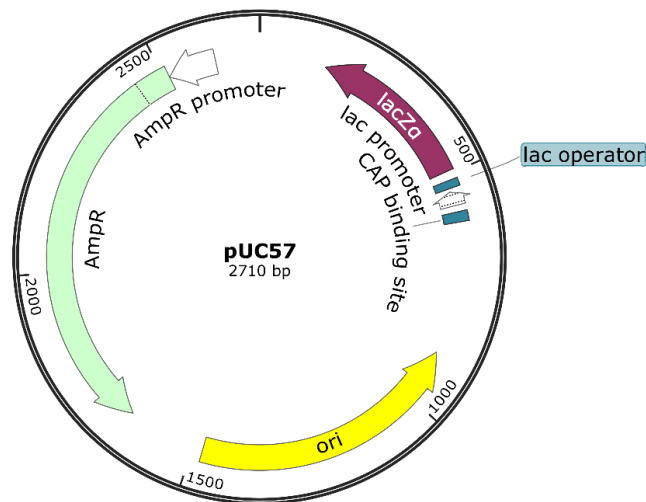


Abbildung 5.3 pUC57 Vektor für die Klonierungen von PCR-Fragmenten in die EcoRV-Schnittstelle mit anschließendem Blau-Weiß-Screening.

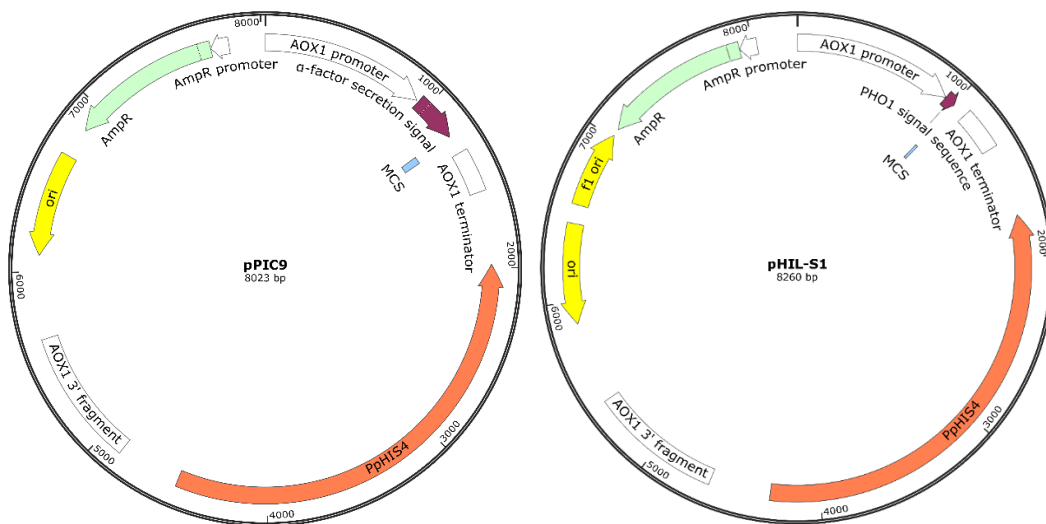


Abbildung 5.4 Vektoren für die Expression von Genen in *K. phaffii* unter dem induzierbaren AOX1-Promotor. pPIC9 weist dabei den α -Faktor aus *S. cerevisiae* als Signalsequenz auf, während pHIL-S1 die Signalsequenz der sauren Phosphatase aus *K. phaffii* trägt.

5.1.8 Enzyme

Im Folgenden werden alle verwendeten Enzyme und deren Verwendungsgebiet aufgeführt (Tabelle 5.5).

Tabelle 5.5 Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller	Konzentration	Verwendung
<i>Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase</i>	Thermo Scientific	2 U μL^{-1}	Klonierung, Sequenzierung
<i>DreamTaq® DNA Polymerase</i>	Thermo Scientific	5 U μL^{-1}	Kolonie-PCR
<i>Fast Digest DpnI</i>	Thermo Scientific		Klonierung
<i>T4 Polynukleotid Kinase</i>	Thermo Scientific	10 U μL^{-1}	Klonierung
<i>T4 DNA Ligase</i>	Thermo Scientific	5 U μL^{-1}	Klonierung
<i>DNase I</i>	Thermo Scientific	1 U μL^{-1}	RNA-Reinigung
<i>Reverse Transkriptase</i>	Nippon Genetics	200 U μL^{-1}	cDNA Synthese

5.1.9 Verwendete Organismen

Folgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Organismen in aufsteigender Reihenfolge bezüglich ihrer Komplexität aufgeführt.

Für Klonierungsarbeiten wurden *E. coli*-Zellen des Typs Top10 verwendet (Tabelle 5.6).

Tabelle 5.6 Verwendete *E. coli* Stämme.

<i>E. coli</i> Stamm	Hersteller	Genotyp
Top10	InVitrogen	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>

Expressionsversuche wurden in verschiedenen Stämmen von *K. phaffii* durchgeführt (Tabelle 5.7).

Tabelle 5.7 Verwendete *K. phaffii*-Stämme.

<i>K. phaffii</i> Stamm	Hersteller	Genotyp
GS115	InVitrogen	<i>his4</i>
SMD1168	InVitrogen	<i>his4, pep4</i>

Für das Screening von neuartigen waschaktiven α -Amylasen wurden insgesamt 51 Basidiomycota (Tabelle 5.8) verwendet.

Tabelle 5.8 Verwendete Basidiomycota sowie deren interne Nummer und Abkürzung.

Interne Nummer	Basidiomycota	Abkürzung
1	<i>Armillaria mellea</i>	Ame
6	<i>Collybia fusipes</i>	Cfu
14	<i>Lepista nuda</i>	Lnu
17	<i>Fomitopsis pinicola</i>	Fpi
18	<i>Ganoderma applanatum</i>	Gap
19	<i>Trametes versicolor</i>	Tve
20	<i>Gloeophyllum odoratum</i>	God
23	<i>Ischnoderma benzoinum</i>	Ibe
25	<i>Lentinula edodes</i>	Led
52	<i>Piptoporus betulinus</i>	Pbe
64	<i>Pleurotus lampas</i>	Pla
71	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Psan
72	<i>Phaeolus schweinitzii</i>	Psch
76	<i>Polyporus umbellatus</i>	Pum
79	<i>Sparassis crispa</i>	Scr
80	<i>Serpula lacrymans</i>	Sla
81	<i>Tyromyces floriformis</i>	Tfl
83	<i>Trametes suaveolens</i>	Tsu
88	<i>Wolfiporia cocos</i>	Wco
206	<i>Laetiporus sulphureus</i>	Lsu
213	<i>Agrocybe aegerita</i>	Aae
218	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pos
231	<i>Tremella mesenterica</i>	Tme
232	<i>Flammulina velutipes</i>	Fve
241	<i>Phallus impudicus</i>	Pim

246	<i>Grifola frondosa</i>	Gfr
248	<i>Fomes fomentarius</i>	Ffo
250	<i>Stereum rugosum</i>	Rsu
257	<i>Auriporia aurea</i>	Aau
262	<i>Schizophyllum commune</i>	Sco
265	<i>Psilocybe cubensis</i>	Pcu
272	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	Gtr
275	<i>Irpex lacteus</i>	Ila
276	<i>Funalia trogii</i>	Ftr
277	<i>Ganoderma lucidum</i>	Glu
280	<i>Coprinus comatus</i>	Cco
284	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Psaj
286	<i>Polyporus squamosus</i>	Psq
291	<i>Postia placenta</i>	Ppi
292	<i>Microporus affinis</i>	Maf
293	<i>Ustilago maydis</i>	Uma
295	<i>Agaricus bisporus</i>	Abi
299	<i>Hypholoma sublateritium</i>	Hsu
300	<i>Lentinus strygosus</i>	Lst
305	<i>Trametes gibosa</i>	Tgi
308	<i>Trametes hirsuta</i>	Thi
309	<i>Rhizoctonia solani</i>	Rso
311	<i>Hymenochaete rubiginosa</i>	Hru
312	<i>Asterostroma cervicolor</i>	Ace
314	<i>Phellinus pini</i>	Ppi
315	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pch

5.2 Methoden

5.2.1 Screening nach waschaktiven α -Amylasen

5.2.1.1 Kultivierung der Basidiomycota

Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C. Die Pilze wurden zunächst auf festem SNL-Medium (Tabelle 5.2), welchem 1,5 % (w/v) Agar-Agar hinzugesetzt wurde, kultiviert. Für das Screening wurde die im Medium enthaltene Glucose durch Stärke ersetzt. Nach dem Übersetzen eines ein cm² großem Mycelstücks auf das stärkehaltige Medium erfolgte eine erneute Kultivierung, bis die Mediumoberfläche ca. 75 % bewachsen war. Das Screening erfolgte in der submers-Kultivierung. Dafür wurden 125 mL stärkehaltiges SNL-Medium in einem 300 mL Erlenmeyer Kolben überführt und ein cm² Pilzmycel wurde in dem Medium homogenisiert. Die anschließende Kultivierung erfolgte bei 24 °C und 150 UpM.

5.2.1.2 Assay zur Aktivitätsbestimmung

Als Substrat für die Bestimmung der Amylase-Aktivität diente Stärke nach Zulkowsky (Merck, CAS-Nr. 9005-84-9). Diese wurde mit einer Konzentration von 1 % (w/v) in 20 mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 7) gelöst. 100 μ L Substrat wurden 50 μ L Enzym hinzugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 100 μ L DNSA-Lösung (12 g Natrium-Kalium-Tartrat, 8 mL 2 M NaOH, 96 mM 3,5-Dinitrosalicylsäure, 12 mL H₂O (Miller, 1959)) sowie einer Inkubation von 20 min bei 80 °C gestoppt. Die Absorption wurde anschließend bei 540 nm gemessen.

5.2.1.3 Waschtests

Der Waschtest wurde mit standardisiert verschmutzten Lämpchen (C-27-048, Center for Test Materials B.V., Vlaardingen, Niederlande) durchgeführt. Die Stoffe wurden ausgestanzt und nach der Überführung in eine Mikrotiterplatte mit Detergenz und Enzymlösung inkubiert. Die Endkonzentration der enzymfreien Waschmittelmatrix betrug 4,58 g L⁻¹. Das Detergenz wurde zum einen in destilliertem Wasser angesetzt oder direkt im angegebenen Puffer verdünnt. Die Inkubation erfolgte stets bei 350 UpM für 16 h bei 30 °C oder für 1 h bei 40 °C. Nach dem Waschvorgang wurden die Stoffe mit destilliertem Wasser gespült und im Dunklen bei 37 °C getrocknet. Danach erfolgten die visuelle Bewertung sowie die Messung mit einem Farbmessgerät (ColorLite sph900, ColorLite GmbH, Katlenburg-Lindau).

5.2.1.4 Reinigung der waschaktiven Enzyme

Um die Konzentration der Enzyme in den Kulturüberständen zu erhöhen wurde diese mit Centricons® Plus-70 (MWCO 10000, Merck Millipore, Darmstadt) bei $3500 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert.

Für die Reinigung der waschaktiven Enzyme mittels Ionenaustauschchromatografie wurden zuvor die isoelektrischen Punkte (pI) der Amylasen bestimmt. Der pI wurde mit analytischer IEF mit anschließender *Overlay*-Zymografie ermittelt. Dazu wurden die Kulturüberstände auf IEF-Gele gegeben (SERVALYT™ PRECOTES™ gels (pH 3-10), SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) und mit der HPE™ BlueHorizon™ elektrophoretisch getrennt. Die Auftrennung erfolgte bei max 2000 V, 20 mA und 3500 Vh bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Auftrennung erfolgte für vier bis fünf Stunden. Wurden die Proben neben dem Marker im Schmetterlings-Stil aufgetragen, konnte das Gel geteilt werden und eine Hälfte mit Coomassie G für eine Stunde gefärbt werden. Die andere Hälfte wurde mit 1 %iger stärkehaltiger Agarose (1 % (w/v)) überzogen. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei RT wurde die Zymografie mit Lugol'scher Lösung gefärbt und die pI der stärkeabbauenden Enzyme bestimmt.

Die Auftrennung der unbekanntenen Amylasen wurde mit der Ionenaustauschchromatografie durchgeführt. Aufgrund der erhaltenen sauren pI wurden ein starker Anionenaustauscher (1 mL QXL) und ein schwacher Anionenaustauscher (1 mL DEAE) getestet. Beide stammen von GE Healthcare, Chalfont St Gilles. Die Säulen wurden mit einem NGC™ Chromatographiesystem (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, CA USA) und der dazugehörigen ChromLap™ Software verbunden.

Die verwendete Methode teilt sich in die Schritte Equilibrierung, Probenauftrag, Waschen und Elution auf. Alle Schritte wurden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem konstanten Fluss von 1 mL pro Minute durchgeführt. Alle Proben dieser Methode wurden in 3 mL Fraktionen gesammelt und bis zur weiteren Analyse bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die initiale Equilibrierung wurden die Säulen mit 5 mL Puffer A (20 mM Bis-Tris, pH 7) gespült. Es folgte der Probenauftrag mit bis zu 10 ml gepufferter Enzymlösung. Um nicht bindende Proteine zu entfernen folgte ein Waschschritt mit 21 mL Puffer A. Die Elution erfolgte mit der schrittweisen Erhöhung von Puffer B (20 mM Bis-Tris, 1 M NaOH, pH 7): 0 bis 5 % (18 ml), 10 % (21 ml), 20 % (21 ml), 30 % (12 ml), 50 % (9 ml), 70 % (9 ml) und 100 % (15 ml). Das in Klammern angegebene Volumen bezieht sich auf die Puffermenge mit der die Säule bei jedem Schritt gespült wurde.

5.2.1.5 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) denaturierend oder semi-nativ durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sowie die Zusammensetzung der Gele sind der Tabelle 5.9 und der Tabelle 5.10 zu entnehmen. Für die semi-native PAGE wurde auf die Zugabe von SDS in den Gelen verzichtet. Die Proben wurde 1:1 mit dem jeweiligen Ladepuffer versetzt. Bei der denaturierenden SDS-PAGE wurden die Proben nach der Zugabe des Ladepuffers für 10 min bei 95 °C inkubiert. Das aufgetragene Volumen sowie die gemessene Proteingesamtkonzentration und die Auftrennungskonditionen sind den jeweiligen Ergebnissen zu entnehmen. Die Proteinbanden wurden im Anschluss an die Auftrennung mittels Instant Blue (Expedeon, Cambridgeshire, Großbritannien) angefärbt. Die Bestimmung der molekularen Massen der Proteine erfolgte anhand des *Precision Plus Protein Standard* (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien) und dem linearen Zusammenhang der relativen Auftrennungsstrecke zur logarithmierten molekularen Masse.

Tabelle 5.9 Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung für die SDS-PAGE.

Lösung	Komponente	Konzentration
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat	0,4 g L ⁻¹ (1,75 mM)
Elektrophorese- Laufpuffer	Tris	3,02 g L ⁻¹ (25 mM)
	Glycin	14,42 g L ⁻¹ (192 mM)
Probenpuffer (nativ bzw. denaturierend, 2fach konzentriert)	SDS	1,0 g L ⁻¹ (3,5 mM)
	Tris-HCl pH 6,8	23,64 g L ⁻¹ (150 mM)
	Dithiothreitol (im denaturierenden Puffer)	30,85 g L ⁻¹ (200 mM)
	Glycerol	20 % (v/v)
	SDS	40 g L ⁻¹ (139 mM)
	Bromphenolblau	25 mg L ⁻¹

Tabelle 5.10 Zusammensetzung der SDS-Gele.

Komponente	Trenngel	Sammelgel
ddH ₂ O	2,15 mL	1,45 mL
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	1,5 mL	243,5 µL
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 mL	
1,5 M Tris pH 6,8		250 µL
10 % (w/v) SDS	50 µL	20 µL
APS-Lösung	13 µL	10 µL
TEMED	4 µL	4 µL

Um eine höhere Sensitivität zu erreichen, wurden Gele silbergefärbt. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in der Tabelle 5.11 dargestellt. Die Entwicklungszeit der Gele ist den jeweiligen Abbildungsunterschriften zu entnehmen.

Tabelle 5.11 Zusammensetzung der Lösungen der Silberfärbung.

Lösung	Zusammensetzung
Lösung 1	30 % Ethanol 10 % Essigsäure
Lösung 2	20 % Ethanol
Lösung 3	20 mg Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O in 100 mL H ₂ O
Lösung 4	200 mg AgNO ₃ in 100 mL H ₂ O
Lösung 5	3 g Na ₂ CO ₃ 25 µL Formaldehyd 1,25 mg Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O
Lösung 6	50 mL 8 % Tris 50 mL 4 % Essigsäure

5.2.1.6 Zymografie

Für die Zymografien wurden die Gele wie in 5.2.1.5 beschrieben semi-nativ vorbereitet. Zusätzlich wurde in die Gele 1 % (w/v) Stärke nach Zulkowsky polymerisiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 4 °C und 10 mA wurden die Gele in Phosphat-Puffer bei pH 7 für 4 h bei 30 °C inkubiert. Zur Visualisierung der Amylasen wurde die Stärke im Gel mit Lugol'scher Lösung gefärbt. Bereiche, welche sich nicht färbten, weisen dabei auf eine vollzogene Stärkehydrolyse hin.

5.2.1.7 Proteinidentifizierung mittels ESI-MS/MS

Nach der IEX und der SDS-PAGE wurden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten. Sie wurden mit 30 % EtOH bei 60 °C für 10 min entfärbt. Es erfolgte eine tryptische Hydrolyse und die daraus resultierenden Peptide wurden extrahiert und gereinigt.

Die Sequenzierung erfolgte anschließend mittels Nano-LC-QTOF MS/MS (maXis impact, Bruker Daltronik). Vor der eigentlichen MS-Messung wurde eine Flüssigchromatografie mit einer EASY nLC II mit Autosampler (Bruker Daltronik, Bremen) durchgeführt. Es wurden folgende Komponenten und Bedingungen gewählt: C18-A1 3PCS-Vorsäule (Thermo Fisher Scientific, Bremen), CP3-61271-00 0,1 mm × 150 mm Magic C18AQ 3 μ 200 Å (Michrom Bioresources, Inc., Auburn, CA). Die Chromatografiebedingungen waren dabei Eluent A: ddH₂O + 0,1 % (v/v) Ameisensäure und Eluent B: ACN + 0,1 % (v/v) Ameisensäure bei einem Fluss von 500 nL min⁻¹ und einem Gradienten von 0 min 95 % A, 25 min 5 % A, 40 min 5 % A.

Die Ionisierung erfolgte im ESI⁺-Modus. Es wurden vorzugsweise mehrfach geladene Precursor-Ionen in einem Massenbereich von *m/z* 400 bis 1400 ausgewählt und anschließend mittels CID (collision induced dissociation) fragmentiert. Die Datenaufnahme der MS und MS/MS-Spektren erfolgte mit OTOF Control 1.5 (Bruker Daltronik) und die Auswertung der Spektren mit DataAnalysis 4.1 und ProteinScape 3.0 (Bruker Daltronik). Für die Peptiddatenbanksuche wurde der Mascot Algorithmus verwendet (Mascot 2.4.0 search engine, Matrix Science) Die Suche erfolgte in den wöchentlich aktualisierten Proteindatenbanken SWISSPROT und NCBI auf einen Inhouse Mascotserver). Folgende Parameter wurden für die Auswertung eingegeben: globale Modifikationen, Carbamidomethylierung (variabel); Oxidation (M, Variable), eine erlaubte Fehlsplattstelle; Vorläuferionenmassentoleranz: 10 ppm; Fragmentionen-Massentoleranz, 0,05 Da; Peptid-Ladung, 1⁺, 2⁺, 3⁺; Mindestpeptidlänge, 4; Mascot Score > 50.

5.2.1.8 Analyse der Hydrolyseprodukte

Für die Analyse der Produkte aus der Stärkehydrolyse wurden 800 μL 1 %ige Stärke mit 200 μL Enzymmischung der angegebenen Aktivität für eine Stunde bei 40 °C und 350 UpM inkubiert. Es folgte eine Probenahme nach 20 und 60 min, welche bei 80 °C für zehn min inaktiviert wurden. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mittels 0,45 μm Cellulose-Acetat-Filter filtriert. In allen Experimenten wurde das HPLC-System bestehend aus einem binären Pumpensystem (Agilent 1200, Agilent Technologies, Waldbronn), einem Triathlon-

Autosampler (Spark Holland, Emmen, Niederlande), einem Säulenofen, sowie einem Corona CAD-Detektor (ESA Biosciences) und einem LaChrom L-7490 RI-Detektor (Merck) verwendet. Es wurde die Merck Polyspher Na 300x7.8 Säule verwendet. Die Chromatographie erfolgte mit Wasser als Eluenten bei einem Fluss von $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ und bei $85 \text{ }^\circ\text{C}$. Injiziert wurde jeweils ein Volumen von $20 \text{ }\mu\text{L}$.

5.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

5.2.2.1 Anlegen einer Flüssigkultur von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (Tabelle 5.2). Dieses wurde mit einem nach der bakteriell vorliegenden Resistenz gewählten, selektierendem Antibiotikum versetzt (Tabelle 5.3). Für das Animpfen einer Kultur wurden verschiedene Volumina verwendet. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 UpM .

5.2.2.2 Bestimmung der OD_{600}

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde mittels des BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Zur Nullwertbestimmung diente das Medium, in welchem die Bakterien jeweils angezogen wurden. Die Messung erfolgte mittels einer Bestrahlung von 1 mL Bakterienkultur mit einer Wellenlänge von 600 nm .

5.2.2.3 Anlegen einer Dauerkultur von *E. coli*

Um eine langfristige Lagerung von Bakterienkulturen zu gewähren, wurde eine Glyceroldauerkultur angelegt. Dazu wurde eine Flüssigkultur bis zu einer OD_{600} von $0,8$ bis $0,9$ (5.2.2.2) angezogen. Unter sterilen Bedingungen wurden $750 \text{ }\mu\text{L}$ der Bakterienkultur mit $250 \text{ }\mu\text{L}$ $86 \text{ }\%$ igem Glycerin versetzt, gevortext und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.2.2.4 Herstellen chemisch kompetenter *E. coli*

Alle folgenden Arbeitsschritte, die ein Öffnen von Reaktionsgefäßen beinhalteten, wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien wurden zunächst 50 mL Medium mit 1 mL einer Übernachtskultur angeimpft. Es folgte eine Kultivierung bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 UpM bis eine OD_{600} von $0,3$ bis $0,4$ erreicht wurde. Die Hauptkultur wurde auf zwei 50 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt und für 10 min bei $5000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets

wurden je in 12,5 mL 100 mM CaCl₂ aufgenommen und gevortext. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 5000 × g und 4 °C, wobei nach dieser der Überstand wiederum verworfen wurde. Die Bakterienpellets wurden in 2,5 mL kaltem 100 mM CaCl₂ aufgenommen. Es folgte eine einstündige Lagerung auf Eis. Abschließend wurden 436 µL 86% Glycerin hinzugegeben, invertiert und in 1,5 mL Reaktionsgefäße mit je 50 µL Bakterien-Glycerin-Lösung aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

5.2.2.5 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* Zellen verwendet (5.2.2.4). Diese wurden auf Eis aufgetaut. Es sollte entweder ein Plasmid oder ein Ligationsansatz in die Zellen gebracht werden. Dazu wurde 1 µL eines Plasmids oder 2 µL bzw. 5 µL eines Ligationsansatzes auf 50 µL kompetente Zellen gegeben. Der jeweilige Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend ruhten die Zellen 2 min auf Eis, bevor zu jedem Ansatz 500 µL auf 30 °C vorgewärmtes LB-Medium (Tabelle 5.2) hinzugegeben wurde. Es folgte eine 45 minütige Inkubation bei 37 °C und 180 UpM, ehe der komplette Ansatz auf Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert wurde. Abschließend wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert.

5.2.2.6 Kolonie-PCR

Die Durchführung einer Kolonie-PCR ermöglicht eine Überprüfung hinsichtlich potentiell positiver Klone in Bezug auf die einzubringende DNA.

Dafür wurden unter sterilen Bedingungen Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze auf eine Masterplatte übertragen. Anschließend wurden Koloniereste von der Pipettenspitze in ein mit 10 µL demineralisiertem Wasser befülltes 0,2 mL Reaktionsgefäß aufgenommen. Nach einer zehnminütigen Inkubation der Kolonien bei 95 °C wurden die Bakteriensuspensionen in einer Perfect Spin Mini Zentrifuge mit 2000 x g für 20 s abzentrifugiert. Für den PCR-Ansatz (Tabelle 5.12) wurden 2 µL des Überstandes verwendet.

Tabelle 5.12 Zusammensetzung der Kolonie-PCR.

Reagenz	Volumen
10 x DreamTaq Reaction Buffer	2 μ l
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	1,6 μ L
Primer (10 μ M)	0,5 μ L
Primer (10 μ M)	0,5 μ L
DreamTaq DNA Polymerase (5 U μ L ⁻¹)	0,2 μ L
Bakteriensuspension	2 μ l
H ₂ O	ad 20 μ L

Tabelle 5.13 Temperaturprofil der Kolonie-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
Initiale Denaturierung	95	60	
Denaturierung	95	30	} \times 35
Primer-Anlagerung	x	30	
Elongation	72	60 / kb	
Finale Elongation	72	600	

5.2.2.7 Aufreinigung von DNA aus Plasmidpräparation und nach enzymatischen Reaktionen

Die Plasmidpräparationen erfolgten ausschließlich aus *E. coli*. Für Klonier- und Sequenzierungsarbeiten sowie für Kontrollversuche, wie die Linearisierung durch Restriktionsendonukleasen, wurde die Plasmid-DNA mittels *innuPREP Plasmid Kit 2.0*-System (Analytik Jena, Jena) gereinigt. Für die DNA Aufreinigung nach enzymatischen Reaktionen, wie PCR oder Restriktionsverdau, wurde das *innuPREP DOUBLEpure Kit* von Analytik Jena (Jena) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Lediglich die Elution erfolgte in unterschiedlichen Volumina.

5.2.2.8 Horizontale Gelelektrophorese

Um DNA Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden diese mittels horizontaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden entweder 1 %ige oder 0,8 %ige Agarosegele angefertigt. Für die Herstellung der Agarosegele wurde die Agarose in 1 \times TAE-Puffer (Tabelle 5.1) aufgekocht und anschließend polymerisiert. Wurde RotiSafe™ (Tabelle 5.1)

verwendet, musste dies vor dem Polymerisieren des Gels hinzugegeben werden. Als Laufpuffer wurde ebenfalls $1 \times$ TAE-Puffer verwendet.

5.2.2.9 Mengenbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren musste zum einen für Klonierungsschritte sowie für Sequenzierungen bestimmt werden. Die Messung erfolgte mittels Eppendorf BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Hamburg). Für die Messung wurden $1,5 \mu\text{L}$ der gelösten DNA eingesetzt. Die Messung der Probe erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Des Weiteren wurden die Absorptionen bei 230 nm und 280 nm gemessen. Die Quotienten aus den beiden Absorptionswerten mit dem Wert der Messung bei 260 nm geben einen Rückschluss auf den Grad der Verunreinigung der Probe.

5.2.2.10 Amplifizierung der Zielgene (*gene fishing*)

Für die Isolierung der mRNA wurden 200 mg Mycel aus der Submerskultivierung mittels Zentrifugation vom Kulturüberstand getrennt.

Die Isolierung der RNA wurde mit dem *innuSPEED Bacteria/Fungi RNA Kit* (Analytik Jena) nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die anschließende Synthese der cDNA erfolgte mit der *FastGene Reverse Transcriptase* (Nippon genetics) mit einem 3' oligo dT Primer. Die Synthese wurde nach dem Standardprotokoll bei $48 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Alle anschließenden PCRs wurden mit der *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo scientific) durchgeführt (Tabelle 5.14, Tabelle 5.15). Die PCR-Produkte wurden, wie in 5.2.2.7 beschrieben, gereinigt und für 12 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ in pUC57-Vektor kloniert, welcher mittels *EcoRV* linearisiert wurde.

Tabelle 5.14 Zusammensetzung der PCR.

Reagenz	Volumen
5 x HF Reaction Buffer	5 μ l
dNTP-Mix (je 2,5 mM)	1,6 μ L
Primer (10 μ M)	1 μ L
Primer (10 μ M)	1 μ L
Phusion DNA Polymerase (5 U μ L ⁻¹)	0,2 μ L
cDNA	1 μ l
H ₂ O	ad 20 μ L

Tabelle 5.15 Temperaturprofil der PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	
Initiale Denaturierung	98	30	
Denaturierung	98	10	} × 35
Primer-Anlagerung	x	30	
Elongation	72	30 / kb	
Finale Elongation	72	300	

5.2.2.11 Bioinformatische Arbeiten

Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurden die in der Tabelle 5.16 aufgelisteten Programme und Web Tools verwendet.

Tabelle 5.16 verwendeten Programme und Web Tools für bioinformatische Arbeiten.

Software	Anbieter	Verwendung
SnapGene 4.1	GSL Biotech	Visualisierung, Aufbereitung von Vektorkarten, Primerdesign, <i>in silico</i> -Klonierung
Intas 3.39.2	INTAS Science Imaging Instruments GmbH	Geldokumentation
Blast	National Center for Biotechnology Information	Sequenzanalyse
LAlign	h.EMBnet.org	Alignment von Sequenzen
Clustal omega	https://www.ebi.ac.uk	Alignment von Sequenzen
I-TASSER	University of Michigan	Protein-Strukturvorhersage
UCFS Chimera 1.11.2	University of California	Visualisierung Proteinstrukturen

5.2.3 Expressionsversuche in *K. phaffii*

Die Expressionskonstrukte wurden auf Basis der pPIC9 und des pHIL-S1 Vektorsystems erstellt. Dafür wurde den Vorwärtsoligonukleotiden am 5' Ende die Sequenz der Restriktionsschnittstelle *EcoRI* und dem Rückwärtsoligonukleotid für die Sequenz der Restriktionsschnittstelle *NotI* am 5' Ende angehängt. Zusätzliche wurden allen Oligonukleotiden vor den Restriktionsschnittstellen die Überhänge GAAT hinzugefügt. Nach der Plasmidisolation (5.2.2.7) wurde diese entweder mit *SacI* oder *AvrII* linearisiert und gereinigt. Für die Transformation wurde jeweils 1 µg linearisiertes Plasmid (5.2.2.9) verwendet.

Kompetente *K. phaffii*-Zellen wurden mit einer Elektroporation von 2000 V für 5 ms (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad, Hercules, Kalifornien) entsprechend dem Protokoll von Lin-Cereghino *et al.* (2005) transformiert. Die Selektion erfolgte auf His⁻-Platten, welche für 48 bis 72 h bei 28 °C inkubiert wurden.

Das Screening der *K. phaffii*-Transformanten wurde in 96-*deep-well*-Platten durchgeführt. Für die Vorkultur wurden die Zellen einzeln in die Vertiefungen der Platte überführt und in 600 µL YPD-Medium bei 28 °C und 320 UpM für 72 h kultiviert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 2000 × g wurden das Medium entfernt und durch 600 µL BMMY mit 1 % (v/v) Methanol ersetzt. Die Zellen wurden für 96 h bei 20 °C und 320 UpM kultiviert. Für die tägliche Probenahme wurden die Zellen wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach der Entnahme der Probe wurde den Zellen frisches Medium mit 1 % (v/v) Methanol hinzugefügt.

5.2.4 CRISPR/Cas9

Für die CRISPR-Experimente wurde der *A. oryzae* Stamm NSAR1 gewählt. Dabei handelt es sich um eine vierfach auxotrophe Mutante (*niaD*⁻, *sC*⁻, *argB*⁻, *adeA*⁻). Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

5.2.4.1 Kultivierung und Lagerung von *A. oryzae*

Die kurzzeitige Lagerung des Stammes erfolgte auf DPY-Platten (20 g L⁻¹ Dextrin aus Kartoffelstärke, 10 g L⁻¹ Polypepton, 5 g L⁻¹ Hefeextrakt, 5 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0,5 g L⁻¹ MgSO₄, 20 g L⁻¹ Agar-Agar). Die Platten wurden für sechs bis acht Tage bei 28 °C inkubiert und danach bei 4 °C gelagert. Für die Langzeitlagerung wurden Konidien einer bewachsenen Masterplatte in 2-3 mL Wasser suspendiert und zu gleichen Teilen mit 70 %igem sterilen

Glycerin vermischt und mit flüssigem Stickstoff gefroren, Die Lagerung erfolgte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Für Transformationen bzw. erneute Kultivierung der bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Proben wurden $250\text{ }\mu\text{L}$ der Glycerolkultur auf DPY-Platten ausplattiert und bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ für sechs Tage kultiviert.

5.2.4.2 Transformation von *A. oryzae* und Selektion der Transformanten

Für die Transformation wurden Konidien von bewachsenen und sporulierenden DPY-Platten in 50 mL GN-Medium überführt (20 g L^{-1} Glucose, 10 g L^{-1} Fleischextrakt, 5 g L^{-1} Hefeextrakt, 10 g L^{-1} NaCl, pH 7,5) und über Nacht bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Schikanekolben schüttelnd inkubiert. Die gekeimten Konidien wurden mit einer sterilen Gaze (Miracloth, Merck Millipore) gefiltert. Anschließend erfolgte die Protoplastierung. Dazu wurden die gefilterten Konidien in 10 mL Protoplastierungslösung (10 mg mL^{-1} *Lysing Enzymes from Trichoderma harzianum*, Sigma Aldrich L1412) aufgenommen und in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation von 3 h bei RT und unter leichtem Schwenken, wurden die Protoplasten wiederum filtriert. Das Filtrat wurde bei $3000 \times g$ für 5 min zentrifugiert, um die Protoplasten zu pelletieren. Die Protoplasten wurden schrittweise in Lösung 1 ($0,8\text{ M}$ NaCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) resuspendiert. Die Konzentration und die Qualität der Protoplasten wurden mikroskopisch überprüft. Pro Transformationsansatz wurden $100\text{ }\mu\text{L}$ der Protoplasten mit $5\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 mL Lösung 2 (60% (w/v) PEG 4000, $0,8\text{ M}$ NaCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) und eine erneute Inkubation bei RT für 20 min . Der Transformationsansatz wurde in 5 mL geschmolzenem Top-Medium CZD/S (30 g L^{-1} Saccharose, 1 g L^{-1} K₂HPO₄, $0,5\text{ g L}^{-1}$ KCl, 3 g L^{-1} NaNO₃, $0,5\text{ g L}^{-1}$ MgSO₄, $0,01\text{ g L}^{-1}$ FeSO₄, 1 M Sorbitol, $0,5\text{ g L}^{-1}$ Adenin, $1,5\text{ g L}^{-1}$ Methionin, 1 g L^{-1} (NH₄)₂SO₄, 8 g L^{-1} Agar-Agar) aufgenommen und auf CZD/S-Platten (30 g L^{-1} Saccharose, 1 g L^{-1} K₂HPO₄, $0,5\text{ g L}^{-1}$ KCl, 3 g L^{-1} NaNO₃, $0,5\text{ g L}^{-1}$ MgSO₄, $0,01\text{ g L}^{-1}$ FeSO₄, 1 M Sorbitol, $0,5\text{ g L}^{-1}$ Adenin, $1,5\text{ g L}^{-1}$ Methionin, 1 g L^{-1} (NH₄)₂SO₄, 15 g L^{-1} Agar-Agar) überführt. Nach einer Inkubation bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ für bis zu fünf Tage wurden die Transformanten auf neue CZD/S-Platten überführt und vereinzelt. Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt.

5.2.4.3 Vektordesign und Verifizierung von CRISPR-Ereignissen

Sowohl der Vektor als auch die experimentelle Durchführung wurden von Nødvig *et al.* (2015) adaptiert. Der verwendete Vektor (Abbildung 5.5) trägt eine HygromycinB-Resistenz, um die Transformanten zu selektieren. Die Cas9-Endonuklease ist für *Aspergillus niger* Codon-optimiert. Die *guide* RNA (sgRNA) ist dahin gehend optimiert, dass diese an den

Enden *Loop*-Strukturen (*hammerhead structures*) ausbildet, welche von Ribozymen erkannt und prozessiert werden. Der Expressionsvektor muss im Bereich des Protospacers an die Zielsequenz angepasst werden.

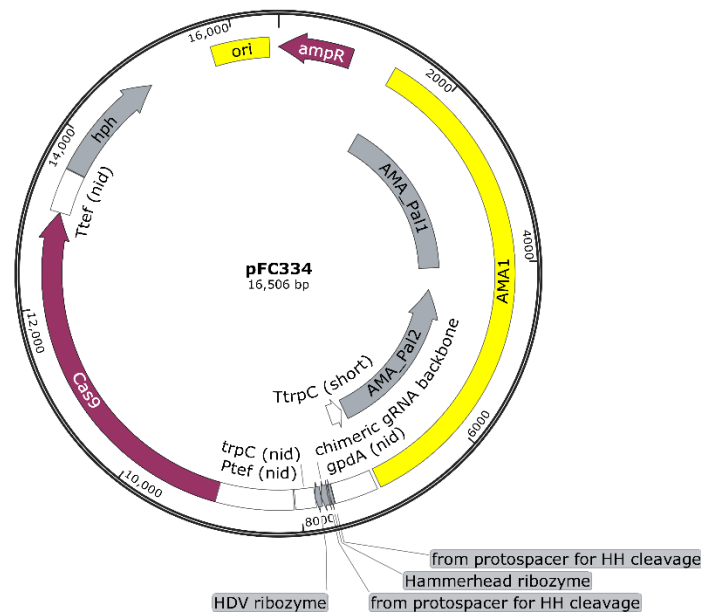


Abbildung 5.5 pFC334 Vektor. Hervorgehoben sind die Bereiche des *Protospacers* und die strukturgebenden Sequenzbereiche der *guide* RNA.

Für die Vorhersage der Protospacer-Sequenz wurde die Software E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>) verwendet. Da zum Zeitpunkt des Versuchs kein *A. oryzae* Genom zur Verfügung stand, wurde das Genom von *A. niger* (*Aspergillus niger* CADRE.31) als Grundlage verwendet. Zwei vorgeschlagene Protospacer-Sequenzen konnten für das Gen der wirtseigenen α -Amylase verwendet werden, sodass zwei Vektorkonstrukte erstellt wurden. Die verwendeten Oligonukleotide waren zum einen 5' GCGGACTGGCGATCGCAATCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCT 3' und 5' GACGAGCTTACTCGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGGCGACCGGTGATGTCTGCTCAAGCGGGGT 3' sowie für das zweite Konstrukt 5' GAGATGCCTACCATGGCTACGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCT 3'. Die Protospacer-Sequenzen sind unterstrichen markiert. Die PCR-Bedingungen, die anschließende Phosphorylierung sowie Ligation und Transformation der *E. coli*-Zellen wurden der zweiten EMP-Klonierung von Ulrich *et al.* (2012) angepasst.

Nach der Transformation und Selektion (5.2.4.2) wurde gDNA isoliert und mittels PCR das Zielgen amplifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide 5' GATTCTGCTGTCTCGGCT 3' und 5' ATATCGTGCCTCTCCTGC 3' verwendet. Die PCR Produkte (5.2.2.10) wurden

gereinigt (5.2.2.7) und extern sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse wurden in SnapGene an das Zielgen *alignt*, um Deletionen zu identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

- Adli M. (2018) The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature communications*, **9**, 1911. DOI: 10.1038/s41467-018-04252-2.
- Ahmad M., Hirz M., Pichler H. & Schwab H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, **98**, 5301–5317. DOI: 10.1007/s00253-014-5732-5.
- Ahuja S.K., Ferreira G.M. & Moreira A.R. (2004) Utilization of enzymes for environmental applications. *Critical reviews in biotechnology*, **24**, 125–154. DOI: 10.1080/07388550490493726.
- Arana-Cuenca A., Roda A., Téllez A., Loera O., Carbajo J.M., Terrón M.C. & González A.E. (2004) Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related Polyporaceae species under different culture conditions. *Journal of basic microbiology*, **44**, 79–87. DOI: 10.1002/jobm.200310324.
- Baranova M.A., Logacheva M.D., Penin A.A., Seplyarskiy V.B., Safonova Y.Y., Naumenko S.A., Klepikova A.V., Gerasimov E.S., Bazykin G.A., James T.Y. & Kondrashov A.S. (2015) Extraordinary Genetic Diversity in a Wood Decay Mushroom. *Molecular biology and evolution*, **32**, 2775–2783. DOI: 10.1093/molbev/msv153.
- Behrens C.J., Linke D., Allister A.B., Zelena K. & Berger R.G. (2017) Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, **137**, 34–42. DOI: 10.1016/j.pep.2017.06.014.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N. & Bourne P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic acids research*, **28**, 235–242.
- Binder M., Justo A., Riley R., Salamov A., Lopez-Giraldez F., Sjökvist E., Copeland A., Foster B., Sun H., Larsson E., Larsson K.-H., Townsend J., Grigoriev I.V. & Hibbett D.S. (2013) Phylogenetic and phylogenomic overview of the *Polyporales*. *Mycologia*, **105**, 1350–1373. DOI: 10.3852/13-003.
- Blackwell M. (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American journal of botany*, **98**, 426–438. DOI: 10.3732/ajb.1000298.
- Bolhassan M.H. (2013) Diversity of *Polyporales* in the Malay Peninsular and the application of *Ganoderma australe* (Fr.) Pat. in biopulping of empty fruit bunches of *elaeis guineensis*.

- Bouws H., Wattenberg A. & Zorn H. (2008) Fungal secretomes--nature's toolbox for white biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, **80**, 381–388. DOI: 10.1007/s00253-008-1572-5.
- Brayer G.D., Sidhu G., Maurus R., Rydberg E.H., Braun C., Wang Y., Nguyen N.T., Overall C.M. & Withers S.G. (2000) Subsite mapping of the human pancreatic alpha-amylase active site through structural, kinetic, and mutagenesis techniques. *Biochemistry*, **39**, 4778–4791.
- Chen W., Xie T., Shao Y. & Chen F. (2012) Phylogenomic relationships between amylolytic enzymes from 85 strains of fungi. *PloS one*, **7**, e49679. DOI: 10.1371/journal.pone.0049679.
- Christiansen C., Abou Hachem M., Janecek S., Viksø-Nielsen A., Blennow A. & Svensson B. (2009) The carbohydrate-binding module family 20--diversity, structure, and function. *The FEBS journal*, **276**, 5006–5029. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07221.x.
- Clark T.A. & Anderson J.B. (2004) Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*: Evolution in long-term culture. *Genetics*, **167**, 1663–1675. DOI: 10.1534/genetics.104.027235.
- Clarke R., Heler R., MacDougall M.S., Yeo N.C., Chavez A., Regan M., Hanakahi L., Church G.M., Marraffini L.A. & Merrill B.J. (2018) Enhanced Bacterial Immunity and Mammalian Genome Editing via RNA-Polymerase-Mediated Dislodging of Cas9 from Double-Strand DNA Breaks. *Molecular cell*, **71**, 42-55.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.06.005.
- Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y. & Madden K.R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and cellular biology*, **5**, 3376–3385.
- Da Lage J.-L., Feller G. & Janecek S. (2004) Horizontal gene transfer from Eukarya to bacteria and domain shuffling: The alpha-amylase model. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **61**, 97–109. DOI: 10.1007/s00018-003-3334-y.
- Dhital S., Warren F.J., Butterworth P.J., Ellis P.R. & Gidley M.J. (2017) Mechanisms of starch digestion by α -amylase-Structural basis for kinetic properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, **57**, 875–892. DOI: 10.1080/10408398.2014.922043.
- Ding Y., Liang S., Lei J., Chen L., Kothe E. & Ma A. (2011) *Agrobacterium tumefaciens* mediated fused egfp-hph gene expression under the control of gpd promoter in *Pleurotus ostreatus*. *Microbiological research*, **166**, 314–322. DOI: 10.1016/j.micres.2010.07.001.

- Dolan M.A., Noah J.W. & Hurt D. (2012) Comparison of common homology modeling algorithms: Application of user-defined alignments. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), **857**, 399–414. DOI: 10.1007/978-1-61779-588-6_18.
- Elleuche S. (2015) Bringing functions together with fusion enzymes--from nature's inventions to biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, **99**, 1545–1556. DOI: 10.1007/s00253-014-6315-1.
- Erjavec J., Kos J., Ravnikar M., Dreo T. & Sabotič J. (2012) Proteins of higher fungi--from forest to application. *Trends in biotechnology*, **30**, 259–273. DOI: 10.1016/j.tibtech.2012.01.004.
- Fiers M., Edel-Hermann V., Héraud C., Gautheron N., Chatot C., Le Hingrat Y., Bouček-Mechiche K. & Steinberg C. (2011) Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* associated with potato tubers in France. *Mycologia*, **103**, 1230–1244. DOI: 10.3852/10-231.
- Freer S.N. (1993) Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase from *Streptococcus bovis* JB1. *Applied and environmental microbiology*, **59**, 1398–1402.
- Gaubert A., Jeudy J., Rougemont B., Bordes C., Lemoine J., Casabianca H. & Salvador A. (2016) Identification and absolute quantification of enzymes in laundry detergents by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **408**, 4669–4681. DOI: 10.1007/s00216-016-9550-8.
- Gilis D. (2006) *In silico* analysis of the thermodynamic stability changes of psychrophilic and mesophilic alpha-amylases upon exhaustive single-site mutations. *Journal of chemical information and modeling*, **46**, 1509–1516. DOI: 10.1021/ci050473v.
- Gopinath S.C.B., Anbu P., Arshad M.K.M., Lakshmipriya T., Voon C.H., Hashim U. & Chinni S.V. (2017) Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed research international*, **2017**, 1272193. DOI: 10.1155/2017/1272193.
- Govindappa N., Hanumanthappa M., Venkatarangaiah K., Periyasamy S., Sreenivas S., Soni R. & Sastry K. (2014) A new signal sequence for recombinant protein secretion in *Pichia pastoris*. *Journal of microbiology and biotechnology*, **24**, 337–345.
- Guillén Y., Palfner G. & Machuca A. (2011) Screening for lignocellulolytic enzymes and metal tolerance in isolates of wood-rot fungi from Chile.
- Gupta R., Gigras P., Mohapatra H., Goswami V.K. & Chauhan B. (2003) Microbial α -amylases: A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, **38**, 1599–1616. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00053-0.
- Hameed U., Price I., Ikram-Ul-Haq, Ke A., Wilson D.B. & Mirza O. (2017) Functional characterization and crystal structure of thermostable amylase from *Thermotoga*

- petrophila*, reveals high thermostability and an unusual form of dimerization. *Biochimica et biophysica acta*, **1865**, 1237–1245. DOI: 10.1016/j.bbapap.2017.06.015.
- Hasan F., Shah A.A. & Hameed A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 235–251. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.
- Hatoh K., Izumitsu K., Morita A., Shimizu K., Ohta A., Kawai M., Yamanaka T., Neda H., Ota Y. & Tanaka C. (2013) Transformation of the mushroom species *Hypsizigus marmoreus*, *Flammulina velutipes*, and *Grifola frondosa* by an *Agrobacterium*-mediated method using a universal transformation plasmid. *Mycoscience*, **54**, 8–12. DOI: 10.1016/j.myc.2012.08.002.
- Hohenblum H., Gasser B., Maurer M., Borth N. & Mattanovich D. (2004) Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and bioengineering*, **85**, 367–375. DOI: 10.1002/bit.10904.
- Janecek S. (1994) Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal alpha-amylases. *European journal of biochemistry*, **224**, 519–524.
- Jia X., Guo Y., Lin X., You M., Lin C., Chen L. & Chen J. (2017) Fusion of a family 20 carbohydrate-binding module (CBM20) with cyclodextrin glycosyltransferase of *Geobacillus* sp. CHB1 improves catalytic efficiency. *Journal of basic microbiology*, **57**, 471–480. DOI: 10.1002/jobm.201600628.
- Kadam U.S., Shelake R.M., Chavhan R.L. & Suprasanna P. (2018) Concerns regarding 'off-target' activity of genome editing endonucleases. *Plant physiology and biochemistry : PPB*. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.03.027.
- Kelle S., Zelena K., Krings U., Linke D. & Berger R.G. (2014) Expression of soluble recombinant lipoxygenase from *Pleurotus sapidus* in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, **95**, 233–239. DOI: 10.1016/j.pep.2014.01.004.
- Kirk O., Borchert T.V. & Fuglsang C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 345–351.
- Koshland D.E. (1953) Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biological Reviews*, **28**, 416–436. DOI: 10.1111/j.1469-185X.1953.tb01386.x.
- Kossmann J. & Lloyd J. (2000) Understanding and Influencing Starch Biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **19**, 171–226. DOI: 10.1080/07352680091139204.
- Krupodorova T., Ivanova T. & Barshteyn V. (2014) Screening of extracellular enzymatic activity of macrofungi. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **2014**, 315–318.

- Kuriki T. & Imanaka T. (1999) The concept of the alpha-amylase family: Structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of bioscience and bioengineering*, **87**, 557–565.
- Kurtzman C.P. (2005) Description of *Komagataella phaffii* sp. nov. and the transfer of *Pichia pseudopastoris* to the methylotrophic yeast genus *Komagataella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **55**, 973–976. DOI: 10.1099/ijs.0.63491-0.
- Leonhardt R.-H., Krings U., Berger R.G. & Linke D. (2016) Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. *Bioprocess and biosystems engineering*, **39**, 845–853. DOI: 10.1007/s00449-016-1564-2.
- Li J.H., Vasanthan T., Hoover R. & Rosnagel B.G. (2004) Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. *Food Chemistry*, **84**, 621–632. DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00287-5.
- Li W. & Zhang Y.-z. (2005) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the white-rot basidiomycete, *phanerochaete chrysosporium*. *Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica*, **45**, 784–787.
- Lin S.-C., Lin I.-P., Chou W.-I., Hsieh C.-A., Liu S.-H., Huang R.-Y., Sheu C.-C. & Chang M.D.-T. (2009) CBM21 starch-binding domain: A new purification tag for recombinant protein engineering. *Protein expression and purification*, **65**, 261–266. DOI: 10.1016/j.pep.2009.01.008.
- Lin-Cereghino J., Wong W.W., Xiong S., Giang W., Luong L.T., Vu J., Johnson S.D. & Lin-Cereghino G.P. (2005) Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechniques*, **38**, 44, 46, 48.
- Linke D., Leonhardt R., Eisele N., Petersen L.M., Riemer S., Nimtz M. & Berger R.G. (2015) Carotene-degrading activities from *Bjerkandera adusta* possess an application in detergent industries. *Bioprocess and biosystems engineering*, **38**, 1191–1199. DOI: 10.1007/s00449-015-1361-3.
- Liszka M.J., Clark M.E., Schneider E. & Clark D.S. (2012) Nature versus nurture: Developing enzymes that function under extreme conditions. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, **3**, 77–102. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114239.

- Lombard V., Golaconda Ramulu H., Drula E., Coutinho P.M. & Henrissat B. (2014) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, **42**, D490-5. DOI: 10.1093/nar/gkt1178.
- Lottspeich F. & Engels J.W. (2012) *Bioanalytik*. Springer-Verlag.
- Lubertozzi D. & Keasling J.D. (2009) Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. *Biotechnology advances*, **27**, 53–75. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.09.001.
- MacGregor E.A., Janeček Š. & Svensson B. (2001) Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1546**, 1–20. DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00302-2.
- Machius M., Wiegand G. & Huber R. (1995) Crystal structure of calcium-depleted *Bacillus licheniformis* alpha-amylase at 2.2 Å resolution. *Journal of molecular biology*, **246**, 545–559. DOI: 10.1006/jmbi.1994.0106.
- Machovic M. & Janecek S. (2006) Starch-binding domains in the post-genome era. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **63**, 2710–2724. DOI: 10.1007/s00018-006-6246-9.
- Madhavan A., Sindhu R., Binod P., Sukumaran R.K. & Pandey A. (2017) Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. *Bioresource technology*, **245**, 1304–1313. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.031.
- Maestre-Reyna M., Liu W.-C., Jeng W.-Y., Lee C.-C., Hsu C.-A., Wen T.-N., Wang A.H.-J. & Shyur L.-F. (2015) Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp. *PloS one*, **10**, e0120601. DOI: 10.1371/journal.pone.0120601.
- Mehta D. & Satyanarayana T. (2013) Dimerization mediates thermo-adaptation, substrate affinity and transglycosylation in a highly thermostable maltogenic amylase of *Geobacillus thermoleovorans*. *PloS one*, **8**, e73612. DOI: 10.1371/journal.pone.0073612.
- Miller G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **31**, 426–428.
- Møller H.J. & Poulsen J.H. (2002) Staining of Glycoproteins/Proteoglycans in SDS-Gels. In: *The Protein Protocols Handbook* (ed. by J.M. Walker), pp. 773–778. Humana Press, Totowa, NJ.

- Møller M.S. & Svensson B. (2016) Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. *Current opinion in structural biology*, **40**, 33–42. DOI: 10.1016/j.sbi.2016.07.006.
- Morgenstern I., Powlowski J., Ishmael N., Darmond C., Marqueteau S., Moisan M.-C., Quenneville G. & Tsang A. (2012) A molecular phylogeny of thermophilic fungi. *Fungal biology*, **116**, 489–502. DOI: 10.1016/j.funbio.2012.01.010.
- Mussmann N., O'Connell T., Herbst D., Berger R.G., Linke D. & Döring F. (2017) Improved washing performance using a novel alpha-amylase from *Rhizoctonia solani*.
- Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N. & Larsson K.-H. (2008) Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics*, **4**, EBO.S653. DOI: 10.4137/EBO.S653.
- Niyonzima F.N. & More S.S. (2014) Detergent-compatible bacterial amylases. *Applied biochemistry and biotechnology*, **174**, 1215–1232. DOI: 10.1007/s12010-014-1144-3.
- Nødvig C.S., Nielsen J.B., Kogle M.E. & Mortensen U.H. (2015) A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PloS one*, **10**, e0133085. DOI: 10.1371/journal.pone.0133085.
- Norouzian D., Akbarzadeh A., Scharer J.M. & Moo Young M. (2006) Fungal glucoamylases. *Biotechnology advances*, **24**, 80–85. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.06.003.
- Osset M., Piñol M., Fallon M.J., Llorens R. de & Cuchillo C.M. (1989) Interference of the carbohydrate moiety in coomassie brilliant blue R-250 protein staining. *Electrophoresis*, **10**, 271–273. DOI: 10.1002/elps.1150100412.
- Pandey A. (1995) Glucoamylase Research: An Overview. *Starch - Stärke*, **47**, 439–445. DOI: 10.1002/star.19950471108.
- Pandey A., Nigam P., Soccol C.R., Soccol V.T., Singh D. & Mohan R. (2000) Advances in microbial amylases. *Biotechnology and applied biochemistry*, **31 (Pt 2)**, 135–152.
- Peláez F., Martínez M.J. & Martínez A.T. (1995) Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research*, **99**, 37–42. DOI: 10.1016/S0953-7562(09)80313-4.
- Pérez S. & Bertoft E. (2010) The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch - Stärke*, **62**, 389–420. DOI: 10.1002/star.201000013.

- Pérez-Martínez A.S., Acevedo-Padilla S.A., Bibbins-Martínez M., Galván-Alonso J. & Rosales-Mendoza S. (2015) A perspective on the use of *Pleurotus* for the development of convenient fungi-made oral subunit vaccines. *Vaccine*, **33**, 25–33. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.10.059.
- Piva L.C., Bentacur M.O., Reis V.C.B., Marco J.L. de, Moraes L.M.P.d. & Torres F.A.G. (2017) Molecular strategies to increase the levels of heterologous transcripts in *Komagataella phaffii* for protein production. *Bioengineered*, **8**, 441–445. DOI: 10.1080/21655979.2017.1296613.
- Polizeli M.d.L.T.M. & Rai M., editors (2013) *Fungal enzymes*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Prakash O. & Jaiswal N. (2010) alpha-Amylase: An ideal representative of thermostable enzymes. *Applied biochemistry and biotechnology*, **160**, 2401–2414. DOI: 10.1007/s12010-009-8735-4.
- Puxbaum V., Mattanovich D. & Gasser B. (2015) Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Applied microbiology and biotechnology*, **99**, 2925–2938. DOI: 10.1007/s00253-015-6470-z.
- Rodríguez-Sanoja R., Oviedo N. & Sánchez S. (2005) Microbial starch-binding domain. *Current opinion in microbiology*, **8**, 260–267. DOI: 10.1016/j.mib.2005.04.013.
- Roy A., Kucukural A. & Zhang Y. (2010) I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, **5**, 725–738. DOI: 10.1038/nprot.2010.5.
- Santiago M., Ramírez-Sarmiento C.A., Zamora R.A. & Parra L.P. (2016) Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Applications of Cold-Active Enzymes. *Frontiers in microbiology*, **7**, 1408. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01408.
- Schallmey M., Singh A. & Ward O.P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian journal of microbiology*, **50**, 1–17. DOI: 10.1139/w03-076.
- Schmidt-Dannert C. (2016) Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. *Current opinion in chemical biology*, **31**, 40–49. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.01.002.
- Schuster M., Schweizer G., Reissmann S. & Kahmann R. (2016) Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **89**, 3–9. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.09.001.

- Shental-Bechor D. & Levy Y. (2008) Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 8256–8261. DOI: 10.1073/pnas.0801340105.
- Showell M.S. (1999) Enzymes, Detergent. In: *Encyclopedia of bioprocess technology: Fermentation, biocatalysis, and bioseparation* (ed. by M.C. Flickinger). Wiley, New York, NY.
- Souza P.M. de & Oliveira Magalhães P. de (2010) Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, **41**, 850–861. DOI: 10.1590/S1517-83822010000400004.
- Struch M., Krahe N.-K., Linke D., Mookoonlall A., Hinrichs J. & Berger R.G. (2016) Dose dependent effects of a milk ion tolerant laccase on yoghurt gel structure. *LWT - Food Science and Technology*, **65**, 1144–1152. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.10.004.
- Sukenik S.C., Karuppanan K., Li Q., Lebrilla C.B., Nandi S. & McDonald K.A. (2018) Transient Recombinant Protein Production in Glycoengineered *Nicotiana benthamiana* Cell Suspension Culture. *International journal of molecular sciences*, **19**. DOI: 10.3390/ijms19041205.
- Sunagawa M., Murata H., Miyazaki Y. & Nakamura M. (2007) Transformation of *Lyophyllum decastes* by particle bombardment. *Mycoscience*, **48**, 195–197. DOI: 10.1007/S10267-007-0345-9.
- Svendsen A., Andersen C. & Thisted, T. and von der Osten, C. (2010) Alpha-amylase variant with altered properties.
- Ulrich A., Andersen K.R. & Schwartz T.U. (2012) Exponential megaprimer PCR (EMP) cloning--seamless DNA insertion into any target plasmid without sequence constraints. *PloS one*, **7**, e53360. DOI: 10.1371/journal.pone.0053360.
- Uzun U., Demirci E. & Yildirim Akatin M. (2017) Purification and characterization of *Rhizoctonia solani* AG-4 strain ZB-34 α -amylase produced by solid-state fermentation using corn bran. *Turkish Journal of Biochemistry*, **0**, 29. DOI: 10.1515/tjb-2017-0159.
- van der Heide M., Hollenberg C.P., van der Klei I.J. & Veenhuis M. (2002) Overproduction of BiP negatively affects the secretion of *Aspergillus niger* glucose oxidase by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Applied microbiology and biotechnology*, **58**, 487–494.
- van der Maarel M.J.E.C., van der Veen B., Uitdehaag J.C.M., Leemhuis H. & Dijkhuizen L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of biotechnology*, **94**, 137–155.

- Vogl T. & Glieder A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New biotechnology*, **30**, 385–404. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.11.010.
- Vojcic L., Pitzler C., Körfer G., Jakob F., Ronny M., Maurer K.-H. & Schwaneberg U. (2015) Advances in protease engineering for laundry detergents. *New biotechnology*, **32**, 629–634. DOI: 10.1016/j.nbt.2014.12.010.
- Walker J.A., Takasuka T.E., Deng K., Bianchetti C.M., Udell H.S., Prom B.M., Kim H., Adams P.D., Northen T.R. & Fox B.G. (2015) Multifunctional cellulase catalysis targeted by fusion to different carbohydrate-binding modules. *Biotechnology for biofuels*, **8**, 220. DOI: 10.1186/s13068-015-0402-0.
- Wallen R.M. & Perlin M.H. (2018) An Overview of the Function and Maintenance of Sexual Reproduction in Dikaryotic Fungi. *Frontiers in microbiology*, **9**, 503. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00503.
- Waltz E. (2016) Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, **532**, 293. DOI: 10.1038/nature.2016.19754.
- Wang J.-R., Li Y.-Y., Liu D.-N., Liu J.-S., Li P., Chen L.-Z. & Xu S.-D. (2015) Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of α -Amylase Gene from *Bacillus licheniformis* in *Pichia pastoris*. *BioMed research international*, **2015**, 248680. DOI: 10.1155/2015/248680.
- Wang M., Si T. & Zhao H. (2012) Biocatalyst development by directed evolution. *Bioresource technology*, **115**, 117–125. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.054.
- Wang P., Qin W., Xu J., Yan Y., Tian J., Wu N. & Yao B. (2016) Enhancing the soluble expression of an amylase in *Escherichia coli* by the mutations related to its domain interactions. *Protein expression and purification*, **120**, 35–41. DOI: 10.1016/j.pep.2015.12.010.
- Wang S. & Copeland L. (2013) Molecular disassembly of starch granules during gelatinization and its effect on starch digestibility: A review. *Food & function*, **4**, 1564–1580. DOI: 10.1039/c3fo60258c.
- Welinder K.G. & Tams J.W. (2010) Effects of glycosylation on protein folding, stability and solubility. Studies of chemically modified or engineered plant and fungal peroxidases. In: *Carbohydrate bioengineering: Proceedings of an international conference, Elsinore, Denmark, April 23-26, 1995* (ed. by S.B. Petersen, B. Svensson & S. Pedersen), pp. 205–210. Elsevier, Amsterdam, New York.

- Werten M.W.T. & Wolf F.A. de (2005) Reduced proteolysis of secreted gelatin and Yps1-mediated alpha-factor leader processing in a *Pichia pastoris* *kex2* disruptant. *Applied and environmental microbiology*, **71**, 2310–2317. DOI: 10.1128/AEM.71.5.2310-2317.2005.
- Winkler J.D. & Kao K.C. (2014) Recent advances in the evolutionary engineering of industrial biocatalysts. *Genomics*, **104**, 406–411. DOI: 10.1016/j.ygeno.2014.09.006.
- Wu J. & Brien P.A.O.' (2009) Stable transformation of *Rhizoctonia solani* with a modified hygromycin resistance gene. *Australasian Plant Pathology*, **38**, 79. DOI: 10.1071/AP08081.
- Xavier-Santos S., Carvalho C.C., Bonfá M., Silva R., Capelari M. & Gomes E. (2004) Screening for pectinolytic activity of wood-rotting basidiomycetes and characterization of the enzymes. *Folia microbiologica*, **49**, 46–52.
- Yamada Y., Matsuda M., Maeda K. & Mikata K. (1995) The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: The proposal of *Komagataella* gen. nov. (Saccharomycetaceae). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **59**, 439–444. DOI: 10.1271/bbb.59.439.
- Yang H., Liu L., Shin H.-d., Chen R.R., Li J., Du G. & Chen J. (2013) Structure-based engineering of histidine residues in the catalytic domain of α -amylase from *Bacillus subtilis* for improved protein stability and catalytic efficiency under acidic conditions. *Journal of biotechnology*, **164**, 59–66. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.12.007.
- Yin Y., Wang Q., Xiao L., Wang F., Song Z., Zhou C., Liu X., Xing C., He N., Li K., Feng Y. & Zhang J. (2018) Advances in the Engineering of the Gene Editing Enzymes and the Genomes: Understanding and Handling the Off-Target Effects of CRISPR/Cas9. *Journal of biomedical nanotechnology*, **14**, 456–476. DOI: 10.1166/jbn.2018.2537.
- Zahl R.J., Peña D.A., Mattanovich D. & Gasser B. (2017) Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS yeast research*, **17**. DOI: 10.1093/femsyr/fox068.

7. Anhang

*α -Amylase aus *Fomes fomentarius* (Ffo)*

DNA-Sequenz (Signalpeptidsequenz unterstrichen):

ATGTCTCCTTGGTCCAAGCTTGTGGGCTCACGAGCCTCGGCGCCCTGTTCTCAGCCGCTG
GCGCTGCGCCGTTCCCTCCGTTGCGACTGACGGTCACTCGTTGGCTGCCCCGCGCTCCTTCCAC
 AAACAAAACGGTCATCGTCCAGATATTCGAGTGGTCATGGGACAGCGTCGCCACCGAGTGC
 ACCAACTTCATCGGGCCTGCCGGGTATGGGTTTGTTC AAGTGAGCCCTCCGGCGGAGCACA
 TCCAGGGCAGTCAATGGTGGACGGACTACCAGCCGGTCTCATAACGCTCACCTCCAAGCG
 TGGCAATCGCGACCAATTTGCGAACATGATCAATACCTGCCATGCCGCGGTGTTGGTGTG
 ATCGTTGACACTATTTGGAACCACATGGCCGGCGTCAATCTGGCACGGGCGTTGCTGGGT
 CCTCCTTTACGCACTACAAC TACCAGGCATCTATCAAACCCAGGATTTCCATCACTGCGG
 CCTTACCAGCGGTGACGACATCGTCGACTACTCTAGCCGAGCTCAAGTCCAAACGTGTGAG
 CTTGTCAACCTTGCCGACCTCGCAACTGATAACCGAGTACGTTCCGGAGCCGCCTTGCTGCGT
 ACGGAAACGACCTCTTGTGCTGGGCGCCGATGGCTTCCGTCTCGACGCCGCGAAACATAT
 CGCTACTGGTGACATTGCCAACATCTTGTGCGAGGTTGAACTCTACCCCATATATCTCGCAA
 GAGGTCATTTATGGCGCTGGCGAGCCGGTCACTCCTAGCGAATACACCGGCAATGGTGATG
 TCCAGGAATTCCGGTACACCTCGGCTATAAAGGATGCTTTCCTAAACGGCGATATCTCCAG
 CTTCAAAGTTTTGACAATCGCGGTTGGGTGGCAGGCTCAGGCGCGAATGTGTTTCGTGTA
 AACCATGACACGGAAAGGAACGGCGATTGCTCAATAACAATTCTCCCTCCAACACCTATG
 TCACTGCTACGATCTTCTCGCTTGCGCATCCATATGGTACACCGACGATCCTGTCCAGCTA
 CAGTGGCTTCACCAATACCGATGCTGGTGCACCCAATGGTGGGGCTGGGACGTGCTCAGGC
 AGCGGTGGATCGAACGGATGGCTGTGTCAGCACCGTTGGACCGCGTTTGCCGGCATGGTTG
 GTTCAGGAACAACGTCGGCAACGCGGCGCTTACCAACTGGCAGTCACCTCAAGGTCGACA
 GATCGCCTTTGGTTCGCGGCGCATTGGGCTTTGTGCTATCAATAACGACGACTCTGCTTGG
 TCGACGACGTTACGACTCAGCTTCCCGACGGCTCATACTGCGATGTTGTCAGTGGCGCGT
 CTTCTGGAGGCAACTGCTCCGGTACATCCATCACCGTCTCTGGCGGTTGTTTCAGCGCGAC
 GGTGCCTGCGAGAAGCGCCGTCGCGATCCACACCGGCGCAAGGGCAGTAGCAACAACGGC
 GGTGGCGGCGGAGaCAACGTCACTGTAAACTTCTCTGTAACCGCCACAACCACATTCGGCG
 AGAACATCTTCCTCGTCGGAAGCATTTCACAGCTCGGAAGCTGGAACGCCGCGAACGCCAT
 CGCATTGTCTTCTGCTTCGTACCCGACGTGGACCGTGTGCGTACGATTCCCGCAAGCACT
 ACCTTTGAGTACAAATTCATCAGGAAAGAGACTGATGGAAGCATCGTGTGGGAGTCCGATC
 CCAACCGTTCTGCCACAACCCCTCTGCGGGTACTCAGAATCTTTCCTCTTCTGGAGATA
 A

Aminosäure-Sequenz (Signalpeptid unterstrichen, MS-Hit rot):

MSPWSKLVGLTSLGALFSAAGAAPFLRSTDGHSLAARAPSTNKTIVIVQIFEWSDSVATEC
 TNFIGPAGYGFVQVSPPAEHIQGSQWWTDYQPVSYTLTSKRGNRDQFANMINTCHAAGVGV
 IVDTIWNHMAGVESGTGVAGSSFTHYNYPGIYQTQDFHHCGLTSGDDIVDYSSRAQVQTCE
 LVNLADLATDTEYVRSRLAAYGNDLLSLGADGFR LDAAKH **IATGDIANIL** SRLNSTPYISQ
 EVIYGAGEPVTPSEYTGNGDVQEFRYTSAIKDAFLNGDISSLQSF DNRGWVAGSGANVFVV
 NHDTERNGDSLNNNSPSNTYVTATIFSLAHPYGTPTILSSYSGFTNTDAGAPNGGAGTCSG
 SGGSNGLCQHRWTAFAGMVGFRRNVGNAAALTNWQSPQGRQIAFGRGALGFVA INNDDSAW
 STFTTQLPDGSYCDVVSGASSGGNCSGTSITVSGGSFSATV PARSVAIHTGAKGSSNNG
 GGGDNVTVNFSVTATTTFGENIFLVGSISQLGSWNAANAIALSSASYPTWTVSVSIPAST
 TFEYKFIRKETDGSIVWESDPNRSATTPSAGTQNLSSSWR*

Alignments:

Auf DNA- Ebene:

>>LCI (1770 nt)
 Waterman-Eggert score: 8724; 1827.3 bits; E(1) < 0
 99.0% identity (99.0% similar) in 1782 nt overlap (1-1782:1-1770)

	10	20	30	40	50	60
JGI	ATGTCTCCTTGGTCCAAGCTTGTGGGCTCACGAGCCTCGGCGCCCTGTTCTCAGCCGCT					
					
LCI	ATGTCTCCTTGGTCCAAGCTTGTGGGCTCACGAGCCTCGGCGCCCTGTTCTCAGCCGCT					
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
JGI	GGCGCTGCGCCGTTCCCTCCGTTTCGACTGACGGTCACTCGTTGGCTGCCC GCGCTCCTTCC					
					
LCI	GGCGCTGCGCCGTTCCCTCCGTTTCGACTGACGGTCACTCGTTGGCTGCCC GCGCTCCTTCC					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
JGI	ACAAACAAAACGGTCATCGTCCAGATATTCGAGTGGTCATGGGACAGCGTCGCCACCGAG					
					
LCI	ACAAACAAAACGGTCATCGTCCAGATATTCGAGTGGTCATGGGACAGCGTCGCCACCGAG					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
JGI	TGCACCAACTTCATCGGGCCTGCCGGGTATGGGTTTGTTC AAGTGAGCCCTCCGGCGGAG					
					
LCI	TGCACCAACTTCATCGGGCCTGCCGGGTATGGGTTTGTTC AAGTGAGCCCTCCGGCGGAG					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
JGI	CACATCCAGGGCAGTCAATGGTGGACGGACTACCAGCCGGTCTCATAACGCTCACCTCC					
					
LCI	CACATCCAGGGCAGTCAATGGTGGACGGACTACCAGCCGGTCTCATAACGCTCACCTCC					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
JGI	AAGCGTGGCAATCGCGACCAATTTGCGAACATGATCAATACCTGCCATGCCGCCGGTGT					
					
LCI	AAGCGTGGCAATCGCGACCAATTTGCGAACATGATCAATACCTGCCATGCCGCCGGTGT					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
JGI	GGTGTTCATCGTTGACACTATTTGGAACCACATGGCCGGCGTCAATCTGGCACGGGCGTT					
					
LCI	GGTGTTCATCGTTGACACTATTTGGAACCACATGGCCGGCGTCAATCTGGCACGGGCGTT					
	370	380	390	400	410	420
	430	440	450	460	470	480
JGI	GCTGGGTCCCTCCTTACGCACTACAAC TACCAGGCATCTATCAAACCCAGGATTTCCAT					
					
LCI	GCTGGGTCCCTCCTTACGCACTACAAC TACCAGGCATCTATCAAACCCAGGATTTCCAT					
	430	440	450	460	470	480
	490	500	510	520	530	540
JGI	CACTGCGGCCTTACCAGCGGTGACGACATCGTCGACTACTCTAGCCGAGCTCAAGTCCAA					
					
LCI	CACTGCGGCCTTACCAGCGGTGACGACATCGTCGACTACTCTAGCCGAGCTCAAGTCCAA					
	490	500	510	520	530	540
	550	560	570	580	590	600


```

JGI   ACGTGTGAGCTTGTCAACCTTGCCGACCTCGCAACTGATACCGAGTACGTTCCGGAGCCGC
      .....
LCI   ACGTGTGAGCTTGTCAACCTTGCCGACCTCGCAACTGATACCGAGTACGTTCCGGAGCCGC
      550      560      570      580      590      600

      610      620      630      640      650      660
JGI   CTTGCTGCGTACGGAAACGACCTCTTGTGCGCTGGGCGCCGATGGCTTCCGTCTCGACGCC
      .....
LCI   CTTGCTGCGTACGGAAACGACCTCTTGTGCGCTGGGCGCCGATGGCTTCCGTCTCGACGCC
      610      620      630      640      650      660

      670      680      690      700      710      720
JGI   GCGAAACATATCGCTACTGGTGACATTGCCAACATCTTGTGCGAGGTTGAACTCTACCCCA
      .....
LCI   GCGAAACATATCGCTACTGGTGACATTGCCAACATCTTGTGCGAGGTTGAACTCTACCCCA
      670      680      690      700      710      720

      730      740      750      760      770      780
JGI   TATATCTCGCAAGAGGTCATTTATGGCGCTGGCGAGCCGGTCACTCCTAGCGAATACACC
      .....
LCI   TATATCTCGCAAGAGGTCATTTATGGCGCTGGCGAGCCGGTCACTCCTAGCGAATACACC
      730      740      750      760      770      780

      790      800      810      820      830      840
JGI   GGCAATGGTGCGCAATCCTCGAGTTATTATACATTCCGGTACACCTCGGCTATAAAGGAT
      .....
LCI   GGCAATGGTGCATG--TCCAGGA-----ATTCCGGTACACCTCGGCTATAAAGGAT
      790      800      810      820

      850      860      870      880      890      900
JGI   GCTTTCCTAAACGGCGATATCTCCAGCCTTCAAAGTTTTGACAATCGCGGTTGGGTGGCA
      .....
LCI   GCTTTCCTAAACGGCGATATCTCCAGCCTTCAAAGTTTTGACAATCGCGGTTGGGTGGCA
      830      840      850      860      870      880

      910      920      930      940      950      960
JGI   GGCTCAGGCGGAATGTGTTTCGTCGTAAACCATGACACGGAAAGGAACGGCGATTTCGCTC
      .....
LCI   GGCTCAGGCGGAATGTGTTTCGTCGTAAACCATGACACGGAAAGGAACGGCGATTTCGCTC
      890      900      910      920      930      940

      970      980      990      1000      1010      1020
JGI   AATAACAATTCTCCCTCCAACACCTATGTCACTGCTACGATCTTCTCGCTTGCGCATCCA
      .....
LCI   AATAACAATTCTCCCTCCAACACCTATGTCACTGCTACGATCTTCTCGCTTGCGCATCCA
      950      960      970      980      990      1000

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
JGI   TATGGTACACCGACGATCCTGTCCAGCTACAGTGGCTTCACCAATACCGATGCTGGTGCA
      .....
LCI   TATGGTACACCGACGATCCTGTCCAGCTACAGTGGCTTCACCAATACCGATGCTGGTGCA
      1010      1020      1030      1040      1050      1060

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
JGI   CCCAATGGTGGGGCTGGGACGTGCTCAGGCAGCGGTGGATCGAACGGATGGCTGTGTCAG
      .....
LCI   CCCAATGGTGGGGCTGGGACGTGCTCAGGCAGCGGTGGATCGAACGGATGGCTGTGTCAG
      1070      1080      1090      1100      1110      1120

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
JGI   CACCGTTGGACCGGTTTGCCGGCATGGTTGGCTTCAGGAACAACGTCGGCAACGCGGCG
      .....

```

```
LCI   CACCGTTGGACCGCGTTTGCCGGCATGGTTGGCTTCAGGAACAACGTCGGCAACGCGGCG
      1130      1140      1150      1160      1170      1180

              1210      1220      1230      1240      1250      1260
JGI   CTTACCAACTGGCAGTCACCTCAAGGTCGACAGATCGCCTTTGGTCGCGGGCGCATTTGGGC
      .....
LCI   CTTACCAACTGGCAGTCACCTCAAGGTCGACAGATCGCCTTTGGTCGCGGGCGCATTTGGGC
      1190      1200      1210      1220      1230      1240

              1270      1280      1290      1300      1310      1320
JGI   TTTGTCGCTATCAATAACGACGACTCTGCTTGGTCGACGACGTTTCACGACTCAGCTTCCC
      .....
LCI   TTTGTCGCTATCAATAACGACGACTCTGCTTGGTCGACGACGTTTCACGACTCAGCTTCCC
      1250      1260      1270      1280      1290      1300

              1330      1340      1350      1360      1370      1380
JGI   GACGGCTCATACTGCGATGTTGTTCAGTGGCGCGTCTTCTGGAGGCAACTGCTCCGGTACA
      .....
LCI   GACGGCTCATACTGCGATGTTGTTCAGTGGCGCGTCTTCTGGAGGCAACTGCTCCGGTACA
      1310      1320      1330      1340      1350      1360

              1390      1400      1410      1420      1430      1440
JGI   TCCATCACCGTCTCTGGCGGTTTCGTTTCAGCGCGACGGTGCCTGCGAGAAGCGCCGTCGCG
      .....
LCI   TCCATCACCGTCTCTGGCGGTTTCGTTTCAGCGCGACGGTGCCTGCGAGAAGCGCCGTCGCG
      1370      1380      1390      1400      1410      1420

              1450      1460      1470      1480      1490      1500
JGI   ATCCACACCGGCGCGAAGGGCAGTAGCAACAACGGCGGTGGCGGGCGGAGGCAACGTCACT
      .....
LCI   ATCCACACCGGCGCGAAGGGCAGTAGCAACAACGGCGGTGGCGGGCGGAGACAACGTCACT
      1430      1440      1450      1460      1470      1480

              1510      1520      1530      1540      1550      1560
JGI   GTAAACTTCTCTGTAACCGCCACAACCACATTCGGCGGAGAACATCTTCCTCGTCGGAAGC
      .....
LCI   GTAAACTTCTCTGTAACCGCCACAACCACATTCGGCGGAGAACATCTTCCTCGTCGGAAGC
      1490      1500      1510      1520      1530      1540

              1570      1580      1590      1600      1610      1620
JGI   ATTTACACAGCTCGGAAGCTGGAACGCCGCGAACGCCATCGCATTTGTCTTCTGCTTCGTAC
      .....
LCI   ATTTACACAGCTCGGAAGCTGGAACGCCGCGAACGCCATCGCATTTGTCTTCTGCTTCGTAC
      1550      1560      1570      1580      1590      1600

              1630      1640      1650      1660      1670      1680
JGI   CCGACGTGGACCGTGTTCGGTCAGCATTCCCAGCAAGCACTACCTTTGAGTACAAATTCATC
      .....
LCI   CCGACGTGGACCGTGTTCGGTCAGCATTCCCAGCAAGCACTACCTTTGAGTACAAATTCATC
      1610      1620      1630      1640      1650      1660

              1690      1700      1710      1720      1730      1740
JGI   AGGAAAGAGACTGATGGAAGCATCGTGTGGGAGTCCGATCCCAACCGTTCTGCCACAACC
      .....
LCI   AGGAAAGAGACTGATGGAAGCATCGTGTGGGAGTCCGATCCCAACCGTTCTGCCACAACC
      1670      1680      1690      1700      1710      1720

              1750      1760      1770      1780
JGI   CCCTCTGCGGGTACTCAGAATCTTTCCCTCTTCCTGGAGATAA
      .....
LCI   CCCTCTGCGGGTACTCAGAATCTTTCCCTCTTCCTGGAGATAA
      1730      1740      1750      1760      1770
```

α -Amylase aus *Fomitopsis pinicola* (Fpi)

DNA-Sequenz (Signalpeptidsequenz unterstrichen):

ATGTGGGGCAGCCTTCTCGCAGCCTCTGCcCTCGtGGCTTCCGCGCTTGCTGCGACTACGG
 CGGAaTGGCAGCAaCGCTCGATCTACCAGCTCGTCACGGATAGaTTCGCgACCTCGGAcGG
 CTCgTCGCCCCGCTTGCACACCGGCGATCGCGTGTATTGTGGcGGGTCTGCGCAGGGgGTC
 ATCAATAAGCTGGATTACATCCAGTACATGGGCTTCGACGCCaTCTGGATtTCACCAGTCG
 TGAAGAACCTAGAAGGcAGCACGGGAGATGGCTACTCGTACCATGGATACTGGGCGGTGCA
 CCAGAACTCGGTCAACGAGCACTTCGGCACTGCAGACGA_tCTGAATGCCCTTAGcAGCGG
 TTGCACGCGCGCGGGATGTACCTGATGGTCAcGTCGTCGTGAACCACATGGCGGCCAACA
 CGCTCCCGCCGACTACTCGACCTTCACGCCGTTcAGCTcCGAGTCGGACTTCCACACCTT
 CTGCTGGATCACGGACTACgACAACCAGACGAACGTCGAGCAGTGCTGGCTCGGCGACTCG
 AGCGTGCCGCTCGCGGACTGCGACACcGAGGCTgACAACGTcaTCGACTTCTTCTACAAC
 GGATCGGCGAGCTCCGCGGCAACTACACTGTGGATGGtTTCAGGATCGACACGCTGAAGCA
 TGTCAGGCAGACGTTCTGGCCaGAtTTCAGACcAACGCGGGCGTGTACGCCGTCGGTGAG
 GTCTTTGAcGGCGACGTGA_{ACT}AtGTTTTCGCCCTACACTGAGGt_tATCGACGGAGTGTGG
 ACTACCCGACGTACTATCAGCTCACCTCCGCCTTCGAGTCCACCAGCGGCTCAATTCAGAA
 CCTCGTCGACGTGATTCAGTCTGCGCAGTcACTTACTCCACGA_tGCTCTTCCAAGTCGCG
 ACgTTcCTCGAGAACCAGGACAACCCGCGGTTCCAGAGTcTTACCAC_tGAtCAAGGCC_TaG
 TGAAGAACCGATGgCgTGGCCGTTtATCGCGGATGGCATCCCCATt_cTtTACTACGGTCA
 GGAGCAAGGCTACACTGGCGGCAACGACCCCGATAACCGTGAAGCGCTGTGGCTGTCCGGA
 TACGAGGAAAACAAGCctCTCGTGCAGCACGCCCGCATCCTCAACGCTGCCCGCAAGGCCG
 CCATCGCCGCCAGCAGCAGCTTCCCTcTCCACCGCCGTGACCTTCCCGTcGGTGGGCAGCAA
 CACGCTCGCCGCGTCCAAATACCCGCTGCTCTCGCTCCTGAcCAACGTAGGCGCAAGCGGC
 AtGCCcGtTTGGGACGTCTCCTCGGGAACGGGATACGACGAGGGCACGGAGCTGATTGAtG
 CGCTCACGTGCACGACGTACACCGCTGgGAGCAGCGGCAGCGTGAGCGTCACGGGCAGTAG
 CGGgGACCCCGTCATCCTGCTcCCGACGAGCGCATAACAACGCGTCGTA_{CT}GACGCGAGCTG
 ACGGGCACGgACTCGACCGGCAGCTCGGACACGGTgTCGGTGACGTTTCGAGGTGGAGTACA
 ACACGACGTACGGCGAGAATTTGTATCTCACCGGCTCCGTctCTGAGCTCGTGGACTGGTC
 CGTCGAtGACGCaCTCCTtATGTCGTCCGCcGACTACCCGACCTGGAGC_cTGACGGTGGAC
 CTCCCCCGAGCACGGCGATCCAGTACAAGTAtCTgACGAAGTACAATGGCGACGTACGTC
 GGGAGGACGACCCCAACAACGAGCTCACGACgCctGCGAGCGGCTCCGTcACGCAGAGCGA
 CAGCTGGCATTGA

AS-Sequenz (Signalsequenz unterstrichen, MS-Hit rot markiert):

MWGSLLAASALVASALAATTAEWQQRSIYQLVTDR**FATSDGSSPACDTG**DRVYCGGSWQGV
 INKLDYIQYMGFD_{AI}WISPVVKNLEGSTGDGYSYHGYWAVDQNSVNEHFGTADDLNALSSA
 LHARGMYLMVDVVVNHMAANTLPPDYSTFTPFSSSEDFHTFCWITDYDNQTNVEQCWLGD
 SVPLADCDEADNVIDFFYNWIGELRANYTVDGFRIDTLKHVRQTFWPDFQTNAGVYAVGE
 VFDGDVNYVSPYTEVIDGVLDYPTYQLTSAFESTSGSIQNLVDVIQSAQSTYSTMLFQVA
 TFLENQDNPRFQSLTTDQGLVKNAMAWPFIADGIPILYYGQEQGYTGGNDPDNREALWLSG
 YEENKPLVQHARILNAARKAAIAASSSFLSTAVTFPSVGSNTLAASKYPLLSLLTNVGSAG
 MPVWDVSSGTGYDEGTELIDALTCTTYTAGSSGSVSVTGS_{SD}GPVILLPTSAYNASYCSEL

TGTDSTGSSDTSVTFEVEYNTTYGENLYLTGSVSELVDWSVDDALLMSSADYPTWSLTVD
LPPSTAIQYKYLTKYNGDVTWEDDPNNELTTPASGSVTQSDSWH*

Alignments:

```
>>LCI 1782 bp (1782 nt)
Waterman-Eggert score: 8316; 441.0 bits; E(1) < 5.7e-127
96.3% identity (96.3% similar) in 1782 nt overlap (1-1782:1-1782)

      10      20      30      40      50      60
JGI   ATGTGGGGCAGCCTTCTCGCAGCCTCTGCGCTCGCGGCTTCCGCGCTTGCTGCGACTACG
      :::::::::::::::::::::::::::::: :::: ::::::::::::::::::::::::::::::
LCI   ATGTGGGGCAGCCTTCTCGCAGCCTCTGCCCTCGTGGCTTCCGCGCTTGCTGCGACTACG
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
JGI   GCGGAGTGGCAGCAGCGCTCGATCTACCAGCTCGTCACGGATAGGTTGCCACCTCGGAT
      ::::: ::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::: :::::::::::
LCI   GCGGAATGGCAGCAACGCTCGATCTACCAGCTCGTCACGGATAGATTCCGCGACCTCGGAC
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
JGI   GGCTCATCGCCCGCTTGCGACACCGGCGATCGCGTGTATTGTGGTGGGTCGTGGCAGGGT
      ::::: ::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::::::: :::::::::::
LCI   GGCTCGTCGCCCGCTTGCGACACCGGCGATCGCGTGTATTGTGGCGGGTCGTGGCAGGGG
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
JGI   GTCATCAATAAGCTGGATTACATCCAGTACATGGGCTTCGACGCCGTCTGGATCTCACCA
      ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
LCI   GTCATCAATAAGCTGGATTACATCCAGTACATGGGCTTCGACGCCATCTGGATTTACCA
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
JGI   GTCGTGAAGAACCTAGAAGGGAGCACGGGAGATGGCTACTCGTACCATGGATACTGGGCG
      ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
LCI   GTCGTGAAGAACCTAGAAGGCAGCACGGGAGATGGCTACTCGTACCATGGATACTGGGCG
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
JGI   GTCGACCAGAACTCGGTCAACGAGCACTTCGGCACTGCAGACGACCTGAATGCCCTTAGT
      ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
LCI   GTCGACCAGAACTCGGTCAACGAGCACTTCGGCACTGCAGACGATCTGAATGCCCTTAGC
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
JGI   AGCGCGTTGCACGCGCGCGGGATGTACCTGATGGTCGATGTCGTGTCGTGAACCACATGGCG
      ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
LCI   AGCGCGTTGCACGCGCGCGGGATGTACCTGATGGTCGACGTCGTGTCGTGAACCACATGGCG
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
JGI   GCCAACACGCTCCCGCCGGACTACTCGACCTTCACGCCGTTTCAGCGCCGAGTCGGACTTC
      ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
LCI   GCCAACACGCTCCCGCCGGACTACTCGACCTTCACGCCGTTTCAGCTCCGAGTCGGACTTC
      430     440     450     460     470     480

      490     500     510     520     530     540
JGI   CACACCTTCTGCTGGATCACGGACTACAACAACCAGACGAACGTCGAGCAGTCTGGCTC
      ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: ::::::::::: :::::::::::
```


	1150	1160	1170	1180	1190	1200
JGI	AACGCTGCCCGCAAGGCCGCCATCGCCGCCAGCAGCAGCTTCCTCTCCACCGCCGTGACC					

LCI	AACGCTGCCCGCAAGGCCGCCATCGCCGCCAGCAGCAGCTTCCTCTCCACCGCCGTGACC					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
JGI	TTCCCGTTGGTGGGCAGCAACACGCTCGCCGCGTCTAAATACCCGCTGCTCTCGCTCCTG					

LCI	TTCCCGTCGGTGGGCAGCAACACGCTCGCCGCGTCCAAATACCCGCTGCTCTCGCTCCTG					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
JGI	AGCAACGTAGGCGCAAGCGGCACGCCGGCTTGGGACGTCTCCTCGGGAACGGGATACGAC					
	:	:	:	:	:	:
LCI	ACCAACGTAGGCGCAAGCGGCATGCCCGTTTGGGACGTCTCCTCGGGAACGGGATACGAC					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
JGI	GAGGGCACGGAGCTGATTGACGCGCTCACGTGCACGACGTACACCGCTGAGAGCAGCGGC					

LCI	GAGGGCACGGAGCTGATTGATGCGCTCACGTGCACGACGTACACCGCTGGGAGCAGCGGC					
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
JGI	AGCGTGAGCGTCACGGGCAGTAGCGGGACCCCGTCATCCTGCTGCCGACGAGCGCATA					

LCI	AGCGTGAGCGTCACGGGCAGTAGCGGGACCCCGTCATCCTGCTCCCGACGAGCGCATA					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
JGI	AACGCGTCGTA	CTGCAGCGAGCTGACGGGCACGAACTCGACCGGCAGCTCGGACACGGTT				

LCI	AACGCGTCGTA	CTGCAGCGAGCTGACGGGCACGGACTCGACCGGCAGCTCGGACACGGTG				
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
JGI	TCGGTGACGTT	TCGAGGTGGAGTACAACACGACGTACGGCGAGAATTTGTATCTCACC				

LCI	TCGGTGACGTT	TCGAGGTGGAGTACAACACGACGTACGGCGAGAATTTGTATCTCACC				
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
JGI	TCCGTCGCTG	AGCTCGTGGACTGGTCCGTCGACGACGCGCTCCTCATGTGTCGTCCGCGGAC				

LCI	TCCGTCCTG	AGCTCGTGGACTGGTCCGTCGATGACGCACTCCTTATGTGTCGTCCGCGGAC				
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
JGI	TACCCGACCT	TGGAGCTTGACGGTGGACCTCCCCCGAGCACGGCGATCCAGTACAAGTAC				

LCI	TACCCGACCT	TGGAGCCTGACGGTGGACCTCCCCCGAGCACGGCGATCCAGTACAAGTAT				
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
JGI	CTCACGAAGT	ACAATGGCGACGTCACGTGGGAGGACGACCCCAACAACGAGCTCACGACT				

LCI	CTGACGAAGT	ACAATGGCGACGTCACGTGGGAGGACGACCCCAACAACGAGCTCACGACG				
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	1750	1760	1770	1780		


```

LCI      TNVGASGMPVWDVSSGTGYDEGTELIDALTCTTYTAGSSGSVSVTGSSGDPVILLPTSAY
          430      440      450      460      470      480

          490      500      510      520      530      540
JGI      NASYCSELTGTNSTGSSDTVSVTFEVEYNNTTYGENLYLTGSVAELVDWSVDDALLMSSAD
          .....
LCI      NASYCSELTGTDSTGSSDTVSVTFEVEYNNTTYGENLYLTGSVSELVDWSVDDALLMSSAD
          490      500      510      520      530      540

          550      560      570      580      590
JGI      YPTWSLTVDLPPSTAIQYKYLTKYNGDVTWEDDPNNELTTPASGSVTQSDSWH
          .....
LCI      YPTWSLTVDLPPSTAIQYKYLTKYNGDVTWEDDPNNELTTPASGSVTQSDSWH
          550      560      570      580      590

```

***α*-Amylase aus *Irpex lacteus* (Ila)**

DNA-Sequenz (Signalpeptidsequenz unterstrichen):

```

ATGGTCAAGTTGACACTCCCTTTTCGTTCTCGCCGCCGTCAGCTCTATGGCGGCGGGCATTG
TCATCCCCGAGAACAGTGCTCTCGAAACCCGCTCTACTGGCCAGTCCAAGGCTGTCATCGT
TCAGATGTTTGAGTGGACTTGGGACAGTATCGCGTCCGAGTGCACCAACTTCCTCGGGCCC
GCCGGGTACGGTTATGTTTCAGACGAGTCCTCCTCAGGAGCACGTCACTGGCAACCAGTGGT
GGACTGATTACCAGCCCGTCTCGTATAACCCTCACCTCGAAGCGCGGCAACCGATCACAGTT
TGCTAACATGATCTCCACTTGCCACAAGGCGGGCGTCAAGGTTATCGCAGACACTATCTTC
AACCATATGACTGGCTCCGACTCGGGCAGTGGTGTGCTGGCTCGTCTGACACCCACTACA
ACTACCCTGGTATCTACCAAACAGGACTTCCATCACTGTGGGCTGGAGCCCAATGACGA
TATTGTCAATTATGACAATGCTGTGGAAGTCCAGACGTGCCAGTTGGAAGGACTTGCAGAT
TTGGCTACCGATACAGAATACGTCCGCAGTAGGCTCGCGCAGTATGGTAACGATCTGCTTT
CCCTGGGAGTGGACGGACTCAGGCTGGATGCTTCTAAGCACATTGCCGTGACTGACCTTAC
CAATATCACCTCTCGCCTGAATGGCTCTCCTTACCTCACTCAGGAGGTCATCTATGGTGAG
GGTGAGCCTATCACCCCAACCAATACGTCCGCATTGGTGATGTTCAAGAGTTCCGTTACA
CAACCGCTCTCAAGAACGCTTTCTTGAACGGAGCTATCAACGGCCTACAAAGCTTCGACAA
CCTTGGCTGGGTGTCGGGTGACAAGGCTAACGTCTTCGTTACCAACCACGACACAGAGCGA
AACGGTGTGCCCTCACCAACTCCTCACCTTCCAATACCTACGTTCTTGCCACCATATTCT
CCCTCGCCACCCCTACGGCACTGTCACCGTCTCTCATCCTATTCCGGCTTCGACACCAA
CTCTGATGCAGGCGCACCCAACGGCGGCACCGGTAAGTCTGCTCTGGCACCGGCGGCTCCAAC
GGCTGGTTCTGCCAGCATCGATGGATTGCTTTCCAGGGTATGACTGCCCTCAGGAACACTG
TCGGCAGTGTGCCATCGCCAACGGCAGACTGGTCAGAACTCGAAATCGCCTTCGACCG
TGGTACCGCTGGGTTCGTTGCTATCAACAACGCCGACTCGCAGTGGGATGCCACCTGGAAG
ACTGGCTTGCCCGACGGTGTGTACTGCAACGTATCTCCGGCGTCTTCTCGAGTGGTTCGT
GCTCCGGTGGCACTGTCACTGTCAAGAACGGTGGTCAAATCCCCTACAACCTGTCTTCTCG
CAATGCTGTGCCATTATACCAACGCCAAGCTCTCATAA

```

Aminosäure-Sequenz (Signalpeptid unterstrichen):

```

MVKLTLPLFVLAAVSSMAAGIVIPENSALETRSTGQSKAVIVQMFIEWTWDSECTNIFLGP
AGYGYVQTSPPQEHVTGNQWWTDYQPVSYTLTSKRGNRSQFANMI STCHKAGVKVIADTIF
NHMTGSDSGTGVAGSSYTHYNYPGIYQNQDFHHCLEPNDDIVNYDNAVEVQTCQLEGLAD
LATDTEYVRSRLAQYGNLDSLGLVDGLRLDASKHIAVTDLTNITSRLNGSPYLTQEVIIYGE
GEPITPNQYVIGIDVQEFYRYTTALKNAFLNGAINGLQSFNLDGWVSGDKANVFTNHDTER

```


LCI CACTACAACCTACCCTGGTATCTACCAAAAACCAGGACTTCCATCACTGTGGGCTGGAGCCC
430 440 450 460 470 480

JGI AATGACGATATTGTCAATTACGACAATGCTGTGGAAGTCCAGACGTGCCAGTTGGAAGGA
490 500 510 520 530 540

LCI AATGACGATATTGTCAATTATGACAATGCTGTGGAAGTCCAGACGTGCCAGTTGGAAGGA
490 500 510 520 530 540

JGI CTTGCAGATTTGGCTACCGATACGGAGTACGTTCCGAGTAGACTCGCTCAGTATGGGAAC
550 560 570 580 590 600

LCI CTTGCAGATTTGGCTACCGATACAGAATACGTCGCGAGTAGGCTCGCGCAGTATGGTAAC
550 560 570 580 590 600

JGI GATCTGCTTTCCCTAGGAGTCGACGGACTCAGATTGGATGCCTCTAAGCACATCGCCGTG
610 620 630 640 650 660

LCI GATCTGCTTTCCCTGGGAGTGGACGGACTCAGGCTGGATGCTTCTAAGCACATTGCCGTG
610 620 630 640 650 660

JGI ACTGACCTTACCAATATCACCTCTCGTCTGAATGGTTCTCCTTACCTCACTCAGGAGGTC
670 680 690 700 710 720

LCI ACTGACCTTACCAATATCACCTCTCGCCTGAATGGCTCTCCTTACCTCACTCAGGAGGTC
670 680 690 700 710 720

JGI ATCTACGGCGAGGGTGAGCCTATCACTCCCAATCAGTACGTTGGCATTTGGTGATGTTCAA
730 740 750 760 770 780

LCI ATCTATGGTGAGGGTGAGCCTATCACCCCAACCAATACGTCGGCATTTGGTGATGTTCAA
730 740 750 760 770 780

JGI GAGTTCGGTTACACCACCGCTCTCAAGAACGCTTTCTTGAACGGAGCTATTAACGGCCTA
790 800 810 820 830 840

LCI GAGTTCGGTTACACAACCGCTCTCAAGAACGCTTTCTTGAACGGAGCTATCAACGGCCTA
790 800 810 820 830 840

JGI CAGAGCCTCGACAACCTTGGCTGGGTTTCGGGTGACAAGGCCAATGTCTTCGTTACCAAT
850 860 870 880 890 900

LCI CAAAGCTTCGACAACCTTGGCTGGGTTTCGGGTGACAAGGCTAACGTCTTCGTTACCAAC
850 860 870 880 890 900

JGI CACGACACAGAGCGCAATGGCGCTGCGCTCACCAACTCCTCACCTTCCAATACCTACGTT
910 920 930 940 950 960

LCI CACGACACAGAGCGAAACGGTGCTGCCCTCACCAACTCCTCACCTTCCAATACCTACGTT
910 920 930 940 950 960

JGI CTCGCCACCATATTCTCTCTCGCCATCCCTACGGCACTGTCACCGTCTCTCATCCTAT
970 980 990 1000 1010 1020

LCI CTTGCCACCATATTCTCCCTCGCCACCCCTACGGCACTGTCACCGTCTCTCATCCTAT
970 980 990 1000 1010 1020

JGI TCCGGCTTCGACACCAACTCTGACGCGGGCGCACCTAACGGCGGCACCGGTACTTGCTCT
1030 1040 1050 1060 1070 1080

LCI TCCGGCTTCGACACCAACTCTGATGCAGGCGCACCCAACGGCGGCACCGGTACTTGCTCT
1030 1040 1050 1060 1070 1080

```

          1090      1100      1110      1120      1130      1140
JGI      GGCACCGCGGCTCCAACGGCTGGTTCGCCAACATCGATGGATTGCTTTCCAGGGTATG
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
LCI      GGCACCGCGGCTCCAACGGCTGGTTCGCCAGCATCGATGGATTGCTTTCCAGGGTATG
          1090      1100      1110      1120      1130      1140

          1150      1160      1170      1180      1190      1200
JGI      ACCGCCTTCAGGAATACTGTCGGCAGCGCTGCCATCGCAAACGGCAGACTGGTCAAAC
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
LCI      ACTGCCTTCAGGAACACTGTCGGCAGTGTGCCATCGCAAACGGCAGACTGGTCAGAAC
          1150      1160      1170      1180      1190      1200

          1210      1220      1230      1240      1250      1260
JGI      TCGCAGATCGCCTTCGACCGGGGTACAGCTGGGTTTCGTTGCTATCAACAACGCCGACTCG
          :::::: :::::::::::::::::::::: ::::: ::::::::::::::::::::::::::::
LCI      TCGCAAAATCGCCTTCGACCGTGGTACCGCTGGGTTTCGTTGCTATCAACAACGCCGACTCG
          1210      1220      1230      1240      1250      1260

          1270      1280      1290      1300      1310      1320
JGI      CAGTGGGATGCCACCTGGAAGACTGGCTTGCCCGACGGTGTGTACTGCAACGTCATCTCC
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
LCI      CAGTGGGATGCCACCTGGAAGACTGGCTTGCCCGACGGTGTGTACTGCAACGTCATCTCC
          1270      1280      1290      1300      1310      1320

          1330      1340      1350      1360      1370      1380
JGI      GCGTCTTCTCGAGTGGTTCGTGCTCCGGTGGCACTGTCACTGTCAAGAACGGTGGTCAA
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
LCI      GCGTCTTCTCGAGTGGTTCGTGCTCCGGTGGCACTGTCACTGTCAAGAACGGTGGTCAA
          1330      1340      1350      1360      1370      1380

          1390      1400      1410      1420      1430      1440
JGI      ATCCCCTACAACCTTGCTTCTCGCAATGCTGTGCGCCATTCATACCAACGCCAAGCTCTCA
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
LCI      ATCCCCTACAACCTTGCTTCTCGCAATGCTGTGCGCCATTCATACCAACGCCAAGCTCTCA
          1390      1400      1410      1420      1430      1440

JGI      TAA
          :::
LCI      TAA

```

Auf Aminosäure-Ebene

```

>>LCI 480 bp (480 aa)
Waterman-Eggert score: 2537; 931.7 bits; E(1) < 0
99.4% identity (99.8% similar) in 480 aa overlap (1-480:1-480)

```

```

          10      20      30      40      50      60
JGI      MVKLTLPFVLA AVSSMAAGIVIPENSALETRSTGQSKAVIVQMF EWTWDSIASECTNFLG
          ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
LCI      MVKLTLPFVLA AVSSMAAGIVIPENSALETRSTGQSKAVIVQMF EWTWDSIASECTNFLG
          10      20      30      40      50      60

          70      80      90      100     110     120
JGI      PAGYGYVQTSPPQEHVTGDQWWDYQPVSYILTSKRGNRSQFANMISTCHKAGVKVIADT

```


α -Amylase aus *Pycnopus sanguineus* (Psan)

DNA-Sequenz (Signalpeptidsequenz unterstrichen):

ATGCTACGCCTCACGCTCCTTGCCTCTCTGCTTGCCGCGTCCGCCTTCGCGGCCTCTCCGG
ATCAATGGCGGAATCGGTCAATaTACCAGTTGGTAACAGATCGATTCCGCCACCTCGGATGG
 GTCAAGTCCTGCATGCGATACCTCCCAGCGCCAGTATTGTGGcGGTACTTGGCAAGGCATC
 GTCAAGAAGCTCGATTACATCCAGAACATGGGCTTCGATGctATcTGGATCTCCCCTATTG
 TCGCGAACTTGGAGGGAAAAtACGTCTTACGGTGAAGCCTATCATGGGTACTGGACGCAGaA
 CATtAACGCGCTTAATTACACTTTCGGTAGCgCGGATGATCTCAAGGCGCTGAGcgaTGCT
 CTGCAtAAACGCGGCATGTACCTGATGGTCGAcGTGCTCGTGAACCACATGGCgGGCACCG
 CGGATCCTCCCAAtTTCTCTGCGTTCCAGCCATTTTCTTCTCAATCaAACTAtCACTCCGA
 GTGCTTCATATCGAACTACGACAACCAAACcAgGTCGAGCAATGCTGGcTGGGAGACAAG
 AATGTTCCCTTGGTgGATTTGGAtActGAGGATaCGAACATCGTCAGCgCCATGAACACTT
 GGGTATCCACTTTGGCTAGCAACTTCAGCGTCGATGGCCTTCGGATCGACACTGTCAAACA
 CGTGCGGAAGGATTTCTGGCCTGATTTCCGCAAGGCTTCGGGTGTCTTCACGATAGGCGAG
 GTCCTTCATAACGAGACAGaCTATGTGTGTCAGCATACTGAGGTGATTGATAGCGTACTGG
 ACTATCCTACaTGGTTCCCACTCGTGGCAGctTTTCAAACCACGGGGGGCAATCTGTGTCAGC
 GCTCTCCGCCACTGTACAaCAAGCCCAGTCGGCCTACAAGAACGGCGAATTcATGACCGGT
 TCTTTCTCGAGAACCACGACCAACCTCGGTTCCAGTctCTTACCCAGGACGACGCTTTGA
 TCAGGAATGCAATGACATGGCCATTCGTTCAAGACGGAGTGCCTATCATGTACTATGGTCA
 gGAACAGTCTTACGGTGGAGGGCCTGACCCAGCCAATCGCGAAGCCTTATGGCTGTCCGGa
 TACGTGCAAGACAAACCTCTCGTcAAACACGTGCAGGCAaTGAACGGCGCAAGaAAGGCgG
 CCATATCAGCGAACAGCAACTACCTCACTACTGCGGTtAAGTTTTGTCCAGCGGctCCGA
 ATCTACTCTTGCCGTCTCAAAACCACCCATGCTCGCTCTTCTCACCAATGGCGGCAGTTC
 TCCAATCCGTCATGGTCTGTTCCAAGTGCCGGCTTCAGCGCGAAtGAGGAACTTGTGATG
 TGTTGACCTGCAGCAAGCTCAATGCGGATAGCAACGGAGGTGTGAGCGTGCAAGGGTCTGC
 TGGGAGTCCTCAGGTCTCATGCCGGTTTTCGTTCGTTGAGCAAGTCCGGGAACGTGTGCTCG
 AGCCTCGCGACGGGCGGTGAGGCTCGTCTGCGCGcGGATGGTTCCGgAGGCGCAGTGGAGT
 CGCTGCCACTCATCGCGGctTTCTTGCTCGCCGGTTGGGCTGCGCAATCCAGCCTCATCAT
 TGTCTGA

Aminosäure-Sequenz (Signalpeptid unterstrichen):

MLRLTLLASLLAASAFAASPDQWRNRSIYQLVTDRFATSDGSSPACDTSQRQYCGGTWQGI
VKKLDYIQNMGFDAIWISPIVANLEGNTSYGEAYHGYWTQNINALNSHFGSADDLKALSDA
 LHKRGMVLMVDVVVNHMAGTADPPNFSAFQPFSSQSNYHSECFISNYDNQTEVEQCWLGDK
 NVPLVDLDTEDTNIVSAMNTWVSTLASNFSVDGLRIDTVKHVRKDFWPDFAKASGVFTIGE
 VLHNETDYVSAYTEVIDSVLDYPTWFPLVAAFQTTGGNLSALSATVQQAQSAYKNGEFMTG
 SFLENHDQPRFQSLTQDDALIRNAMTWPFVQDGVPIMYYGQEQSYGGGPD PANREALWLSG
 YVEDKPLVKHVQAMNGARKAAISANSNYLTTAVKFLSSGSESTLAVSKPMLALLTNGGSS
 SNPSWSVPSAGFSANEELVDVLTCSKLNADSNGGVSVQGSAGSPQVLMPVSSLSKSGNVCS
 SLATGGQASSARGWFGGAVESLPLIAAFLLAGWAAQSSLIIV*

Alignments:

Auf DNA- Ebene:

```

>>LCI strain 1593 bp (1593 nt)
Waterman-Eggert score: 7560; 595.3 bits; E(1) < 1.6e-173
97.2% identity (97.2% similar) in 1593 nt overlap (1-1593:1-1593)

      10      20      30      40      50      60
JGI   ATGCTACGCCTCACGCTCCTTGCCTCTCTGCTTGCCGCGTCCGCCTTCGCGGCCTCTCCG
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
LCI   ATGCTACGCCTCACGCTCCTTGCCTCTCTGCTTGCCGCGTCCGCCTTCGCGGCCTCTCCG
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90      100     110     120
JGI   GATCAATGGCGGAATCGGTCAATTTACCAGTTGGTAACAGATCGATTGCCACCTCGGAT
      ::::::::::::::: : ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
LCI   GATCAATGGCGGAATCGGTCAATATAACCAGTTGGTAACAGATCGATTGCCACCTCGGAT
      70      80      90      100     110     120

      130     140     150     160     170     180
JGI   GGGTCAAGTCTTCATGCGATACCTCCCAGCGCCAGTATTGTGGTGGTACTTGGCAAGGC
      :::::::::::::::::::::::::::::::::::::: : ::::::::::::::
LCI   GGGTCAAGTCTTCATGCGATACCTCCCAGCGCCAGTATTGTGGCGGTACTTGGCAAGGC
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
JGI   ATCGTCAAGAAGCTCGATTACATCCAGAACATGGGCTTCGATGCCGTTTGGATCTCCCCT
      :::::::::::::::::::::::::::::::::::::: : ::::::::::::::
LCI   ATCGTCAAGAAGCTCGATTACATCCAGAACATGGGCTTCGATGCTATCTGGATCTCCCCT
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
JGI   ATTGTCGCGAACTTGGAGGGAAACACGTCTTACGGTGAAGCCTATCATGGGTACTGGACG
      ::::::::::::::::::::::::::::::: : ::::::::::::::::::::::
LCI   ATTGTCGCGAACTTGGAGGGAAAATACGTCTTACGGTGAAGCCTATCATGGGTACTGGACG
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
JGI   CAGGACATCAACGCGCTTAATTCACACTTCGGTAGCACGGATGATCTCAAGGCGCTGAGT
      ::: : :: : ::::::::::::::::::::::::::::::: : ::::::::::::::
LCI   CAGAACATTAACGCGCTTAATTCACACTTCGGTAGCGCGGATGATCTCAAGGCGCTGAGC
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
JGI   AGTGCTCTGCACAAACGCGGCATGTACCTGATGGTCGATGTCGTCGTGAACCACATGGCA
      :::::::::: : ::::::::::::::::::::::: : ::::::::::::::
LCI   GATGCTCTGCATAAACGCGGCATGTACCTGATGGTCGACGTCGTCGTGAACCACATGGCG
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
JGI   GGCACCGCGGATCCTCCCAACTTCTCTGCGTTCCAGCCATTTTCTTCTCAATCGAACTAC
      ::::::::::::::: : ::::::::::::::::::::::: : ::::::
LCI   GGCACCGCGGATCCTCCCAATTTCTCTGCGTTCCAGCCATTTTCTTCTCAATCAAATAT
      430     440     450     460     470     480

      490     500     510     520     530     540
JGI   CACTCCGAGTGCTTCATATCGAACTACGACAACCAAACCTAATGTCGAGCAATGCTGGTTG
      ::::::::::::::: : ::::::::::::::: : :
LCI   CACTCCGAGTGCTTCATATCGAACTACGACAACCAAACCGAGGTCGAGCAATGCTGGCTG

```

	490	500	510	520	530	540
	550	560	570	580	590	600
JGI	GGAGACAAGAATGTTCCCTTGGTAGATTTGGACACCGAGGATTCGAACATCGTCAGCACC					

LCI	GGAGACAAGAATGTTCCCTTGGTAGATTTGGATACTGAGGATACGAACATCGTCAGCGCC					
	550	560	570	580	590	600
	610	620	630	640	650	660
JGI	ATGAACACTTGGGTATCCACTTTGGCTAGCAACTTCAGCGTCGATGGCCTTCGGATCGAC					

LCI	ATGAACACTTGGGTATCCACTTTGGCTAGCAACTTCAGCGTCGATGGCCTTCGGATCGAC					
	610	620	630	640	650	660
	670	680	690	700	710	720
JGI	ACTGTCAAACACGTGCGGAAGGATTTCTGGCCTGATTTTCGCCAAGGCTTCGGGTGTCTTC					

LCI	ACTGTCAAACACGTGCGGAAGGATTTCTGGCCTGATTTTCGCCAAGGCTTCGGGTGTCTTC					
	670	680	690	700	710	720
	730	740	750	760	770	780
JGI	ACGATAGGCGAGGTCCTTCATAACGAGACAGGCTATGTGTCAGCATACTGAGGTGATT					

LCI	ACGATAGGCGAGGTCCTTCATAACGAGACAGACTATGTGTCAGCATACTGAGGTGATT					
	730	740	750	760	770	780
	790	800	810	820	830	840
JGI	GATAGCGTACTGGACTATCCTACTTGGTTCCCACCTCGTGGCAGCGTTTTCAAACCACGGGG					

LCI	GATAGCGTACTGGACTATCCTACATGGTTCCCACCTCGTGGCAGCGTTTTCAAACCACGGGG					
	790	800	810	820	830	840
	850	860	870	880	890	900
JGI	GGCAATCTGTCAGCGCTCTCCGCCACTGTACAGCAAGCCCAGTCGGCCTACAAGAACGGC					

LCI	GGCAATCTGTCAGCGCTCTCCGCCACTGTACAACAAGCCCAGTCGGCCTACAAGAACGGC					
	850	860	870	880	890	900
	910	920	930	940	950	960
JGI	GAATTTATGACCGGTTCTTTCCCTCGAGAACCACGACCAACCTCGGTTCCAGTCCCTTACC					

LCI	GAATTCATGACCGGTTCTTTCCCTCGAGAACCACGACCAACCTCGGTTCCAGTCTCTTACC					
	910	920	930	940	950	960
	970	980	990	1000	1010	1020
JGI	CAGGACGACGCTTTGATCAGGAATGCAATGACATGGCCATTCGTTCAAGACGGAGTGCCT					

LCI	CAGGACGACGCTTTGATCAGGAATGCAATGACATGGCCATTCGTTCAAGACGGAGTGCCT					
	970	980	990	1000	1010	1020
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
JGI	ATCATGTACTATGGTCAAGAACAGTCTTACGGTGGAGGGCCTGACCCAGCCAATCGCGAA					

LCI	ATCATGTACTATGGTCAAGAACAGTCTTACGGTGGAGGGCCTGACCCAGCCAATCGCGAA					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
JGI	GCCTTATGGCTGTCCGGCTACGTGCAAGACAAACCTCTCGTGAAACACGTGCAGGCACTG					

LCI	GCCTTATGGCTGTCCGGATACTGTCGAAGACAAACCTCTCGTCAAACACGTGCAGGCAATG					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140

```

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
JGI AACGGCGCAAGGAAGGCCCATATCAGCGAACAGCAACTACCTCACTACTGCGGTCAAG
      .....
LCI AACGGCGCAAGAAAGGCCCATATCAGCGAACAGCAACTACCTCACTACTGCGGTAAAG
      1150      1160      1170      1180      1190      1200

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
JGI TTTTTGTCCAGCGGCACCGAATCTACTCTTGCCGTCTCAAACCACCCATGCTCGCTCTT
      .....
LCI TTTTTGTCCAGCGGCTCCGAATCTACTCTTGCCGTCTCAAACCACCCATGCTCGCTCTT
      1210      1220      1230      1240      1250      1260

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
JGI CTCACCAATGGCGGCAGTTCCTCCAATCCGTTCATGGTCTGTTCCAAGTGCCGGCTTCAGC
      .....
LCI CTCACCAATGGCGGCAGTTCCTCCAATCCGTTCATGGTCTGTTCCAAGTGCCGGCTTCAGC
      1270      1280      1290      1300      1310      1320

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
JGI GCGAACGAGGAACTTGTCGATGTGTTGACCTGCAGCAAGCTCAATGCGGATAGCAACGGA
      .....
LCI GCGAATGAGGAACTTGTCGATGTGTTGACCTGCAGCAAGCTCAATGCGGATAGCAACGGA
      1330      1340      1350      1360      1370      1380

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
JGI GGTGTGAGCGTGCAAGGGTCTGCTGGGAGTCTCAGGTCTCATGCCGGTTTCGTCGTTG
      .....
LCI GGTGTGAGCGTGCAAGGGTCTGCTGGGAGTCTCAGGTCTCATGCCGGTTTCGTCGTTG
      1390      1400      1410      1420      1430      1440

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
JGI AGCAAGTCCGGGAACGTGTGCTCGAGCCTCGCGACGGGCGGTCAGGCCTCGTCTGCGCGG
      .....
LCI AGCAAGTCCGGGAACGTGTGCTCGAGCCTCGCGACGGGCGGTCAGGCCTCGTCTGCGCGC
      1450      1460      1470      1480      1490      1500

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
JGI GGATGGTTCGGCGGCGCAGTGGAGTCGCTGCCACTCATCGCGGCTTCTTGCTCGCCGGT
      .....
LCI GGATGGTTCGGAGGCGCAGTGGAGTCGCTGCCACTCATCGCGGCTTCTTGCTCGCCGGT
      1510      1520      1530      1540      1550      1560

      1570      1580      1590
JGI TGGGCTGCGCAATCCAGCCTCATCATTGTCTGA
      .....
LCI TGGGCTGCGCAATCCAGCCTCATCATTGTCTGA
      1570      1580      1590
```


Aminosäure-Ebene

```

>>LCI strain 530 bp (530 aa)
Waterman-Eggert score: 3473; 802.4 bits; E(1) < 0
98.1% identity (99.8% similar) in 530 aa overlap (1-530:1-530)

      10      20      30      40      50      60
JGI  MLRLTLLASLLAASAFASPQWRNRSIYQLVTDRFATSDGSSPACDTSQRQYCGGTWQG
      .....
LCI  MLRLTLLASLLAASAFASPQWRNRSIYQLVTDRFATSDGSSPACDTSQRQYCGGTWQG
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
JGI  IVKKLDYIQNMGFDAVWISPIVANLEGNTSYGEAYHGYWTQDINALNSHFGSTDDLKALS
      .....
LCI  IVKKLDYIQNMGFDAIWISPIVANLEGNTSYGEAYHGYWTQININALNSHFGSADDLKALS
      70      80      90     100     110     120

      130     140     150     160     170     180
JGI  SALHKRGMVLMVDVVVNHMAGTADPPNFAFQPFSSQSNYHSECFISNYDNQTNVEQCWL
      .....
LCI  DALHKRGMVLMVDVVVNHMAGTADPPNFAFQPFSSQSNYHSECFISNYDNQTEVEQCWL
      130     140     150     160     170     180

      190     200     210     220     230     240
JGI  GDKNVPLVDLDTEDSNIVSTMNTWVSTLASNFSVDGLRIDTVKHVRKDFWPDFAKASGVF
      .....
LCI  GDKNVPLVDLDTEDTNIVSAMNTWVSTLASNFSVDGLRIDTVKHVRKDFWPDFAKASGVF
      190     200     210     220     230     240

      250     260     270     280     290     300
JGI  TIGEVLHNETGYVSAYTEVIDSVLDYPTWFPLVAAFQTTGGNLSALSATVQQAQSAYKNG
      .....
LCI  TIGEVLHNETDYVSAYTEVIDSVLDYPTWFPLVAAFQTTGGNLSALSATVQQAQSAYKNG
      250     260     270     280     290     300

      310     320     330     340     350     360
JGI  EFMTGSFLENHDQPRFQSLTQDDALIRNMTWPFVQDGVPIIMYYGQEQSYGGGPDPANRE
      .....
LCI  EFMTGSFLENHDQPRFQSLTQDDALIRNMTWPFVQDGVPIIMYYGQEQSYGGGPDPANRE
      310     320     330     340     350     360

      370     380     390     400     410     420
JGI  ALWLSGYVEDKPLVKHVQALNGARKAAISANSNYLTTAVKFLSSGTESTLAVSKPPMLAL
      .....
LCI  ALWLSGYVEDKPLVKHVQAMNGARKAAISANSNYLTTAVKFLSSGSESTLAVSKPPMLAL
      370     380     390     400     410     420

      430     440     450     460     470     480
JGI  LTNGGSSSNPSWSVPSAGFSANEELVDVLTCSKLNADSNGGVSVQGSAGSPQVLMPVSSL
      .....
LCI  LTNGGSSSNPSWSVPSAGFSANEELVDVLTCSKLNADSNGGVSVQGSAGSPQVLMPVSSL
      430     440     450     460     470     480

      490     500     510     520     530
JGI  SKSGNVCSSLATGGQASSARGWFGGAVESLPLIAAFLLAGWAAQSLLIIV
      .....
LCI  SKSGNVCSSLATGGQASSARGWFGGAVESLPLIAAFLLAGWAAQSLLIIV
      490     500     510     520     530

```

α -Amylase aus *Rhizoctonia solani* (Rso)

DNA-Sequenz (Signalpeptidsequenz unterstrichen):

ATGTTTGAGTGGTCATGGGATAGTATTGCTGCAGAATGCACCAGCTTCATCGGTCCTGCTG
GATATGGATATGTCCAGGTGTCTCCCCAGCCGAACACATCACCGGCTCGCAGTGGTGGAC
 TGACTATCAGCCTGTTTCGTACATACTTACCTCGAAGCGAGGGAGCAGAAGCCAGTTCCAG
 AATATGATTACCACGTGCAAGGCTGCCGGGGTTGGTGTGATTGCAGATACTCTGTAAACC
 ATATGGCCGGTATCGATAGTGGAACTGGCGTTGCCGGGTCTTCGTTACGCACCTATAACTA
 CCCC~~GGAATCTACCAGACCCAGGACTTCCATCACTGCGGCCTGGAATCAGGTGACGACATA~~
 GTCAACTATAGCAATCGCGTCGAAGTCCAGACTTGC~~GAACTGGTGAACCTGGCTGACCTTG~~
 CTACTGATACCGAGTATGTGCGTGCTCGGCTTGCAACCTACGTAAACGATCTACTGTGCTT
 GGGTGTGGTAGGCCTACGACTTGATGCCGCGAAACATATTCCTGCTGGTGACATTGCCAAC
 ATTCTTGGTCTGTTTGGAGTTCGGCACCCATGTTACTCAAGAGGTTATTTATGGCAGCGGAG
 AGCCGATTCAACCCTCGGAATATAACCGGGAATGGTGTGTACAGGAGTTCGCTACACATC
 GGCACCTCAGAGTGCTTTCCAGAGTGGTGGGATCTCATCACTGAACGATCTTGACAGCAGA
 GGATGGGTTTTCTTCCAGCAATGCGAATGTATTTGTCTCCAACCACGATACCGAACGAGGCG
 GGTCTCTCTTAACTACAAGTCTGGCTCGACCTACACACTTGCTCACATCTTCATGCTTGC
 ATACCCTTATGGAACCTACCGTCTTGTCTTCTTACACCTTCTCAGACAACGATGCTGGC
 AGTCCATCGAGTGGTGCAGGCTCTTGTCTCCGGATCTGGCGGTGCGAACGGATGGCAATGCC
 AGCACCGCTGGACTGCAATCGCAGGAATGGTCAAGTGGCGCAATGGAGTGACTGGCAGTGT
 CAACAAC~~TGGTCAACCGGTACCAACCAGCAGATTGCCTTTGGTCGCGGGTCCACTGGGTTT~~
 GTAGTTATCAACAACCGGACTCTGCATGGACCAGGACGTTACAGACACCCCTCGCTGCCA
 ACTCATACTGCGACATAATCTCCGGGGCAGCAGGA~~ACTAGTGGGACGTGTACTGGAGCATC~~
 GTACACGATCTCCGGTGGAACTTTACCCTACAGTCCCTGCGAGGTCTGCAATTGCTTTG
 TTTACTGGGGCGATTGGGTCCGGATCGAGCAATAGCGGATCCGTGTCTATCTCTTTAGTG
 TATATGCAGAGACCCTTTTGGTGACAATATCTTCGTGTCTGGAAGTATTTTCGCAACTCGG
 TACATGGGCACCAGGTAGCTCGATCGCAATGTCTCAGCTTCTATCTACATGGACTGCC
 ACTGTGACTCTCCAGCTGGTACTGCGTTCTCTTATAAATATCTCCGTAAGACCTCCAGCG
 GCACGGTTCGTATGGGAATCGGATCCTAACCGCTCTGCTACCGCCTCCTCGTCCGGCACATT
 GACGCTTAGCGATACTTGGCGGTGA

Aminosäure-Sequenz (Signalpeptid unterstrichen):

MFESWDSIAAECTSFIGPAGYGYVQVSPPAEHITGSQWWDYQPVSYILTSKRGSRSQFQ
NMITTCKAAGVGVIADTLLNHMAGIDSGTVAGSSFTHYNYPGIYQTQDFHHCGLGSGDDI
 VNYSNRVEVQTCELVNLADLATDTEYVRARLATYVNDLLSLGVVGLRLDAAKHIPAGDIAN
 ILGRLSSAPYVTQEVIYGSGEPIQPSEYTGNGDVQEFRYTSALQSAFQSGGISSLNDLDSR
 GWVSSSNANVFNHDERGGSSLNKSGSTYTLAHIFMLAYPYGTPTVLSSYTFSDNDAG
 SPSSGAGSCSGSGGANGWQCQHRWTAIAGMVKWRNGVTGSVNNWVTGTNQQIAFGRGSTGF
 VVINNADSAWTRTFTTPLAANSYCDIISGAAGTSGTCTGASYTISGGTFTATVPARSAIAL
 FTGAIGSGSSNSGSVSI SFSVYAETTFGDNIFVSGSISQLGTWAPGSSIAMSSASYPTWTA
 TVTLPAGTAFSYKYLRKTSSGTVVWESDPNRSATASSSGTLTLSDTWR*

Alignments:

Auf DNA- Ebene:

```

>>LCI 1611 bp (1611 nt)
Waterman-Eggert score: 4470; 365.0 bits; E(1) < 3.7e-104
74.9% identity (74.9% similar) in 1632 nt overlap (109-1737:1-1611)

      110      120      130      140      150      160
JGI   ATGTTCGAATGGAGTTGGGATAGCATTGCGGCAGAGTGTACCAACTTCATTGGCCCCGCG
      :::::  ::  :::  :::::  :::::  :::::  ::  :::  :::::  ::  ::  ::
LCI   ATGTTTGGAGTGGTCATGGGATAGTATTGCTGCAGAATGCACCAGCTTCATCGGTCTCTGCT
           10          20          30          40          50          60

      170      180      190      200      210      220
JGI   GGCTATGGATTTCGTCAGGTTTCTCCTCCAGCGGAGCATATTGCTGGTTCGCAATGGTGG
      ::  :::::  :::::  :::::  :::::  ::  ::  ::  :  ::  :::::  :::::
LCI   GGATATGGATATGTCCAGGTGTCTCCCCAGCCGAACACATCACCAGGCTCGCAGTGGTGG
           70          80          90          100         110         120

      230      240      250      260      270      280
JGI   ACCGATTACCAACCGGTCTCATAACACTGACTTCGAAGCGGGGTAATAGGAGTCAGTTC
      ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  :::::  ::  ::  :::::  ::  :  ::  ::  :::::
LCI   ACTGACTATCAGCCTGTTTCGTACATACTTACCTCGAAGCGAGGGAGCAGAAGCCAGTTC
           130         140         150         160         170         180

      290      300      310      320      330      340
JGI   CAGAAATATGGTCAGCAAATGCAAGAGTGCTGGGGTTCGGGGTCATTGCGGATACCATATTC
      :::::  ::  ::  ::  :::::  ::  :::::  ::  ::  :::::  :::::  :  ::
LCI   CAGAAATATGATTACCACGTGCAAGGCTGCCGGGGTTGGTGTGATTGCAGATACTCTGTTA
           190         200         210         220         230         240

      350      360      370      380      390      400
JGI   AACCACATGGCTGGTATCGAGGGTGGGACGGGAGTTGCGGGATCTTCTTTTACCCACTAT
      :::::  :::::  :::::  :::::  ::  ::  ::  :::::  ::  ::  :::::
LCI   AACCATATGGCCGGTATCGATAGTGGAAGTGGCGTTGCCGGGTCTTCGTTTCACGCACTAT
           250         260         270         280         290         300

      410      420      430      440      450      460
JGI   AACTACCCTGGAATATACCAGACTCAAGACTTCCACCCTGTGGCTTGCAGCCCGGAGAC
      :::::  :::::  :::::  ::  :::::  :::::  ::  ::  ::  :  ::  ::  ::
LCI   AACTACCCCGGAATCTACCAGACCCAGGACTTCCATCACTGCGGCCCTGGAATCAGGTGAC
           310         320         330         340         350         360

      470      480      490      500      510      520
JGI   GACATCGTCAACTATAATAACCGCGCTGAAGTCCAAACGTGCGAGCTGGTCAATCTAGCC
      :::::  :::::  ::  :::::  :::::  ::  :::::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
LCI   GACATAGTCAACTATAGCAATCGCGTCCGAGTCCAGACTTGCGAACCTGGTGAACCTGGCT
           370         380         390         400         410         420

      530      540      550      560      570      580
JGI   GATCTAGCGACCGAGACCGAATATGTTTCGTGGCAAGCTTGCAGCTTATGCCAATGATCTC
      ::  ::  ::  ::  ::  :::::  :::::  :::::  :::::  ::  ::  :  ::  :::::
LCI   GACCTTGCTACTGATACCGAGTATGTGCGTGCTCGGCTTGCAACCTACGTAAACGATCTA
           430         440         450         460         470         480

      590      600      610      620      630      640
JGI   CTGTCCTTGGGTGTGGTAGGGCTCCGCCTTGATGCTGCCAAACACATTGCGTCTGGTGAT
      :::::  :::::  :::::  ::  ::  :::::  ::  ::  ::  ::  ::  ::  ::

```

```

LCI   CTGTCGTTGGGTGTGGTAGGCCTACGACTTGATGCCGCGAAACATATTCCTGCTGGTGAC
      490      500      510      520      530      540

      650      660      670      680      690      700
JGI   ATTGCCAACATCCTTGGCAGACTAACCTCGAGGCCTTACATCACTCAAGAGGTCATCTTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   ATTGCCAACATTCTTGGTCGTTTGGAGTTCGGCACCCCTATGTTACTCAAGAGGTTATTTAT
      550      560      570      580      590      600

      710      720      730      740      750      760
JGI   GGGAGCGGAGAGCCGATCTTACCTTCGGAATATACTGGCAATGGCGACGTACAGGAGTTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   GGCAGCGGAGAGCCGATTCACCCTCGGAATATAACCGGAATGGTGATGTACAGGAGTTC
      610      620      630      640      650      660

      770      780      790      800      810      820
JGI   CGCTACACCTCGACCATTCAGAAATGCATTCCAGAGCGGCGGAATCTCGTCTTTGAATGGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   CGCTACACATCGGCACCTTCAGAGTGCTTCCAGAGTGGTGGGATCTCATCACTGAACGAT
      670      680      690      700      710      720

      830      840      850      860      870      880
JGI   CTTGAGAACCGAGGTTGGATCGCTTCTGGTGGTGCTAACGTATTTGTTGCAAACCACGAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   CTTGACAGCAGAGGATGGGTTTCTTCCAGCAATGCGAATGTATTTGTCTCCAACCACGAT
      730      740      750      760      770      780

      890      900      910      920      930      940
JGI   ACAGAGCGTAACGGTGCATCGCTCACCTACAAATCTGGGTCTATATATACGCTTGCTCAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   ACCGAACGAGGCGGGTCTCTTAACTACAAGTCTGGCTCGACCTACACACTTGCTCAC
      790      800      810      820      830      840

      950      960      970      980      990      1000
JGI   GTATTCATGTTAGCTTATCCTTATGGAATCCCACTGTTCTATCCTCTTACACGTTCTCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   ATCTTCATGCTTGCATACCCTTATGGAATCCTACCGTCTTGTCTTCTTACACCTTCTCA
      850      860      870      880      890      900

      1010      1020      1030      1040      1050      1060
JGI   AACACGATGCTGGTAGCCCTCGAATGGTGCCTGGATCATGTTCTGGCTCCGGAGGTGCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   GACAACGATGCTGGCAGTCCATCGAGTGGTGCAGGCTCTTGCTCCGGATCTGGCGGTGCC
      910      920      930      940      950      960

      1070      1080      1090      1100      1110      1120
JGI   AATGGGTGGCAATGCCAACACCGATGGGGCGCCGTTGCAGGAATGGTCAAATGGCGCAAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   AACGGATGGCAATGCCAGCACCGCTGGACTGCAATCGCAGGAATGGTCAAAGTGGCGCAAT
      970      980      990      1000      1010      1020

      1130      1140      1150      1160      1170      1180
JGI   GGAGTGACCGGCAGCATTAATAACTGGGTGAGTGGTACGAACCAGCAAATCGCCTTTGGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   GGAGTGACTGGCAGTGTCAACAACCTGGGTACCGGTACCAACCAGCAGATTGCCTTTGGT
      1030      1040      1050      1060      1070      1080

      1190      1200      1210      1220      1230      1240
JGI   CGAGGTTCAAGTGGATTTGTAGTAATCAATAACGCCGACTCTGCATGGACTAGGACATTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
LCI   CGCGGGTCCACTGGGTTTGTAGTTATCAACAACGCCGACTCTGCATGGACCAGGACGTTTC
      1090      1100      1110      1120      1130      1140

```

```

1250      1260      1270      1280      1290      1300
JGI      ACAACCTCACTCGCCGCTAACTCGTACTGTGATGTGGTCTCCGG---AGATGTTAGTGGT
      :: :: : ::::: :: ::::: ::::: :: : ::::: :: : : : ::
LCI      ACGACACCCCTCGCTGCCAACTCATACTGCGACATAATCTCCGGGGCAGCAGGAAC TAGT
      1150      1160      1170      1180      1190      1200

      1310      1320      1330      1340      1350      1360
JGI      GGCAAGTGCCTGCTGCTACACGGTTTCCGGGGGATCCTTCACCGCGACGGTCCCT
      :: : ::::: ::::: :: ::::: : ::::: ::::: ::::: :: :::::
LCI      GGGACGTGTACTGGAGCATCGTACACGATCTCCGGTGGAACTTTACCGCTACAGTCCCT
      1210      1220      1230      1240      1250      1260

      1370      1380      1390      1400      1410      1420
JGI      GCCAAGTCTGCTATAGCCCTTTTCACTGGCGCATTTGGAACAGGATCTGGAATGGGGGA
      :: : ::::: :: :: : :: ::::: ::::: : ::::: : ::::: : ::::
LCI      GCGAGGTCTGCAATTGCTTTGTTACTGGGGCGATTGGGTCCGGATCGAGCAATAGCGGA
      1270      1280      1290      1300      1310      1320

      1430      1440      1450      1460      1470      1480
JGI      GCGGAGGAGGAGGTGGGGGATCTGTACCGTCAACTTTTCGAGTAAACGCAGAAACCACT
      ::      ::      ::::: :: : ::::: : ::::: : ::::: : :::::
LCI      TCCG-----TG-----TCTATCTTTCA-----GTGTATATGCAGAGACCACT
      1330      1340      1350

      1490      1500      1510      1520      1530      1540
JGI      TTTGGCGATAACATTTTCCTTGTGGAAGTTTATCACAGCTCGGCACATGGGCTCCAGCT
      ::::: :: : :: : ::::: : ::::: : ::::: : ::::: : ::::: : :::::
LCI      TTTGGTGACAATATCTTCGTGTCTGGAAGTATTTGCAACTCGGTACATGGGCACCAGGT
1360      1370      1380      1390      1400      1410

      1550      1560      1570      1580      1590      1600
JGI      AGTTCGATTGCAATGTCTTCGGCTTCTTACCCTACATGGACCGTCAGCGTATCCATCCCG
      :: ::::: ::::: :: ::::: :: ::::: : ::::: : ::::: : :::::
LCI      AGCTCGATCGCAATGTCTTCAGCTTCCCTATCTTACATGGACTGCCACTGTGACTCTCCA
1420      1430      1440      1450      1460      1470

      1610      1620      1630      1640      1650      1660
JGI      GCGGGCACTGCGTTTTCTTACAAGTATATTCGAAAGACTGCAAGTGGATCGGTGGTATGG
      :: : ::::: ::::: :: ::::: : ::::: : ::::: : ::::: : :::::
LCI      GCTGGTACTGCGTTCTTATAAATATCTCCGTAAGACCTCCAGCGGCACGGTTCGTATGG
1480      1490      1500      1510      1520      1530

      1670      1680      1690      1700      1710      1720
JGI      GAATCGGATCCTAACCGCAGCGCCACTGCTCCATCATCTGGCAGTTCGACCTTGAATGAC
      ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
LCI      GAATCGGATCCTAACCGCTCTGCTACCGCCTCCTCGTCCGGCACATTGACGCTTAGCGAT
1540      1550      1560      1570      1580      1590

      1730
JGI      ACTTGGCGATAA
      ::::: : :
LCI      ACTTGGCGGTGA
1600      1610

```

Aminosäure-Ebene

```

>>LCI 536 bp (536 aa)
Waterman-Eggert score: 2441; 801.2 bits; E(1) < 0
82.7% identity (95.4% similar) in 543 aa overlap (37-578:1-536)

      40          50          60          70          80          90
JGI  MFESWDSIAAECTNFIGPAGYGFVQVSPPAEHIAGSQWWTDYQPVSYTLTSKRGNRSQF
      .....
LCI  MFESWDSIAAECTSFIGPAGYGYVQVSPPAEHITGSQWWTDYQPVSYILTSGRGSRSQF
      10          20          30          40          50          60

      100         110         120         130         140         150
JGI  QNMVSKCKSAGVGVIA DTIFNHMAGIEGGTGVAGSSFTHYNYPGIYQTQDFHHCGLQPGD
      .....
LCI  QNMITTKAAGVGVIA DTLLNHMAGIDSGTGVAGSSFTHYNYPGIYQTQDFHHCGLLES GD
      70          80          90          100         110         120

      160         170         180         190         200         210
JGI  DIVNYNNRAEVQTCELVNLADLATEYVRGKLAAYANDLLSLGVVGLRLDAAKHIASGD
      .....
LCI  DIVNYSNRVEVQTCELVNLADLATDTEYVRARLATYVNDLLSLGVVGLRLDAAKHIPAGD
      130         140         150         160         170         180

      220         230         240         250         260         270
JGI  IANILGRLTSRPYITQEVIFGSGEPILPSEYTGNGDVQEFRYTSTIQNAFQSGGISLNG
      .....
LCI  IANILGRLSSAPYVTQEVLYGSGEPIQPSEYTGNGDVQEFRYTSALQSAFQSGGISLND
      190         200         210         220         230         240

      280         290         300         310         320         330
JGI  LENRGWIASGGANVFVANHDTERNGASLTYKSGSIYTLAHVFLAYPYGTPTVLSSYTF S
      .....
LCI  LDSRGWVSSSNANVFVSNHDTERGGSSLNKSGSTYTLAHIFMLAYPYGTPTVLSSYTF S
      250         260         270         280         290         300

      340         350         360         370         380         390
JGI  NNDAGSPSNGAGSCSGSGGANGWQCQHRWGAVAGMVKWRNGVTGSINNWWSGTNQQIAFG
      .....
LCI  DNDAGSPSSGAGSCSGSGGANGWQCQHRWTAIAGMVKWRNGVTGSVNNVWTGTNQQIAFG
      310         320         330         340         350         360

      400         410         420         430         440         450
JGI  RGSSGFVVINNADSAWTRTF TTS LAANSYCDVVSGDV-SGGKCTGASYTVSGGSFTATVP
      .....
LCI  RGSTGFVVINNADSAWTRTF TPLAANSYCDIISGAAGTSGTCTGASYTISGGTFTATVP
      370         380         390         400         410         420

      460         470         480         490         500         510
JGI  AKSAIALFTGAIGTSGNGGGGGGGGGSVTVNFRVNAETTFGDNIFLVGSLSQLGTWAPA
      .....
LCI  ARSAIALFTGAIGSGSSNSG-----SVSISFSVYAETTFGDNIFVSGSISQLGTWAPG
      430         440         450         460         470

      520         530         540         550         560         570
JGI  SSIAMSSASYPTWTVSVSIPAGTAFSYKYIRKTASGSVVWESDPNRSATAPSSGSSTLND
      .....
LCI  SSIAMSSASYPTWTATVTL PAGTAFSYKYLRKTSSSGTVVWESDPNRSATASSGTLTLSD
      480         490         500         510         520         530

```

JGI	TWR
	:::
LCI	TWR

α -Amylase aus *Trametes hirsuta* (Thi)

DNA-Sequenz (Signalpeptidsequenz unterstrichen):

ATGTCAAACTGGGTCAAGCTCGCCGCACTCGCCGCCCTCGGAGTGTTCTGCACCGCCGCCG
TCGACGCCCCGCCCTACTGTCTTTGACGCCGGTGCGGACGCACACTCGCTGCATGCCCGGGC
 CCCCTCCGGCAGCAAGGATGTCATCATCCAGATGTTTGGAGTGGAACTGGGACAGCGTCGCT
 GCCGAGTGACTAACTTCATCGGCCCGCCGGGTACGGCTTCGTGCAAGTGAGCCCCGCC
 AGGAGACCATCCAGGGCGCGCAGTGGTGGACCGACTACCAGCCGGTGTCTGACACGCTCAC
 TGGGAAGCGGGGCGACCGCTCCCAGTTTGCGAACATGATTACTACGTGCCACGCCCGGGC
 GTCGGCGTGATCGTTGACACCATCTGGAACCACATGGCGGGCGTCTGACTCCGGCACGGGTA
 CCGCCGGCTCGTCCTTACGCACTACAACACTACCCCGGCATCTACCAAACCAGGACTTTCA
 CCACTGCGGCCTCGAGCCGGGCGATGACATCGTCAACTACGACAACGCGGTTGAGGTCCAG
 ACCTGCGAGCTTGTC AACCTCGCTGACCTCGCCACCGACACGGAGTATGTGCGCGGTGCGC
 TTGCCCAGTACGGAACGACCTGCTCTCGCTCGGTGCCGATGGCCTGCGTCTTGACGCTTC
 CAAACACATTCCTGTGGGCGACATCGCGAACATCCTGTCTCGCCTCAGTCGCTCTGTCTAC
 ATCACCAGGAAGTCATCTTTGGGGCCGGCGAGCCATCACGCCGAACAGTACACCGGGA
 ACGGCGACGTTT CAGGAGTTCCGCTACACCTCTGCGCTAAAGGACGCCTTCTTGAGCTCGGG
 CATATCAAACCTGCAGGACTTCGAAAACCGTGGATGGGTACCTGGCTCGGGCGCCAACGTG
 TTCGTGTC AACCATGACACCGAGCGGAACGGCGCGTTCGCTGAACAACAACCTCGCCTTCGA
 ACACCTACGTCACCGCGACGATCTTCTCGCTCGCACACCCGTACGGCACGCCACGATCCT
 CTCTCGTATGATGGCTTCACGAACACCGACGCCGGCGCGCCGAACAACAACGTCGGCACA
 TGCTCGACCAGCGGTGGTGCGAACGGGTGGCTCTGCCAGCACCGCTGGACCGCGATCGCCG
 GCATGGTTCGGCTTCCGCAACAACGTCGGCAGCGCTGCACTCAACAACCTGGCAGGCCCGCA
 GTCGCAGCAGATTGCGTTCGGTTCGCGGCGCACTTGGCTTCGTGCGGATCAACAACGCCGAC
 TCGGCCTGGTCTACGACGTTACCACTTCCCTCCCGATGGTTCCCTACTGCGATGTCATCA
 GCGGCAAGGCCTCCGGCAGTAGCTGCACCGGTTCTTCGTTACCGTCTCCGGCGGGAAGCT
 GACCGCCACGGTCCCGGCGCGTAGCGCCATCGCCGTGCACACCGGTCAGAAAGGTTCTGGT
 GGTGCCACGCCACCTCCGCCCTAGTACTACACCAACCAGCGGCACTGTCAGCGTGACCT
 TCGCTGAGCAGGCGACGACCACCTTCGGCGAGAACATCTTCCTCGTTCGGCAGTATTTGCA
 GCTCGGGAAC TGAACCCGGCCAGCGGATCGCCCTGTCTCTGCGGCGTACCCTACGTGG
 TCTGTGTCTGTGAACATTC CCGCCGGAACGACCTTCCAGTACAAGTTCATCCGCAAGGAGA
 CGGACGGTAGCGTCTGTTGGGAGTCGGACCCCAACCGCCAGGCTACC GCGCCCCGCGTCCGG
 TACCACCACGCTCACGTCCAGCTGGCGGTGA

Aminosäure-Sequenz (Signalpeptid unterstrichen):

MSNWVKLAALAALGVFCTAAVDARPTVFDAGADAHSLHARAPSGSKDVI IQMFFEWNWDSVA
AECTNFIGPAGYGFVQVSPQETIQGAQWTDYQPVSYTLTGKRGDRSQFANMITTCHAAG
 VGVIVDTIWNHMAGVDSGTGTAGSSFTHYNYPGIYQNQDFHHCGLEPGDDIVNYDNAVEVQ
 TCELVNLADLATDTEYVRGRLAQYGNL LSLGADGLRLDASKHIPVGDIANILSRLSRVY
 ITQEVIFGAGEPITPNQYTGNGDVQEFRYTSALKDAFLSSGISNLQDFENRGWVPGSGANV
 FVVNHDTERNGASLNNNSPNTYVTATIFSLAHPYGTPTILSSYDGFTNTDAGAPNNNVGT
 CSTSGGANGWLCQHRWTAIAGMVGFERNVGSAA LNNWQAPQSQQIAFGRGALGFVAINNAD
 SAWSTTFTTSLPDGSYCDVISGKASGSSCTGSSFTVSGGKLTATVPARSAIAVHTGQKSG
 GATPTSAPSTTPTSGTVSVTFAEQATTTFGENIFLVGSI SQLGNWNPASAIALSSAAYPTW
 SVSVNIPAGTTTFQYKFIRKETDGSVWVESDPNRQATAPASGTTTLTSSWR*

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Florian Döring
23.01.1988 in Potsdam

SCHULBILDUNG

1994 – 2000 Grundschule Karl Hagemeister, Werder (Havel)
2000 – 2007 Ernst-Haeckel-Gymnasium, Werder (Havel)
06/2007 Abitur; Prüfungsfächer: Deutsch, Geschichte, Mathematik,
Biologie

WEITERER WERDEGANG

07/2007 – 06/2008 Freiwillig verlängerter Grundwehrdienst
Logistikbataillon 172
14547 Beelitz

10/2008 – 09/2011 Studium Bachelor of Science Pflanzenbiotechnologie

09/2010 – 09/2011 Wissenschaftliche Abschlussarbeit (Bachelorarbeit) „Zum
Auftreten sekundärer Symbionten in *Sitobion avenae* unter
besonderer Berücksichtigung des vertikalen Transfers und
Hitzeschock“; Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz,
Abteilung Entomologie, Leibniz Universität Hannover

10/2011 – 11/2013 Studium Master of Science Pflanzenbiotechnologie

09/2012 – 11/2013 Wissenschaftliche Abschlussarbeit (Masterarbeit) „Benyviren als
Vektoren für die Expression heterologer Proteine in
Nicotiana benthamiana“; Institut für Pflanzengenetik, Abt. II, AG
molekulare Biochemie, Leibniz Universität Hannover

04/2014 – 05/2018 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Promotion)
Institut für Lebensmittelchemie
Leibniz Universität Hannover

06/2018 – Prozessingenieur
ProBioGen AG
13086 Berlin