

# Oxidativer Abbau von Carotinoiden durch Pilzenzyme

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

**Doktorin der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Lebensmittelchemikerin

**Bärbel Hülsdau**

geboren am 27.10.1978 in Wesel

2007

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

Korreferent: Prof. Dr. H. Zorn

Tag der Promotion: 18.07.2007

Hiermit erkläre ich, Bärbel Hülsdau, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

---

Bärbel Hülsdau

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2004 bis April 2006 am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger und bei der AG Technische Biochemie der Universität Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Zorn angefertigt.

Bedanken möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Berger und bei Herrn Prof. Zorn für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, den gewährten Freiraum und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Mein Dank gilt außerdem

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie für das freundschaftliche Verhältnis und die gute Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Laborkollegin Manuela Scheibner für die Einführung in die Molekularbiologie und viele anregende Diskussionen. Dr. Diana Linke, Stephanie Kopp und Marco Fraatz danke ich für die angenehme Atmosphäre in unserem Labor.

Herrn Dr. Manfred Nimtz vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig danke ich für die Proteinsequenzierung mittels ESI-MS/MS.

Der DSM (Delft) danke ich für die finanzielle Unterstützung, für die Bereitstellung des rekombinanten Enzyms und für das stetige Interesse am Fortschritt der Arbeiten.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich für ihre Liebe und die mir immer gewährte Unterstützung bedanken.

Zuletzt danke ich meinem Freund Tobias für die Geduld, die er in den letzten Monaten mit mir hatte.

## Veröffentlichungen

Zelena, K.; Scheibner, M.; Hülsdau, B.; Nimtz, M.; Berger, R. G.; Zorn, H.  
(2007) Neuartige Peroxidasen aus *Marasmius scorodonius*.  
*Lebensmittelchemie, in press*

Zorn, H.; Scheibner, M.; Hülsdau, B.; Berger, R. G.; de Boer, L.; Meima, R. B.  
(2006) Novel Enzymes for use in enzymatic bleaching of food products.  
WO2007006792.

Zorn, H.; Taupp, D. E.; Hülsdau, B.; Scheibner, M.; Fraatz, M. A.; Berger, R. G.  
(2007) "Bioflavours" – an excursion from the garlic mushroom to raspberry  
aroma (Proceedings of the 8<sup>th</sup> Wartburg-Symposium, Eisenach), *in press*.

## Zusammenfassung

Die Basidiomyceten *Cyathus pallidus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trametes suaveolens* und *Trametes versicolor* wurden auf die Bildung von  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen untersucht.

Aus dem Kulturüberstand von *Trametes suaveolens* wurden die Enzyme, die den Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin katalysieren, isoliert und biochemisch charakterisiert. Mittels Ionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie wurden die Enzyme mit Molekulargewichten von 52 (GFC) bzw. 57 kDa (SDS-Page) und isoelektrischen Punkten zwischen 3,1 und 3,9 zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt. Die Enzyme enthielten Häm-gebundenes Eisen, und mittels ESI-MS/MS erhaltene Peptidsequenzen zeigten Homologien zu zwei „Manganeserepressed“ Peroxidasen aus *Trametes versicolor*.

Die Produktion der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Peroxidasen MsP1 und MsP2 in *Marasmius scorodonius* wurde durch den Zusatz von Lignin zum Kulturmedium gesteigert. Neben  $\beta,\beta$ -Carotin bauen die Enzyme auch Capsanthinester, Luteinester und Bixin ab und die Enzymaktivität wurde durch die Generierung von  $H_2O_2$  aus Glucose und Glucoseoxidase während des Enzymtests signifikant gesteigert. Das native Enzym MsP2 besteht aus 510 Aminosäuren und besitzt am N-Terminus ein 57 Aminosäuren langes Exportsignal. Sequenzhomologien zu einer ungewöhnlichen Peroxidase aus *Thanatephorus cucumeris* zeigten, dass MsP2 der Familie der DyP-ähnlichen Enzyme angehört. Die Gene von MsP1 und MsP2 sind 2093 bzw. 2135 Nukleotide lang und enthalten jeweils 10 Introns. Sowohl von MsP1 als auch von MsP2 existieren mehrere Isoenzyme.

Das in *Aspergillus niger* überexprimierte Enzym MsP1 besitzt ein Molekulargewicht von 71 kDa und baut in Gegenwart von  $H_2O_2$   $\beta,\beta$ -Carotin ab. Wie natives MsP1 enthält auch das rekombinante Enzym Häm-gebundenes Eisen.

Schlagworte: Carotinoidabbau, Basidiomyceten, Häm-Peroxidasen

## Abstract

The basidiomycetous fungi *Cyathus pallidus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trametes suaveolens* and *Trametes versicolor* were screened for the production of  $\beta,\beta$ -carotene degrading enzymes.

Enzymes which catalyse the cleavage of  $\beta,\beta$ -carotene were isolated from culture supernatant of *Trametes suaveolens* and characterised biochemically. The enzymes were purified to electrophoretic homogeneity by means of ion exchange and size exclusion chromatography and their molecular weight was determined to be 52 kDa (SEC) and 57 kDa (SDS-Page), respectively. The enzymes showed isoelectric points between 3.1 and 3.9 and contained heme bound iron. Peptide sequences obtained by ESI-MS/MS revealed significant homologies to two “manganese-repressed” peroxidases from *Trametes versicolor*.

In *Marasmius scorodonius*, the production of  $\beta,\beta$ -carotene degrading peroxidases MsP1 and MsP2 was enhanced by addition of lignin to the culture media. The enzymes were capable of cleaving lutein esters, capsanthin esters and bixin. The generation of  $H_2O_2$  by glucose and glucose oxidase during the enzyme assay increased the enzyme activity. Native MsP2 consists of 510 amino acids and possess an export signal of 57 amino acids length at the N-terminus. Based on sequence homologies to an unusual peroxidase (DyP) from *Thanatephorus cucumeris*, MsP2 was assigned to the family of “DyP-like” enzymes. The genes of MsP1 and MsP2 consist of 2093 and 2135 nucleotides, respectively, each with 10 introns. Several isozymes of both MsP1 and MsP2 have been identified.

When expressed in *Aspergillus niger* MsP1 showed a molecular weight of 71 kDa. It degraded  $\beta,\beta$ -carotene in the presence of  $H_2O_2$  and it contained heme bound iron like native MsP1.

Key words: carotenoid degradation, basidiomycetous fungi, heme peroxidases



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bisherige Kenntnisse.....	1
1.2 Zielsetzung.....	4
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>5</b>
2.1 Chemikalien, Mikroorganismen und Geräte.....	5
2.2 Kultivierung von Basidiomyceten.....	11
2.2.1 SNL-Medium .....	11
2.2.2 Spurenelementlösung .....	11
2.2.3 SNL-Agar .....	12
2.2.4 $\beta,\beta$ -Carotin-Platten .....	12
2.2.5 Stammhaltung.....	13
2.2.6 Gebrauchsplatten mit $\beta,\beta$ -Carotin.....	13
2.2.7 Vorkultur.....	13
2.2.8 Hauptkultur .....	14
2.2.9 Kulturente.....	14
2.2.10 Bioreaktor.....	14
2.3 Enzymtest .....	15
2.3.1 $\beta,\beta$ -Carotin-Lösung.....	15
2.3.1.1 Carotinoidlösungen .....	15
2.3.2 Citronensäure/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer .....	15
2.3.3 Natriumacetat-Puffer .....	16
2.3.4 Aktivitätsbestimmung .....	16
2.3.4.1 Temperaturoptimum.....	17
2.3.4.2 pH-Optimum.....	17
2.3.4.3 Optimale Pufferkonzentration.....	17
2.3.4.4 NaCl-Toleranz.....	18
2.3.4.5 Wasserstoffperoxid-Einfluss.....	18
2.3.5 Aktivitätsbestimmung von MsP1 und MsP2 aus <i>M. scorodonius</i> .....	18

2.3.5.1	Zusatz von Glucose und Glucoseoxidase .....	18
2.3.6	Aktivitätsbestimmung von MsP1 (rekombinant) aus <i>Aspergillus niger</i> .....	19
2.3.6.1	Variation der Wasserstoffperoxidkonzentration .....	19
<b>2.4</b>	<b>Konzentrierung .....</b>	<b>20</b>
2.4.1	Ultrafiltration.....	20
2.4.2	Tangential-Flow-Filtration .....	20
<b>2.5</b>	<b>Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC).....</b>	<b>21</b>
2.5.1	Ionenaustauschchromatographie (IEX) .....	21
2.5.1.1	Vorversuche zur Reinigung der $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>T. suaveolens</i> .....	21
2.5.1.2	Scale up der Reinigung der $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>T. suaveolens</i> .....	22
2.5.1.3	Reinigung von MsP1 und MsP2 aus <i>M. scorodoni</i> (Scheibner, 2006, modifiziert).....	23
2.5.2	Gelfiltrationschromatographie (GFC) .....	24
2.5.2.1	Reinigung der $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>T. suaveolens</i> .....	24
2.5.2.2	Bestimmung des Molekulargewichtes mittels GFC.....	25
2.5.2.3	Reinigung von MsP1 und MsP2 aus <i>M. scorodoni</i> (Scheibner, 2006, modifiziert).....	26
<b>2.6</b>	<b>High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....</b>	<b>27</b>
<b>2.7</b>	<b>UV/Vis-Spektroskopie.....</b>	<b>28</b>
<b>2.8</b>	<b>Elektrophorese.....</b>	<b>28</b>
2.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	28
2.8.2	Isoelektrische Fokussierung .....	30
2.8.3	Coomassie-Färbung .....	30
2.8.4	Silberfärbung .....	31
2.8.5	Aktivitätsentfärbung .....	32
2.8.6	Bestimmung von Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt..	32
2.8.6.1	Molekulargewicht.....	32
2.8.6.2	Isoelektrischer Punkt (pI) .....	33
<b>2.9</b>	<b>Proteinbestimmung .....</b>	<b>33</b>
<b>2.10</b>	<b>cDNA-Synthese.....</b>	<b>34</b>
2.10.1	RNA-Isolierung .....	34

---

2.10.2	Erststrangsynthese.....	34
2.10.3	LD-PCR.....	34
<b>2.11</b>	<b>Isolierung genomischer DNA .....</b>	<b>35</b>
<b>2.12</b>	<b>Polymerasekettenreaktion (PCR).....</b>	<b>35</b>
2.12.1	Analytische PCR .....	35
2.12.2	Präparative PCR .....	36
2.12.3	Kolonie-PCR .....	37
<b>2.13</b>	<b>Agarose-Gelelektrophorese .....</b>	<b>38</b>
<b>2.14</b>	<b>DNA-Quantifizierung .....</b>	<b>39</b>
<b>2.15</b>	<b>DNA-Fragmentisolierung .....</b>	<b>39</b>
<b>2.16</b>	<b>Kultivierung von <i>E. coli</i>.....</b>	<b>39</b>
2.16.1	LB-Medium .....	39
2.16.2	LB-Agar .....	40
2.16.3	Ampicillin-Stammlösung .....	40
2.16.4	LB <sub>amp</sub> -Medium .....	40
2.16.5	LB <sub>amp</sub> -Agar .....	40
2.16.6	Stammhaltung .....	40
2.16.7	Übernachtskultur (ÜN) .....	41
2.16.8	Glycerol-Stock.....	41
<b>2.17</b>	<b>Gentransfer .....</b>	<b>41</b>
2.17.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	41
2.17.2	Ligation mittels TA-Cloning .....	42
2.17.3	Transformation in <i>E. coli</i> .....	43
2.17.4	Blau/weiss-Screening.....	43
<b>2.18</b>	<b>Sterilisation.....</b>	<b>44</b>
2.18.1	Sterilisation von Arbeitsmaterialien .....	44
2.18.2	Sterilisation von S1-Abfällen .....	44
<b>2.19</b>	<b>Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien.....</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b><math>\beta,\beta</math>-Carotin-abbauende Enzymaktivitäten im Medium während des Kulturverlaufs .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Charakterisierung der <math>\beta,\beta</math>-Carotin-spaltenden Enzyme aus <i>T. suaveolens</i>.....</b>	<b>46</b>
3.2.1	Messung der Enzymaktivität .....	46

3.2.2	Anwendbarkeit des Enzymtests.....	46
3.2.3	pH-Optimum .....	49
3.2.4	Temperatur-Optimum .....	50
3.2.5	Variation der Pufferkonzentration .....	51
3.2.6	Einfluss von Wasserstoffperoxid.....	51
3.2.7	Einfluss von Natriumchlorid .....	52
3.2.8	Temperaturstabilität.....	53
3.2.9	Einfluss von Spurenelementen .....	53
<b>3.3</b>	<b>Reinigung der <math>\beta,\beta</math>-Carotin-spaltenden Enzyme aus</b>	
	<b><i>T. suaveolens</i>.....</b>	<b>55</b>
3.3.1	Konzentrierung .....	55
3.3.2	Ionenaustauschchromatographie.....	56
3.3.2.1	Vorversuche .....	56
3.3.2.2	Scale-up .....	58
3.3.3	Gelfiltrationschromatographie .....	61
3.3.4	Kombinierte Aufreinigung .....	61
3.3.5	Bestimmung der Isoelektrischen Punkte.....	65
3.3.6	UV/Vis-Spektrum .....	66
3.3.7	Sequenzierung.....	66
3.3.8	Sequenzvergleich .....	67
<b>3.4</b>	<b>Proteinbiochemische Arbeiten mit <i>Marasmius scorodonius</i>.....</b>	<b>69</b>
3.4.1	Induktionsversuche.....	70
3.4.2	Kultivierung im Bioreaktor mit Ligninzusatz .....	70
3.4.3	Abbau von Luteinestern aus <i>Tagetes oleoresin</i> .....	71
3.4.4	Abbau von Capsanthinestern aus <i>Paprika oleoresin</i> .....	73
3.4.5	Abbau von Bixin.....	75
3.4.6	Abbau von $\beta,\beta$ -Carotin unter Zusatz von Glucose und Glucoseoxidase .....	77
3.4.7	Reinigung von MsP1 und MsP2.....	79
<b>3.5</b>	<b>Molekulare Identifizierung des <i>M. scorodonius</i>-Stammes</b>	
	<b>CBS 137.83 .....</b>	<b>80</b>
<b>3.6</b>	<b>Molekularbiologische Charakterisierung von MsP2 und MsP1</b>	
	<b>aus <i>M. scorodonius</i> .....</b>	<b>81</b>
3.6.1	Identifizierung des 5'-Endes der MsP2-cDNA.....	82

3.6.2	Ableitung neuer Primer ausgehend vom 5'-Ende der MsP2-cDNA .....	85
3.6.3	Identifizierung der cDNA-Sequenz von MsP2 .....	85
3.6.4	Amplifizierung der Gesamtsequenz von MsP2.....	88
3.6.5	Amplifizierung der Gesamtsequenz von MsP1 .....	91
<b>3.7</b>	<b>Charakterisierung von MsP1 (rekombinant) aus <i>Aspergillus niger</i> .....</b>	<b>95</b>
3.7.1	SDS-PAGE.....	95
3.7.2	Abbau von $\beta,\beta$ -Carotin .....	96
3.7.3	UV/Vis Spektren .....	98
3.7.4	Gelfiltrationschromatographie .....	99
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>101</b>
<b>4.1</b>	<b>Screening auf <math>\beta,\beta</math>-Carotin-abbauende Enzymaktivitäten.....</b>	<b>101</b>
<b>4.2</b>	<b><math>\beta,\beta</math>-Carotin-abbauende Enzyme aus <i>Trametes suaveolens</i>.....</b>	<b>103</b>
4.2.1	Einfluss von $Mn^{2+}$ auf die Enzymaktivität .....	106
4.2.2	Einfluss von $H_2O_2$ auf die Enzymaktivität .....	109
4.2.3	Reinigung der $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus <i>T. suaveolens</i> .....	109
4.2.4	Molekulargewicht und isoelektrische Punkte.....	112
4.2.5	UV/Vis-Spektrum.....	113
<b>4.3</b>	<b><i>Marasmius scorodoni</i> .....</b>	<b>114</b>
4.3.1	Induktion der $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme .....	114
4.3.2	Abbau von Xanthophyllestern und Bixin.....	116
4.3.3	Abbau von $\beta,\beta$ -Carotin unter Zusatz von Glucose und Glucoseoxidase .....	118
4.3.4	Reinigung von MsP1 und MsP2 .....	119
4.3.5	Das Enzym MsP2.....	119
4.3.6	Die Intron-Exon Organisation von MsP1 und MsP2 .....	123
4.3.7	Isoenzyme von MsP1 und MsP2.....	125
<b>4.4</b>	<b>MsP1 (rekombinant) aus <i>Aspergillus niger</i>.....</b>	<b>127</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>130</b>
<b>5</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>143</b>
	cDNA-Sequenzen der Isoenzyme von MsP1 und MsP2.....	143

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat: dATP, dTTP, dCTP, dGTP
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
DTT	Dithiotreitol
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ESI-MS	Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GFC	Gelfiltrationschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
konz.	konzentriert
LB	Luria Bertani
MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NWE	Normalwasserstoffelektrode
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNL	Standardnährlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
U	Unit
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
ZZuV	Zusatzstoff-Zulassungsverordnung

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



# 1 Einleitung

## 1.1 Bisherige Kenntnisse

Unter den über 120.000 beschriebenen Pilzarten gibt es etwa 30.000 Basidiomyceten (Ständerpilze). Ein Großteil davon lebt saprobisch und bezieht die zum Wachstum benötigten Kohlenstoffquellen aus organischen Stoffen. Die vorausgegangene oder gleichzeitige Besiedlung durch andere Organismen ist somit einzige Voraussetzung für das Wachstum von Pilzen (Müller; Loeffler, 1992). So sind viele Basidiomyceten in der Lage, das Holz von lebenden und toten Bäumen zu besiedeln. Holz besteht hauptsächlich aus den drei Makromolekülen Cellulose, Hemicellulose und Lignin (Higuchi, 1997), wobei der Ligninanteil im Splintholz je nach Holzart zwischen 19 und 32% beträgt (Eriksson *et al.*, 1990).

Lignin ist ein dreidimensionales Netzwerk aus Phenylpropaneinheiten, die teilweise am Phenylring mono- oder dimethoxyliert und am Propanrest mit Hydroxygruppen substituiert sind. Dadurch ergibt sich eine Vielzahl an Untereinheiten, die auf unterschiedliche Weise durch Ether- und C-C-Bindungen miteinander verknüpft sind (Martinez *et al.*, 2005).

Unter den Basidiomyceten sind die Weiß- und Braunfäulepilze in der Lage, diese polymeren Substanzen abzubauen und somit für den Pilz nutzbar zu machen (Müller; Loeffler, 1992). Während die Braunfäulepilze in erster Linie Cellulose und Hemicellulose zersetzen, bauen die Weißfäulepilze zusätzlich auch Lignin ab (Eriksson *et al.*, 1990, Schwarze *et al.*, 2000, Zabel; Morrell, 1992). Der Ligninabbau kann dabei simultan mit dem Abbau von Hemicellulose und Cellulose oder davor stattfinden (Otjen; Blanchette, 1986). Für die Zersetzung der Holzkomponenten sekretieren die Basidiomyceten extracelluläre Enzyme, wie z.B. Oxidoreductasen (Martinez *et al.*, 2005).

Am Abbau von Lignin sind vor allem Laccasen, Lignin- und Manganperoxidasen beteiligt (Martinez *et al.*, 2005). Während Laccasen nur phenolische

Untereinheiten direkt oxidieren können, sind Ligninperoxidasen auf Grund ihres hohen Redoxpotentials in der Lage, auch nicht-phenolische Bausteine des Lignins abzubauen. Manganperoxidasen hingegen generieren  $Mn^{3+}$ -Ionen, die in das Holz diffundieren und als Oxidationsmittel sowohl mit phenolischen als auch mit nicht-phenolischen Lignineinheiten reagieren können (Jensen *et al.*, 1996). Zusätzlich enthalten *Pleurotus*-Spezies und andere Pilze eine dritte Art von Peroxidasen, die die katalytischen Eigenschaften von Mangan- und Ligninperoxidasen kombinieren (Martinez *et al.*, 1996, Mester; Field, 1998). Diese Enzyme werden als polyvalente Peroxidasen bezeichnet.

Die heterogene Zusammensetzung des Lignins führt dazu, dass die ligninolytischen Enzyme eine geringe Substratspezifität besitzen. Dies ermöglicht Laccasen und Peroxidasen eine Beteiligung am Abbau von Umweltkontaminaten wie polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen im Erdboden oder von Azofarbstoffen in Industrieabwässern (Baldrian *et al.*, 2000, Levin *et al.*, 2005).

Neben dem Holz steht den dort siedelnden Pilzen auch das Laub der Bäume zur Metabolisierung zur Verfügung. Die Blätter enthalten neben Lignin, das z.B. in Birkenblättern ca. 28% der Trockenmasse ausmacht (Johansson, 1995), auch noch eine Vielzahl an Carotinoiden, die während der Photosynthese als akzessorische Pigmente dienen (Richter, 1998). Die jährliche Bildung von Carotinoiden in der Natur liegt bei etwa 100 Mio. Tonnen (Britton *et al.*, 1998). Diese Carotinoide sind theoretisch auch als Kohlenstoffquelle für die Pilze nutzbar. Auf Grund ihrer geringen Substratspezifität sind ligninolytische Enzyme aus Basidiomyceten möglicherweise auch in der Lage, Carotinoide abzubauen.

Die Spaltung von Carotinoiden ist auch von industriellem Interesse, da Carotinoide Vorstufen von Aromastoffen wie z.B.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ionon, Geraniol und  $\beta$ -Damascenon darstellen (Winterhalter, 1996, Winterhalter; Rouseff, 2002). In der Lebensmittelindustrie spielt der Abbau von Carotinoiden bei der Bleichung eine Rolle. So z.B. werden die im Mehl enthaltenen Carotinoide oxidativ abgebaut, um Brote mit einer weißeren Krume zu erhalten (Gélinas *et al.*, 1998).

In vorangegangenen Arbeiten waren 51 Pilze auf ihre Befähigung zum Abbau von  $\beta$ -Carotin untersucht worden. 11 Stämme zeigten im Screening während des Wachstums auf  $\beta$ -Carotin-haltigen Agarplatten die Bildung eines entfärbten Hofes um das Mycel (Langhoff, 2002). Bei der Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit zellfreien Kulturüberständen der positiv getesteten Stämme wurden Abbauraten zwischen 7 und >99% erreicht (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Produktbildung und Abbauraten (in 14 h) bei Umsetzung von  $\beta$ -Carotin mit Kulturüberständen (Langhoff, 2002, modifiziert)

Art	Abbauraten [%]	Flüchtige Abbauprodukte
Blindwert	< 8	-
<i>Cryptococcus laurentii</i>	9	-
<i>Cyathus pallidus</i>	85	-
<i>Ganoderma applanatum</i>	24	-
<i>Hypomyces odoratus</i>	9	-
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	95	$\beta$ -Ionon, Dihydroactinidiolid, $\beta$ -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon
<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	10	-
<i>Pleurotus eryngii</i>	> 99	$\beta$ -Ionon, Dihydroactinidiolid, $\beta$ -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon
<i>Marasmius scorodonius</i>	93	$\beta$ -Ionon, Dihydroactinidiolid, $\beta$ -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon
<i>Phaffia rhodozyma</i>	7	-
<i>Trametes suaveolens</i>	60	-
<i>Trametes versicolor</i>	98	$\beta$ -Ionon, Dihydroactinidiolid, $\beta$ -Cyclocitral, 2-Hydroxy-2,6,6-Trimethylcyclohexanon

Sechs der getesteten Stämme (*Cyathus pallidus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Marasmius scorodoni*, *Pleurotus eryngii*, *Trametes suaveolens* und *Trametes versicolor*) zeigten Abbauraten  $\geq 60\%$ .

Das für den  $\beta$ -Carotinabbau verantwortliche Enzym aus dem Basidiomyceten *Pleurotus eryngii* wurde aus Kulturüberständen isoliert und biochemisch charakterisiert (Langhoff, 2002). Auf molekularer Ebene wurde das Enzym als polyvalente Peroxidase (VPL3) identifiziert (Scheibner, 2006).

Aus Kulturüberstand von *Marasmius scorodoni* wurden zwei Enzyme (MsP1 und MsP2), die  $\beta$ -Carotin abbauen können, isoliert und biochemisch charakterisiert. MsP1 gehört wegen seiner Homologie zu einer Peroxidase (DyP) aus *Thanatephorus cucumeris* (ursprünglich bezeichnet als *Geotrichum candidum*) zu den DyP-ähnlichen Enzymen (Scheibner, 2006).

## 1.2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die  $\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme MsP1 und MsP2 aus *Marasmius scorodoni* auf biochemischer Ebene untersucht werden. Auch das durch Überexpression in *Aspergillus niger* erhaltene rekombinante Enzym MsP1 sollte charakterisiert werden. Die MsP2 codierende DNA sollte, ausgehend von bekannten Peptidsequenzen des isolierten Enzyms, identifiziert werden.

Desweiteren sollten die  $\beta$ -Carotin-spaltenden Enzymaktivitäten in den Kulturüberständen von *Cyathus pallidus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trametes suaveolens* und *Trametes versicolor* während der Kultivierung in Submerskultur bestimmt werden. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Kulturverläufe sollte das  $\beta$ -Carotin-spaltende Enzym aus einem dieser Organismen isoliert und biochemisch charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Mikroorganismen und Geräte

Tab. 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Qualität	Hersteller
1 kb-Leiter	500 $\mu\text{g mL}^{-1}$	New England Biolabs (Schwalbach)
10 × PCR-Puffer	-	Qiagen (Hilden)
1000 bp-Fragment	100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$	gesura (über Roth)
500 bp-Fragment	100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$	gensura (über Roth)
Aceton	Redest.	Hochschullieferung
Acetonitril	99,8%, HPLC	Promochem
Acrylamid	Purum, 2 × krist.	Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar	f. d. Mikrobiologie	Merck (Darmstadt)
Agarose	Gentechn. Qualität	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	> 98%	Roth
Ampicillin (Na-Salz)	Gentechn. Qualität	Roth
L-Asparaginsäure Monohydrat	99%	Merck
Bixin	95%	Roth
Bromphenolblau	f. d. Elektrophorese	Roth
BSA	Fettsäurearm, > 96%	Fluka (Neu-Ulm)
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	p.a.	Riedel de Haen (Seelze)
Citronensäure Monohydrat	> 99,5% p.a.	Roth
$\beta,\beta$ -Carotin	> 97%	Fluka

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Coomassie Brillant Blue G 250	pure	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brillant Blue R 250	pure	Serva (Heidelberg)
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	99%	Baker (Griesheim)
D <sub>c</sub> Protein Assay, Reagent A	-	Bio-Rad (München)
D <sub>c</sub> Protein Assay, Reagent B	-	Bio-Rad
Dichlormethan	Redest.	Hochschullieferung
Dichlormethan	99,8%, HPLC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dimethylformamid	> 99,7%	Roth
dNTPs (dATP, dTTP, dCTP und dGTP)	> 98%, pH 7, 100 mM	Roth
DTT	f. d. Biochemie	Merck
EDTA	> 99%	Merck
Essigsäure	> 99,8%	Fluka
Ethanol, unvergällt	96,4%	Kraul & Wilkening & Stelling (Hannover)
Ethanol, vergällt	96,4%, mit Petrolether vergällt	Kraul & Wilkening & Stelling
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	reinst	Riedel de Haen
Formaldehyd	37% (w/v)	Aldrich (Taufkirchen)
D(+)-Glucose Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Merck
Glycerol	> 98%	Roth
Glycin	f. d. Elektrophorese	Merck

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Hefeextrakt	f. d. Mikrobiologie	Merck
HotStar Taq	5 U $\mu\text{L}^{-1}$	Qiagen
IPTG	> 99%, dioxanfrei	Roth
Kaliumacetat	reinst	Merck
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	p.a.	Fluka
LB-Medium (Miller)	f. d. Mikrobiologie	Merck
Lignin	organosolv	Sigma-Aldrich
Methanol	HPLC-grade	Baker
$\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	> 98%	Fluka
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	> 99%	Fluka
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	> 98%	Fluka
MOPS	> 99,5%	Sigma (Taufkirchen)
N,N'-Methylenbisacrylamid	2 x krist	Roth
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	p.a., Puffersubstanz	Riedel de Haen
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	> 99,5%	Merck
NaCl	p.a.	Roth
NaOH	reinst	Merck
Natriumacetat	p.a.	Merck
Natriumcarbonat	> 99,8%	Roth
n-Hexan	99,8%, HPLC	Roth
<i>Paprika oleoresin</i>	-	Dr. Marcus Chemische Fabrik (Geesthacht)
Rubidiumchlorid	p.a.	Merck
SDS	> 99%, f. d. Elektrophorese	Roth
Silbernitrat	chem rein, Ph. Eur.	Degussa-Hüls (Frankfurt)

Chemikalie	Qualität	Hersteller
<i>Tagetes oleoresin</i>	-	Dr. Marcus Chemische Fabrik
TEMED	f. d. Elektrophorese	Roth
Tris base	> 99,9%	Roth
Tris HCl	> 99%	Roth
Tween 80	-	Riedel de Haen
Wasserstoffperoxid	30%	Fluka
X-Gal	> 99%	Roth
Xylencyanol	f. d. Elektrophorese	Roth
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	puriss	Fluka

Tab. 2.2: Mikroorganismen

Stamm	Herkunft
<i>Cyathus pallidus</i>	CBS 376.80
<i>Ischnoderma benzoinum</i>	CBS 311.29
<i>Marasmius scorodoni</i>	CBS 137.83
<i>Trametes suaveolens</i>	DSMZ 5237
<i>Trametes versicolor</i>	DSMZ 11269
<i>E. coli</i> TOP10F'	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 2.3: Geräte

Gerät	Modell	Firma
Autoklav	VST 50/70	Zirbus (Bad Grund)
Autoklav	Varioklav 75 S	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Brutschrank	BE 500	Memmert (Büchenbach)
Brutschrank mit Schüttler	HT	Infors (Einsbach)
Dest. Wasseranlage	RO	Wilhelm Werner (Leverkusen)
E-pure-Anlage	D4623S mit Kit I Stand	Barnstead (Dubuque, USA)
Gelkammer	Minigel-System	Bio-Rad
IEF- Gelelektrophoresekammer	Multiphor II	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
pH-Meter	731 Calimatic	Knick (Berlin)
UV/Vis-Spektrometer	Lambda 12	Perkin Elmer (Rodgau- Jügesheim)
Software Spektrometer	UV Win Lab 2.0	Perkin Elmer
PCR-Cycler	Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Pipette 0,1-1 µL	Transferpette	Brand (Wertheim)
Pipette 1-10 µL	Transferpette	Brand
Pipette 2-20 µL	Transferpette electronic	Brand
Pipette 20-200 µL	Transferpette electronic	Brand
Pipette 100-1000 µL	Transferpette electronic	Brand
Rotationsverdampfer	Laborota 4002	Heidolph (Schwabach)
Schüttler	Infors HAT	Infors

Gerät	Modell	Firma
SDS-Gelelektrophoresekammer	Mini-Twin	Biometra (Göttingen)
Spannungsquelle	Power Supply 2	Bio-Rad
Spannungsquelle	Multi Drive XL	Pharmacia
Sterile Werkbank	Clean Air CA RE 4	Clean Air (Hilden)
Thermoshaker	-	Schutron (Quedlinburg)
Tischzentrifuge	5415 C	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Transluminator	Ti 4	Biometra
Ultratiefkühlschrank	VX 350 Series 2	Jouan (Fernwald)
Ultraturrax	TP-18/10	IKA-Werke (Staufen)
Vakuumzentrifuge	Sorvall RC 28 S	Kendro (Langenselbold)
Zentrifuge	Variofuge	Heraeus
Zentrifuge	RT7 plus	Kendro

## 2.2 Kultivierung von Basidiomyceten

### 2.2.1 SNL-Medium

D(+)-Glucose Monohydrat	30,0 g L <sup>-1</sup>
L-Asparagin Monohydrat	4,5 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	3,0 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung (2.2.2)	1 mL L <sup>-1</sup>
Einstellen auf pH 6,0 mit 1 N NaOH	
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

### 2.2.2 Spurenelementlösung

FeCl <sub>3</sub> × 6 H <sub>2</sub> O	0,08 g L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,09 g L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	0,03 g L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,005 g L <sup>-1</sup>
EDTA	0,4 g L <sup>-1</sup>
Steril filtrieren	

### 2.2.3 SNL-Agar

D(+)-Glucose Monohydrat	30,0 g L <sup>-1</sup>
L-Asparagin Monohydrat	4,5 g L <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g L <sup>-1</sup>
Hefeextrakt	3,0 g L <sup>-1</sup>
Spurenelementlösung (2.2.2)	1 mL L <sup>-1</sup>
Einstellen auf pH 6,0 mit 1 N NaOH	
Agar-Agar	15,0 g L <sup>-1</sup>
Autoklavieren (121 °C, 20 min)	

### 2.2.4 $\beta,\beta$ -Carotin-Platten

20 mg  $\beta,\beta$ -Carotin und 2 g Tween 80 wurden in einem 500 mL Rundkolben in Dichlormethan gelöst. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt (40 °C, 250 rpm, 800 mbar, 20 min), und zum Rückstand wurden 100 mL demin. Wasser gegeben. Reste von Dichlormethan wurden am Rotationsverdampfer (40 °C, 250 rpm, von 800 mbar auf 200 mbar in 200 mbar-Schritten, jede Stufe 15 min) und im N<sub>2</sub>-Strom entfernt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Bestandteile für 500 mL SNL-Agar (2.2.3) wurden in 400 mL demin. Wasser suspendiert. Nach dem Autoklavieren (121 °C, 20 min) wurde die Lösung auf ca. 50 °C abgekühlt.

Direkt vor dem Gießen der Platten wurde die sterile  $\beta,\beta$ -Carotin-Lösung zur SNL-Agar-Lösung gegeben und vorsichtig gemischt.

Die abgekühlten  $\beta,\beta$ -Carotin-Platten wurden einzeln mit Parafilm verschlossen, in Alufolie verpackt und bei 4 °C gelagert.

### 2.2.5 Stammhaltung

Auf SNL-Agar-Platten (2.2.3) wurde jeweils mittig ein ca. 1 cm<sup>2</sup> großes, mit Mycel bewachsenes Stück von einer SNL-Agar-Platte der verwendeten Stämme platziert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 25 °C so lange inkubiert, bis sie gut bewachsen waren. Die bewachsenen Platten wurden bei 4 °C gelagert.

### 2.2.6 Gebrauchsplatten mit $\beta,\beta$ -Carotin

$\beta,\beta$ -Carotin-Platten wurden mit einem ca. 1 cm<sup>2</sup> großen Stück von der jeweiligen Agarplatte aus der Stammhaltung (2.2.5) beimpft, mit Parafilm verschlossen und bei 25 °C inkubiert, bis die Platten gut bewachsen waren. Die bewachsenen Platten wurden bei 4 °C gelagert.

### 2.2.7 Vorkultur

Für die Vorkulturen wurden mit 100 mL SNL-Medium (2.2.1) befüllte 300 mL Erlenmeyerkolben mit Fertigstopfen aus Zellwatte verwendet.

Das Medium wurde mit einem ca. 1 cm<sup>2</sup> Stück von der jeweiligen  $\beta,\beta$ -Carotin-Platte (2.2.6) inokuliert. Mittels Ultraturrax wurde das Agarstückchen zerkleinert (15 sec.). Die Kulturen wurden unter Lichtausschluss bei 24 °C und 150 rpm je nach Wachstumsgeschwindigkeit des Stammes zwischen 7 und 15 Tagen inkubiert.

### 2.2.8 Hauptkultur

Für die Hauptkulturen wurden mit 250 mL SNL-Medium (2.2.1) befüllte 500 mL Erlenmeyerkolben mit Fertigstopfen aus Zellwatte verwendet.

Das Medium wurde mit 20-25 mL der entsprechenden Vorkultur (2.2.7) inokuliert. Die Kolben wurden bei 24 °C und 150 rpm unter Lichtausschluss inkubiert.

### 2.2.9 Kulturente

Zur Abtrennung des Mycels vom Kulturüberstand wurden die Kulturen über einen Büchnertrichter filtriert. Der Kulturüberstand wurde in einer Saugflasche aufgefangen und direkt auf 4 °C gekühlt.

### 2.2.10 Bioreaktor

Für die Kultivierung von *M. scorodonius* im Bioreaktor wurde ein Labortischfermenter Typ ISF-100 der Firma Infors mit einem 2 L Kulturgefäß verwendet. 1,8 L SNL-Medium (2.2.1) wurden mit 200 mL Vorkultur (2.2.7) inokuliert und 1,8 mg Lignin suspendiert in 10 mL 70%igem Ethanol hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte bei 24 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 250 rpm. Zur Belüftung wurden über ein Luftrohr (a.D. 8 mm) 0,4 L min<sup>-1</sup> Druckluft (sterilfiltriert über PTFE-Membranfilter Midisart 2000, 0,2 µm, Sartorius) zugeführt.

## 2.3 Enzymtest

### 2.3.1 $\beta,\beta$ -Carotin-Lösung

5 mg  $\beta,\beta$ -Carotin und 0,5 g Tween 80 wurden in einem 250 mL Rundkolben in Dichlormethan gelöst. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt (40 °C, 250 rpm, 800 mbar, 20 min). Zum Rückstand wurden 30 mL demin. Wasser gegeben. Reste von Dichlormethan wurden am Rotationsverdampfer (40 °C, 250 rpm, von 800 mbar auf 200 mbar in 200 mbar-Schritten, jede Stufe 15 min) und im N<sub>2</sub>-Strom entfernt. Die Lösung wurde in einen 50 mL Messkolben filtriert und mit demin. Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Bei Lagerung im Dunkeln bei max. 4 °C war die Lösung ca. 1 Woche haltbar.

#### 2.3.1.1 Carotinoidlösungen

Für wässrige Lösungen von Capsanthinestern bzw. Luteinestern wurden 50 mg *Paprika oleoresin* bzw. *Tagetes oleoresin* mit 0,5 g Tween 80 emulgiert. Für Bixinlösungen wurden 15 mg Bixin und 0,5 g Tween 80 verwendet. Die Herstellung der Lösungen erfolgte analog zur Herstellung der  $\beta,\beta$ -Carotinlösung (2.3.1).

### 2.3.2 Citronensäure/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer

Für die Herstellung des Puffers wurden eine 0,1 M Citronensäure- und eine 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphatlösung verwendet. Je nach gewünschtem pH-Wert des Puffers wurden die beiden Lösungen in unterschiedlichen Anteilen gemischt. Aus dem Mischungsverhältnis ergeben sich die Konzentrationen an Citronensäure und an Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in den resultierenden Pufferlösungen (Tab. 2.4). Bei Bedarf wurde die Konzentration der Pufferlösung durch Verdünnen mit Wasser eingestellt.

Tab. 2.4: Citronensäure/Phosphat-Puffer

pH	<u>Citronensäure (0,1 M)</u>		<u>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2 M)</u>	
	Volumen [mL]	Konzentration [mM]	Volumen [mL]	Konzentration [mM]
3,0	80,3	80	19,7	39
3,5	70,2	70	29,8	60
4,0	62,0	62	38,0	76
4,5	55,05	55	44,95	90
5,0	49,0	49	51,0	102
5,5	43,45	43	56,55	113
6,0	37,4	37	62,6	125
6,5	29,7	30	70,3	141
7,0	19,0	19	81,0	162

### 2.3.3 Natriumacetat-Puffer

Für die Herstellung des Puffers wurden 1 M Essigsäure- und 1 M Natriumacetatlösung verwendet. Je nach gewünschtem pH-Wert des Puffers wurden die beiden Lösungen in unterschiedlichen Anteilen gemischt. Die Konzentration der Pufferlösung wurde anschließend durch Verdünnen mit Wasser eingestellt.

### 2.3.4 Aktivitätsbestimmung

Die Enzymaktivität wurde mittels eines von Ben Aziz *et al.* (1971) entwickelten und von Langhoff (2002) und Scheibner (2006) modifizierten photometrischen Tests bestimmt. Die Bedingungen wurden für diese Arbeit den gegebenen Umständen angepasst. Dabei wurde die Extinktionsabnahme einer  $\beta,\beta$ -Carotin-haltigen Probelösung bei 450 nm verfolgt. 1,5 mL Probelösung wurden in einer Quarzküvette für 5 min im temperierbaren Küvettenhalter des Photometers bei der für die Messung verwendeten Temperatur vorgewärmt. Die Reaktion wurde

durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$   $\beta,\beta$ -Carotin-Lösung (2.3.1) und guter Durchmischung gestartet. Die Extinktionsabnahme wurde über einen Zeitraum von max. 15 min verfolgt.

Die Enzymaktivität  $E_a$  wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$E_A [mU \cdot mL^{-1}] = \frac{\Delta E \times V_G}{V_P \times d \times \epsilon} \times 1000000$$

$\Delta E$ : Extinktionsabnahme [ $\text{min}^{-1}$ ]

$V_G$ : Gesamtvolumen in der Küvette [mL]

$V_P$ : Probevolumen [mL]

$d$ : Schichtdicke der Küvette (1 cm)

$\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient von  $\beta,\beta$ -Carotin in Wasser (95.000  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  bei 450 nm (Langhoff, 2002))

#### 2.3.4.1 Temperaturoptimum

Konz. Kulturüberstand wurde mit Pufferlösung verdünnt und bei der gewünschten Messtemperatur für 5 min vortemperiert. Die Messung wurde anschließend durch Zugabe von  $\beta,\beta$ -Carotin-Lösung gestartet.

#### 2.3.4.2 pH-Optimum

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde konz. Kulturüberstand mit der entsprechenden Pufferlösung (2.3.2) verdünnt und die Extinktionsabnahme bei 450 nm verfolgt.

#### 2.3.4.3 Optimale Pufferkonzentration

Konz. Kulturüberstand wurde mit der entsprechenden Pufferlösung verdünnt und die Extinktionsabnahme bei 450 nm gemessen.

#### 2.3.4.4 NaCl-Toleranz

Der Enzymtest wurde bei 38 °C in 35 mM Citronensäure/30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 3,5 durchgeführt. Die Pufferlösung enthielt unterschiedliche Konzentrationen an NaCl (0-1 M).

#### 2.3.4.5 Wasserstoffperoxid-Einfluss

Zur Untersuchung des Wasserstoffperoxid-Einflusses wurde der Enzymtest bei 38 °C in Citronensäure/Phosphat-Puffer (35 mM/30 mM) bei pH 3,5 durchgeführt. Direkt vor der Zugabe von  $\beta,\beta$ -Carotin wurde die enzymhaltige Lösung mit 10  $\mu$ L einer 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung versetzt.

### 2.3.5 Aktivitätsbestimmung von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni*

Die Messung der Enzymaktivität von MsP1 und MsP2 wurde analog zu 2.3.4 bei einer Temperatur von 27 °C in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 6) durchgeführt (Scheibner, 2006).

#### 2.3.5.1 Zusatz von Glucose und Glucoseoxidase

Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde unter Zusatz von Glucose und Glucoseoxidase in 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) durchgeführt.

#### *Variation der Konzentration an Glucoseoxidase:*

Konz. Kulturüberstand:	50 $\mu$ L
Natriumacetatpuffer:	1290 $\mu$ L
Glucoselösung (500 mM):	160 $\mu$ L (Endkonzentration 50 mM)
Temperieren auf 27 °C für 5 min	
$\beta,\beta$ -Carotinlösung:	100 $\mu$ L

Glucoseoxidase ( $100 \text{ U mL}^{-1}$ ): 0 – 1,5  $\mu\text{L}$  (0 – 150 mU)

(1 U ist die Enzymmenge, die bei pH 7,0 und 25 °C 1  $\mu\text{mol}$   $\beta$ -D-Glucose pro Minute zu D-Gluconsäure-5-lacton und  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert.)

*Variation der Konzentration an Glucose:*

Konz. Kulturüberstand: 50  $\mu\text{L}$

Natriumacetatpuffer: 1434 – 1290  $\mu\text{L}$

Glucoselösung (500 mM): 16 – 160  $\mu\text{L}$  (Endkonzentration 5 – 50 mM)

Temperieren auf 27 °C für 5 min

$\beta,\beta$ -Carotinlösung: 100  $\mu\text{L}$

Glucoseoxidase ( $100 \text{ U mL}^{-1}$ ): 0 oder 1  $\mu\text{L}$  (0 oder 100 mU)

(Das Gesamtvolumen im Testansatz (nach Zugabe der  $\beta,\beta$ -Carotinlösung) betrug jeweils 1,6 mL)

### **2.3.6 Aktivitätsbestimmung von MsP1 (rekombinant) aus *Aspergillus niger***

Die Messung der Enzymaktivität vom rekombinanten MsP1 wurde bei einer Temperatur von 27 °C in 50 mM Natriumacetat-Puffer (pH 6) durchgeführt. 1  $\mu\text{L}$  enzymhaltige Lösung wurden mit 1490  $\mu\text{L}$  Pufferlösung versetzt und nach einer Inkubationszeit von 5 min 100  $\mu\text{L}$   $\beta,\beta$ -Carotinlösung (2.3.1) hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (20 mM) gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 450 nm verfolgt.

#### 2.3.6.1 Variation der Wasserstoffperoxidkonzentration

Zur Untersuchung des Einflusses der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration auf die Enzymaktivität wurde der Enzymtest (2.3.6) mit verschiedenen Volumina an  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (20 mM) durchgeführt.

Enzymhaltige Lösung:	1 $\mu\text{L}$
Natriumacetatpuffer:	1498 – 1400 $\mu\text{L}$
Temperieren auf 27 °C für 5 min	
$\beta,\beta$ -Carotinlösung:	100 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung (20 mM):	1 – 100 $\mu\text{L}$ (20 – 200 nmoL)

(Das Gesamtvolumen im Testansatz (nach Zugabe der  $\beta,\beta$ -Carotinlösung) betrug jeweils 1,6 mL)

## 2.4 Konzentrierung

### 2.4.1 Ultrafiltration

Für die Konzentrierung oder Umpufferung von Volumina < 200 mL wurden je nach Probenvolumen Centricon-Puls 70-Einheiten von der Firma Millipore, VivaSpin 15R-Einheiten der Firma Vivascience oder Amicon Ultra-4-Einheiten der Firma Millipore verwendet. Alle Ultrafiltrationseinheiten hatten eine Ausschlussgröße von 10.000 Da. Sie wurden vor der ersten Verwendung mit dest. Wasser gespült. Die Einheiten wurden bei 4000 rpm (3313 g) und 4 °C zentrifugiert (SORVALL RT7 Plus-Zentrifuge).

### 2.4.2 Tangential-Flow-Filtration

Die Konzentrierung von >200 mL Kulturüberstand erfolgte mittels „Tangential-Flow-Filtration“ mit einer Vivaflow 200-Einheit (10.000 Da MWCO, Hydrosart Membran) der Firma Vivascience. Sowohl Vorbereitung als auch Konzentrierung und Reinigung der Einheit erfolgten gemäß der Bedienungsanleitung. Die Konzentrierung wurde bei einer Flussrate von 300 mL min<sup>-1</sup> bei 4 °C durchgeführt. Sobald das gewünschte Endvolumen erreicht war, wurden Zulauf- und Rücklaufschlauch aus der Probelösung entfernt und die Einheit mit 20 mL Pufferlösung gespült. Zur Reinigung wurde 0,5 M NaOH in der Einheit rezirkuliert (30 min, 75 mL min<sup>-1</sup>). Anschließend

wurde die Einheit mit dest. Wasser gespült und zur Lagerung mit 10%igem Ethanol gefüllt.

## 2.5 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

Gerät: Biologic-Duo-Flow der Firma Bio-Rad

Detektion: Absorptionsmessung bei 280 nm

Fraktionssammler: Modell 2128 der Firma Bio-Rad

Datenaufnahme: Biologic Duo Flow Workstation

### 2.5.1 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

2.5.1.1 Vorversuche zur Reinigung der  $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme aus *T. suaveolens*

Säule: HiTrap DEAE FF aus dem HiTrap IEX Selection Kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden)

Säulenmaterial: DEAE Sepharose Fast Flow (schwacher Anionenaustauscher)

Säulenvolumen: 1 mL

Probenschleife: 2 mL

Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>

Fraktionsgröße: 2 mL (Beginn bei 5 mL; Ende bei 40 mL)

Startpuffer: 5,5 mM Citronensäure/9,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,5 (Pumpe A)

Elutionspuffer A: 8,0 mM Citronensäure/3,9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,0 (Pumpe B, Port 2)

Elutionspuffer B: 5,5 mM Citronensäure/9,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,5 + 1 M NaCl (Pumpe B, Port 2)

Probe: konzentrierter Kulturüberstand von *T. suaveolens*

## Methode:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Autozero
- 3) Startpuffer, 5 mL
- 4) Injektion der Probe; Spülen der Probenschleife mit 4 mL Startpuffer
- 5) Startpuffer, 7 mL
- 6) Elutionspuffer A, 13 mL
- 7) Elutionspuffer B, 5 mL
- 8) Startpuffer, 10 mL

In den gesammelten Fraktionen erfolgte der Nachweis des Zielproteins mittels Enzymtest (2.3.4).

#### 2.5.1.2 Scale up der Reinigung der $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme aus *T. suaveolens*

Säule:	HiPrep 16/10 DEAE FF (GE Healthcare, München)
Säulenmaterial:	DEAE Sepharose Fast Flow (schwacher Anionenaustauscher)
Säulenvolumen:	20 mL
Probenaufgabe:	Methode 1: 5 mL-Probenschleife Methode 2: Pumpe B, Port 4
Flussrate:	5 mL min <sup>-1</sup>
Fraktionsgröße:	Methode 1: 5 mL (Beginn bei 20 mL; Ende bei 540 mL) Methode 2: 5 mL (Beginn bei 10 mL, Ende bei 500 mL)
Startpuffer:	5,5 mM Citronensäure/9,0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 4,5
Elutionspuffer A:	8,0 mM Citronensäure/3,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 3,0
Elutionspuffer B:	5,5 mM Citronensäure/9,0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 4,5 + 2 M NaCl

Probe: konzentrierter Kulturüberstand von *T. suaveolens*

Methode 1:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Autozero
- 3) Startpuffer (Pumpe A), 20 mL
- 4) Injektion der Probe; Spülen der Probenschleife mit 10 mL Startpuffer (Pumpe A)
- 5) Startpuffer (Pumpe A), 140 mL
- 6) Elutionspuffer A (Pumpe B, Port 1), 260 mL
- 7) Elutionspuffer B (Pumpe B, Port 2), 100 mL
- 8) Startpuffer (Pumpe A), 50 mL

Methode 2:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Startpuffer (Pumpe B, Port 1), 10 mL
- 3) Autozero
- 4) Startpuffer (Pumpe B, Port 1), 20 mL
- 5) Probenaufgabe (Pumpe B, Port 4), 20 mL
- 6) Startpuffer (Pumpe B, Port 1), 170 mL
- 7) Elutionspuffer A (Pumpe A), 260 mL
- 8) Elutionspuffer B (Pumpe B, Port 2), 50 mL
- 9) Startpuffer (Pumpe B, Port 1), 50 mL

2.5.1.3 Reinigung von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* (Scheibner, 2006, modifiziert)

Säulenmantel: Durchmesser: 2 cm (Pharmacia Biotech)

Säulenmaterial: Q Sepharose High performance (Pharmacia Biotech)

Säulenvolumen: 25 mL

Probenaufgabe: über Pumpe B, Port 4

Flussrate: 3 mL min<sup>-1</sup>

Fraktionsgröße: 5,0 mL (Beginn bei 28 mL, Ende bei 298 mL)  
2,5 mL (Beginn bei 298 mL, Ende bei 328 mL)  
5,0 mL (Beginn bei 328 mL, Ende bei 350 mL)

Startpuffer: 50 mM Natriumacetat, pH 6

Elutionspuffer A: 50 mM Natriumacetat, pH 6 + 1 M NaCl

Elutionspuffer B: 50 mM Natriumacetat, pH 6 + 2 M NaCl

Probe: konzentrierter Kulturüberstand von *M. scorodoni* / 50 mM Natriumacetat, pH 6 (1:1)

Methode:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Startpuffer (Pumpe B, Port 3), 20 mL
- 3) Autozero
- 4) Probenaufgabe (Pumpe B, Port 4), 19 mL
- 5) Startpuffer (Pumpe B, Port 3), 125 mL
- 6) Linearer Gradient von 100% Startpuffer (Pumpe A) zu 100% Elutionspuffer A (Pumpe B, Port 1), 320 mL
- 7) Elutionspuffer B (Pumpe B, Port 2), 40 mL
- 8) Startpuffer (Pumpe B, Port 3), 60 mL

Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt, konzentriert (Vivaspin 15R, 10.000 MWCO) und bei -70 °C gelagert.

## 2.5.2 Gelfiltrationschromatographie (GFC)

### 2.5.2.1 Reinigung der $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme aus *T. suaveolens*

Säule: Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)

Säulenmaterial: Superdex 200 (Trennbereich 10-600 kDa)

Säulenvolumen: 24 mL

Probenschleife: 200  $\mu$ L

Flussrate: 0,5 mL min<sup>-1</sup>

Fraktionsgröße: 1 mL (über den gesamten Lauf)

Elutionspuffer: 35 mM Citronensäure/30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,5 (Pumpe A)

Methode:

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

#### 2.5.2.2 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels GFC

Säule: Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare)

Säulenmaterial: Superdex 200 (Trennbereich 10-600 kDa)

Säulenvolumen: 24 mL

Probenschleife: 200 µL

Flussrate: 0,5 mL min<sup>-1</sup>

Elutionspuffer: 35 mM Citronensäure/30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,5 (Pumpe A)

Standardproteine: HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit (Amersham Biosciences)

Methode:

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

Die Retentionskoeffizienten ( $K_{av}$ ) der Standardproteine wurden gegen die Logarithmen ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Die Kalibriergerade wurde mittels linearer Regression erstellt.

Die Retentionskoeffizienten wurden nach folgender Gleichung berechnet:

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

$V_e$ : Elutionsvolumen des Standardproteins [mL]

$V_0$ : Ausschlussvolumen [mL]

$V_t$ : Gesamtvolumen der Säule [mL]

Für die Bestimmung des Ausschlussvolumens wurde das Standardprotein Thyroglobulin verwendet. Ein Teil dieses Proteins eluiert als Dimer (Molekulargewicht: 1338 kDa) von der Säule. Da dieses Molekulargewicht außerhalb des Trennbereiches der Säule liegt, entspricht das Elutionsvolumen dieses Dimers dem Ausschlussvolumen der Superdex 200-Säule (Scheibner, 2006).

2.5.2.3 Reinigung von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* (Scheibner, 2006, modifiziert)

Die von Scheibner (2006) für die Reinigung von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* etablierte 2. Reinigungsstufe wurde von einer analytischen Gelfiltrationssäule (Superdex 200, 24 mL Säulenvolumen, Flussrate: 0,5 mL min<sup>-1</sup>) auf eine präparative Säule übertragen. Die lineare Flussrate wurde beibehalten. Sie betrug für beide Säulen 38 cm h<sup>-1</sup>.

Säulenmantel: XK 16/70 (Amersham Biosciences)

Säulenmaterial: Superdex 200 prep grade (Amersham Biosciences)

Säulenvolumen: 284 mL

Probenschleife: 2 mL

Flussrate: 3,34 mL min<sup>-1</sup>

Fraktionsgröße: 5 mL (über den gesamten Lauf)

Elutionspuffer: 50 mM Natriumacetat, pH 6 (Pumpe B, Port 1)

Probe: konzentrierte Fraktionen nach IEX (2.5.1.3)

Methode:

- 1) UV-Lampe an
- 2) Autozero
- 4) Injektion der Probe; Spülen der Probenschleife mit 4 mL Elutionspuffer
- 5) Elutionspuffer, 294 mL

Die enzymhaltigen Fraktionen wurden gepoolt, konzentriert (Vivaspin 15R, 10.000 MWCO) und bei -70 °C gelagert.

## 2.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Gerät: HP Series 1050 mit Degasser, quarternärer Pumpe und UV/Vis-Detektor (Agilent Technologies, Böblingen)

Datenaufnahme: ChemStation for LC (Agilent Technologies)

Säule: CC 250/4 Nucleosil 100-5 C18 Nautilus mit Vorsäule (Macherey-Nagel, Düren)

Säulentemperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 20 µL

Flussrate: 1,2 mL min<sup>-1</sup>

Detektion: Absorptionsmessung bei 450 nm

Eluent A: Methanol/Acetonitril/Dichlormethan/n-Hexan  
(10 + 85 + 2,5 + 2,5)

Eluent B: Methanol/Acetonitril/Dichlormethan/n-Hexan  
(10 + 45 + 22,5 + 22,5)

Gradient: 0 – 5 min 100% Eluent A; 5 – 40 min 100% Eluent A → 100% Eluent B; 40 – 45 min 100% Eluent B

## 2.7 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden im Bereich von 350 bis 700 nm bei einer Scangeschwindigkeit von 60 nm min<sup>-1</sup> aufgenommen.

Das UV/Vis-Spektrum des  $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyms aus *T. suaveolens* wurde in 35 mM Citronensäure/30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 3,5 aufgenommen.

## 2.8 Elektrophorese

### 2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurde das Mini-Twin-System von Biometra (Göttingen) verwendet.

Folgende Lösungen wurden für die SDS-Page benötigt.

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

APS	400 g
E-pure-Wasser	ad 1 L

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

#### *Lower Tris*

Tris base	181,7 g
SDS	4,0 g
E-pure-Wasser	ad 1 L

Einstellen auf pH 8,8 mit HCl und Lagerung bei 4 °C.

#### *Upper Tris*

Tris base	60,55 g
SDS	4,0 g
E-pure-Wasser	ad 1 L

Einstelle auf pH 6,8 mit HCl und Lagerung bei 4 °C.

#### *10× Laufpuffer*

Tris base	30,2 g
-----------	--------

Glycin	144,2 g
SDS	10 g
demin. Wasser	ad 1 L

Der Laufpuffer wurde vor der Verwendung 1:10 mit demin. Wasser verdünnt.

#### *Probenauftragspuffer*

1 M Tris/HCl, pH 6,8	1 mL
SDS-Lösung (20%)	2 mL
Bromphenolblau	20 mg
Glycerol	2,3 mL
demin. Wasser	ad 8 mL

Die Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Die Gesamtkonzentration von Acrylamid und Bisacrylamid betrug im Trenngel 12% und im Sammelgel 6%. Die Crosslinker-Konzentration (Konzentration von Bisacrylamid in der Gesamtkonzentration) betrug in beiden Gelen 2,6%.

Tab. 2.5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

	Trenngel	Sammelgel
E-pure-Wasser	1,81 mL	0,789 mL
Lower Tris	1,5 mL	-
Upper Tris	-	375 µL
Acrylamid (40%)	1,755 mL	219 µL
Bisacrylamid (2%)	0,935 mL	117 µL
APS	15 µL	7,5 µL
TEMED	7,5 µL	3 µL

#### *Probenvorbereitung*

30 µL Probe wurden mit 24 µL Probenauftragspuffer versetzt, 15 min auf 95 °C

erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden 6  $\mu\text{L}$  einer 1 M DTT-Lösung zugegeben. Abhängig vom Proteingehalt der Probe wurden 10-60  $\mu\text{L}$  in eine Geltasche gegeben.

### *Elektrophorese*

Die Gelkammer wurde nach Einspannen des Gels mit 1× Laufpuffer gefüllt, so dass die Geltaschen mit Puffer bedeckt waren. Nach dem Probenauftrag wurde pro Gel eine Stromstärke von 10 mA angelegt, um die Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zu fokussieren. Anschließend wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Sobald das Bromphenolblau aus dem Probenauftragspuffer aus dem Gel hinauslief, wurde die Elektrophorese beendet.

### **2.8.2 Isoelektrische Fokussierung**

Für die Isoelektrische Fokussierung wurden Polyacrylamidgele mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3-6) der Firma Serva verwendet. Die Vorbereitung des IEF-Gels wurde gemäß der beiliegenden Bedienungsanleitung durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mittels Ultrafiltration (Ultrafree 4, MWCO 10 kDa, Millipore) mit E-pure-Wasser entsalzt. Abhängig vom Proteingehalt wurden bis zu 12  $\mu\text{L}$  Probe aufgetragen.

Elektrophoresebedingungen: 2000 V, 6 mA, 12 W, 3500 Vh

### **2.8.3 Coomassie-Färbung**

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für 1 h unter leichtem Schütteln in einer Lösung aus 40% Ethanol, 10% konz. Essigsäure und 290  $\text{mg L}^{-1}$  Coomassie Brilliant Blue fixiert und gefärbt. Für SDS-Gele wurde Coomassie Brilliant Blue R und für IEF-Gele Brilliant Blue G verwendet. Der Hintergrund wurde anschließend mit einer Lösung aus 25% Ethanol und 8% konz. Essigsäure wieder entfärbt. Das gefärbte Gel wurde zur Dokumentation eingescannt.

### 2.8.4 Silberfärbung

Für die Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987, mod.) wurden folgende Lösungen verwendet:

#### Lösung I

Methanol	50%
Essigsäure konz.	10%
Formaldehyd (37%ig)	0,5 mL L <sup>-1</sup>

#### Lösung II

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

#### Lösung III

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	0,2 g L <sup>-1</sup>
--	-----------------------

#### Lösung IV

Silbernitrat	2,0 g L <sup>-1</sup>
Formaldehyd (37%ig)	0,75 mL L <sup>-1</sup>

#### Lösung V

Natriumcarbonat	60 g L <sup>-1</sup>
Formaldehyd (37%ig)	0,5 mL L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	1,0 mg L <sup>-1</sup>

#### Lösung VI

Methanol	10%
Essigsäure konz.	12%

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

#### Färbung

- 1) Gel 20 min in Lösung I fixieren
- 2) 2 × 10 min in Lösung II waschen
- 3) 1 min in Lösung III inkubieren
- 4) 3 × 20 sec mit Wasser waschen
- 5) 20 min in Lösung IV inkubieren
- 6) 2 × 20 sec mit Wasser waschen

- 7) Gel in Lösung V entwickeln, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind
- 8) 15 min in Lösung VI fixieren
- 9) 3 × 5 min mit Wasser waschen

Das gefärbte Gel wurde zur Dokumentation eingescannt.

### 2.8.5 Aktivitätsentfärbung

Zur Identifizierung der  $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme wurde ein IEF-Gel geteilt und mit einem Teil eine Aktivitätsentfärbung durchgeführt. Die andere Gelhälfte wurde Coomassie- oder Silbergefärbt.

#### *Herstellung eines $\beta,\beta$ -Carotingels*

$\beta,\beta$ -Carotin-Lösung (2.3.1)	25 mL
Pufferlösung (35 mM Citronensäure/30 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 3,5)	7,5 mL
Agarose	0,35 g

Aufkochen in der Mikrowelle, bis zur vollständigen Lösung der Agarose.

Gießen eines Gels mit einer Schichtdicke von ca. 2 mm.

Das IEF-Gel wurde mit dem  $\beta,\beta$ -Carotingel überschichtet und bei 38 °C inkubiert bis entfärbte Banden sichtbar waren. Das  $\beta,\beta$ -Carotingel wurde zur Dokumentation eingescannt.

Für die Aktivitätsentfärbung von Luteinester- bzw. Capsanthinestern wurden die Gele analog unter Verwendung von Luteinester bzw. Capsanthinesterlösung (2.3.1.1) hergestellt. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C bis entfärbte Banden sichtbar waren.

### 2.8.6 Bestimmung von Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt

#### 2.8.6.1 Molekulargewicht

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes mittels SDS-Page wurde auf die SDS-Gele 1-2  $\mu$ L eines Proteinstandards (Precision Plus Protein Standard, Bio-Rad)

mit aufgetragen. Die Logarithmen der Molekulargewichte wurden gegen die Laufstrecke aufgetragen und das Molekulargewicht der Zielproteine mit Hilfe der Regressionsgeraden abgeschätzt.

#### 2.8.6.2 Isoelektrischer Punkt (pI)

Zur Bestimmung des pI wurde auf die IEF-Gele ein Proteinstandard (Low range pI, Amersham Biosciences bzw. Protein Test Mixture for pI-Determination, pH 3-10, Serva) mit aufgetragen. Die pI der Standardproteine wurden gegen ihre Laufstrecke aufgetragen und der pI der Zielproteine mit Hilfe der Regressionsgeraden abgeschätzt. Zur Ermittlung der pI der  $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme wurde die Lage der entfärbten Banden auf dem Aktivitätsgel genau vermessen. Die pI konnten anschließend ebenfalls mit Hilfe der Regressionsgeraden ermittelt werden.

## 2.9 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels DC-Protein-Assay (Bio-Rad) durchgeführt. Der Assay beruht auf der von Lowry *et al.* (1951) entwickelten Methode zur Proteinbestimmung mit alkalischer Kupfernitratlösung (Reagenz A) und einer Folinlösung (Reagenz B). Für die Bestimmung werden 20  $\mu\text{L}$  Probe mit 100  $\mu\text{L}$  Reagenz A versetzt und die Lösungen durch vortexen vermischt. Anschließend werden 800  $\mu\text{L}$  Reagenz B zugegeben und sofort gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min wird die Extinktion bei 750 nm gegen Wasser als Blindwert bestimmt. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde die Bestimmung mit BSA-Standardlösungen (0,2-1,2  $\text{mg mL}^{-1}$ ) durchgeführt und die Extinktion gegen den Proteingehalt aufgetragen.

## 2.10 cDNA-Synthese

### 2.10.1 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde Mycel von *M. scorodoni* verwendet. Das Mycel wurde bei einer Enzymaktivität von  $0,51 \text{ mU mL}^{-1}$  durch Filtration vom Kulturüberstand abgetrennt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. 210 mg des Mycels wurden für die Isolierung eingesetzt. Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Plant Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt (Handbuch 06/2001).

### 2.10.2 Erststrangsynthese

Für die Erststrangsynthese der cDNA wurde der SMART PCR cDNA Construction Kit der Firma CLONTECH verwendet (Protokoll PT3000-1, Version PR87510).  $3 \mu\text{L}$  RNA von *M. scorodoni* (2.10.1) wurden eingesetzt. Abweichend vom Protokoll wurde anstelle der MMLV reversen Transkriptase die Super Script II RNase H- reverse Transkriptase (GIBCO, Paisley, Schottland) mit dem dazugehörigen Arbeitspuffer verwendet.

### 2.10.3 LD-PCR

Die Amplifizierung der cDNA mittels LD-PCR erfolgte ebenfalls mittels SMART PCR cDNA Construction Kit der Firma CLONTECH (Protokoll PT3000-1, Version PR87510). Folgendes Cycloer-Programm wurde verwendet:

95 °C	1 min
25 Cyclen:	
95 °C	15 sec
68 °C	6 min

Die cDNA wurde anschließend aliquotiert und bei  $-20 \text{ °C}$  gelagert.

## 2.11 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurde der NucleoSpin Plant Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet (Handbuch 07/2003/Rev 2).

Mycel von *M. scorodonius* wurde durch Filtration vom Kulturüberstand getrennt. 300 mg Mycel wurden mit Ethanol überschichtet und 5 h bei 4 °C stehengelassen. Nach Entfernung des Ethanols wurde das Mycel unter flüssigem Stickstoff unter Zugabe von 300 µL Lysis-Puffer C1 und 10 µL RNase A gemörsert. Die weiteren Arbeitsschritte wurden wie im „Support protocol for fungi (CTAB method)“ angegeben durchgeführt. Zur Verbesserung der Ausbeute erfolgte die Elution in zwei Schritten mit auf 70 °C vorgewärmtem Elutionspuffer (vgl. Punkt 2.6 im Handbuch). Die DNA-haltige Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

## 2.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.12.1 Analytische PCR

Analytische PCRs wurden zur Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur durchgeführt in einem Gradienten-Cycler (Eppendorf) durchgeführt.

#### *PCR-Ansatz*

Template	x µL
dNTPs (je 10 mM)	0,4 µL
10 × PCR-Puffer	2 µL
Primer a (10 mM)	1 µL
Primer b (10 mM)	1 µL
HotStar Taq (5 U µL <sup>-1</sup> )	0,1 µL
E-pure-Wasser	ad 20 µL

(Bei Verwendung von cDNA wurden 0,1 µL und bei Verwendung von genomischer DNA wurden 0,5 µL als Template eingesetzt.)

*Cyclerprogramm*

Lid: 105 °C

- 1) T = 95 °C, 15 min
- 2) T = 94 °C, 1 min
- 3) T = y °C, 1 min, G = z, R = 3,0 °C/s (entspricht y °C ± z °C; meist z = 10)
- 4) T = 72 °C, 2 min
- 5) Goto 2 Rep. 40
- 6) T = 72 °C, 10 min
- 7) Hold 4 °C

**2.12.2 Präparative PCR**

Nach der Ermittlung der optimalen Hybridisierungstemperatur wurden präparative PCRs zur Gewinnung größerer DNA-Mengen durchgeführt. Dazu wurde der PCR-Ansatz von 20 µL auf 50 µL vergrößert und bis zu 6 PCRs parallel angesetzt.

*PCR-Ansatz*

Template	x µL
dNTPs (je 10 mM)	1 µL
10 × PCR-Puffer	5 µL
Primer a (10 mM)	2,5 µL
Primer b (10 mM)	2,5 µL
HotStar Taq (5 U µL <sup>-1</sup> )	0,25 µL
E-pure-Wasser	ad 50 µL

(Bei Verwendung von cDNA wurden 0,25 µL und bei Verwendung von genomischer DNA wurden 1,25 µL als Template eingesetzt.)

*Cyclerprogramm*

Lid: 105 °C

- 1) T = 95 °C, 15 min
- 2) T = 94 °C, 1 min
- 3) T = y °C, 1 min

- 4) T = 72 °C, 2 min
- 5) Goto 2 Rep. 40
- 6) T = 72 °C, 10 min
- 7) Hold 4 °C

### 2.12.3 Kolonie-PCR

Nach Ligation eines Fragmentes in den TA-Vektor und Transformation in *E. coli* wurden mit einzelnen Kolonien PCRs durchgeführt, um die Insertion des Vektors in die Zellen zu bestätigen. Es wurden die für das entsprechende Fragment spezifischen Primer eingesetzt und die PCR bei der für diese Primerkombination optimalen Hybridisierungstemperatur durchgeführt. Als Template wurden Zellen von *E. coli* aus einer einzelnen Kolonie „gepickt“ und im PCR-Ansatz suspendiert.

#### *PCR-Ansatz*

Template	Zellen von <i>E. coli</i>
dNTPs (je 10 mM)	0,4 µL
10 × PCR-Puffer	2 µL
Primer a (10 mM)	1 µL
Primer b (10 mM)	1 µL
HotStar Taq (5 U µL <sup>-1</sup> )	0,1 µL
E-pure-Wasser	ad 20 µL

#### *Cyclerprogramm*

Lid: 105 °C

- 1) T = 95 °C, 15 min
- 2) T = 94 °C, 1 min
- 3) T = y °C, 1 min
- 4) T = 72 °C, 2 min
- 5) Goto 2 Rep. 40
- 6) T = 72 °C, 10 min
- 7) Hold 4 °C

## 2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden folgende Lösungen verwendet:

### *50× TAE-Puffer*

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

### *1× TAE-Puffer*

50 × TAE-Puffer	20 mL L <sup>-1</sup>
-----------------	-----------------------

### *6× DNA-Auftragspuffer (Sambrook; Russell, 2001)*

Bromphenolblau	0,025 g
Xylencyanol	0,025 g
Glycerol	3 mL
H <sub>2</sub> O	ad 10 mL

Zur Herstellung der Gele wurden 0,8-1,2% Agarose in 1 × TAE-Puffer suspendiert und in der Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 0,5 µL Ethidiumbromidlösung pro 10 mL Lösung zugegeben. Das Gel wurde in einer Gelvorrichtung mit eingehängtem Kamm gegossen.

Zur Elektrophorese wurde die Gelvorrichtung horizontal in eine Elektrophoresekammer gehängt, die mit 1× TAE-Puffer als Laufpuffer gefüllt war. Die Proben wurden mit 6× DNA-Auftragspuffer versetzt (Verhältnis Probe/Puffer 5:1) und auf das Gel aufgetragen. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Größenstandard (1 kb DNA-Leiter; New England Biolabs) mit aufgegeben. Die Elektrophorese wurde je nach Gelgröße bei 80-140 V durchgeführt. Die Detektion der DNA erfolgte unter UV-Licht bei 312 nm. Zur Dokumentation von Gelen wurde eine Anlage der Firma INTAS verwendet, die mit einer digitalen Kamera und einem Videoprinter ausgestattet war.

## 2.14 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentration von Plasmidpräparationen wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm gegen Wasser als Blindwert bestimmt. Dabei entspricht  $E = 1$  einer Konzentration von  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  an doppelsträngiger DNA.

Die DNA-Konzentrationen von PCR-Fragmenten wurden über ein analytisches Agarosegel abgeschätzt. Dazu wurden 25, 50, 75 und 100 ng eines DNA-Quantifizierungsstandards (Größe: 500 bzw. 1000 bp, Konzentration:  $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) mit auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Konzentration wurde durch einen Vergleich der Bandenintensitäten abgeschätzt.

## 2.15 DNA-Fragmentisolierung

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wurden diese zunächst mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des MinElute Gel Extraction Kits der Firma Qiagen (Handbook 03/2003) aus dem Gel extrahiert. Die Elution erfolgte mit E-pure-Wasser, pH 7,4.

## 2.16 Kultivierung von *E. coli*

### 2.16.1 LB-Medium

Trypton	$10 \text{ g L}^{-1}$
Hefeextrakt	$5 \text{ g L}^{-1}$
NaCl	$10 \text{ g L}^{-1}$
Autoklavieren ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$ , 20 min)	

### 2.16.2 LB-Agar

LB-Medium (2.16.1)	1 L
Agar-Agar	15 g

Autoklavieren (121 °C, 20 min)

### 2.16.3 Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50 mg mL <sup>-1</sup>
------------	------------------------

Steril filtrieren; Lagerung bei -20 °C

### 2.16.4 LB<sub>amp</sub>-Medium

LB-Medium (2.16.1)	1 L
Ampicillin-Stammlösung	1 mL

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

### 2.16.5 LB<sub>amp</sub>-Agar

LB-Agar (2.16.2)	1 L
Ampicillin-Stammlösung	1 mL

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

### 2.16.6 Stammhaltung

Die Stammhaltung erfolgte für den Stamm ohne Vektor auf LB-Agarplatten (2.16.2). Stämme mit Plasmid wurden auf LB<sub>amp</sub>-Agarplatten (2.16.5) gehalten,

da durch das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz eingeführt wurde. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und anschließend im Kühlschrank gelagert.

### 2.16.7 Übernachtskultur (ÜN)

5 mL LB-Medium (bzw. LB<sub>amp</sub>-Medium für Stämme mit Plasmid) (2.16.1 bzw. 2.16.4) wurden im Reagenzglas mit einer einzelnen Kolonie von einer LB- bzw. LB<sub>amp</sub>-Platte (2.16.2 bzw. 2.16.5) angeimpft. Zum Wachstum wurden die Kulturen bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

### 2.16.8 Glycerol-Stock

Zur längeren Lagerung wurden von Stämmen Glycerol-Stocks angelegt. Dazu wurden 850 µL einer frischen ÜN (2.16.7) mit 150 µL sterilem Glycerol vermischt. Die Mischung wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

## 2.17 Gentransfer

### 2.17.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen mittels Rubidiumchloridmethode wurden folgende Lösungen verwendet:

#### *RF1-Puffer*

RbCl	1,2 g
MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	0,99 g
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,15 g
Kaliumacetat	0,29 g
Glycerol (99%)	15 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 mL

Mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 einstellen

Steril filtrieren

#### *RF2-Puffer*

MOPS	0,21 g
RbCl	0,12 g
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,11 g
Glycerol (99%)	15 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 mL

Mit NaOH auf pH 6,8 einstellen

Steril filtrieren

Der entsprechende *E. coli*-Stamm wurde von einer frisch ausgestrichenen LB-Platte (2.16.2) in eine 5 mL Übernachtskultur (2.16.7) überimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Ein 500 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL LB-Medium wurde mit dieser Übernachtskultur beimpft, so dass ein OD<sub>578</sub>-Wert von 0,05 zu Beginn der Kultur eingestellt war. Es wurde bei 37 °C und 200 rpm kultiviert, bis eine OD<sub>578</sub> von 0,3 erreicht war. Die Kultur wurde in sterile Falcon-Tubes gefüllt und für 15 min auf Eis gestellt. Zur Ernte der Zellen wurde bei 3500 rpm (2555 g) und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 1/3 des ursprünglichen Volumens RF1-Puffer (eiskalt) resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden abermals bei 3500 rpm (2555 g) und 4 °C abzentrifugiert, vorsichtig in 1/12,5 des ursprünglichen Volumens RF2-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis gestellt. Aliquots von 200 µL wurden in vorgekühlten Eppendorf-Cups pipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70 °C.

#### **2.17.2 Ligation mittels TA-Cloning**

Für die Ligation von frisch isolierten DNA-Fragmenten (2.15) in den pCR 2.1-Vektor wurde der TA Cloning Kit der Firma Invitrogen verwendet (Handbuch Version V, 7. April 2004, 25-0024; S. 4).

### Ligationsansatz

DNA-Fragment (~ 10 ng)	x $\mu\text{L}$
10 $\times$ Ligationspuffer	1 $\mu\text{L}$
pCR 2.1-Vektor (25 ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	2 $\mu\text{L}$
T4 DNA Ligase	1 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O (steril)	ad 10 $\mu\text{L}$

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C.

### 2.17.3 Transformation in *E. coli*

Die kompetenten *E. coli*-Zellen (2.17.1) wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 10  $\mu\text{L}$  eines Ligationsansatzes vermischt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis stengelassen, anschließend im Wasserbad für 2 min auf 42 °C erhitzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Es wurden 800  $\mu\text{L}$  LB-Medium (2.16.1) zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 13.000 rpm (16060 g), 4 °C) und in 250  $\mu\text{L}$  LB-Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie auf LB<sub>amp</sub>-Platten (2.16.5) ausplattiert (max. 150  $\mu\text{L}$ ) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.17.4 Blau/weiss-Screening

Das Blau/weiss-Screening diente zur Identifizierung positiver Transformanten. Dazu wurden LB<sub>amp</sub>-Platten vor dem Ausplattieren der Zellen mit 40  $\mu\text{L}$  IPTG-Lösung (100 mM) und 40  $\mu\text{L}$  X-Gal-Lösung (40 mg  $\text{mL}^{-1}$  in DMF) versetzt. Die Lösungen wurden auf den Platten verteilt und die Platten für 30 min auf 37 °C temperiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen (2.17.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Positive Transformanten, bei denen das LacZ'-Gen im pCR 2.1-Vektor durch ein Insert in der „multiple cloning site“ unterbrochen war, zeigten keine  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und blieben weiß. Bei Transformanten mit pCR 2.1-Vektor ohne Insert konnte das LacZ'-Gen hingegen exprimiert werden, so dass sie  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität besaßen und sich in Gegenwart von IPTG und X-Gal blau färbten.

## **2.18 Sterilisation**

### **2.18.1 Sterilisation von Arbeitsmaterialien**

Alle zu sterilisierenden Medien, Lösungen und Geräte wurden für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden durch Sterilfilter (Porendurchmesser 0,22 µm) steril filtriert. Nicht-autoklavierbare Arbeitsgeräte wurden über Nacht in Ethanol (70%) eingelegt und anschließend unter der sterilen Werkbank getrocknet.

### **2.18.2 Sterilisation von S1-Abfällen**

Sowohl feste als auch flüssige S1-Abfälle wurden für 40 min bei 121 °C autoklaviert. Autoklavierte Kulturen wurden anschließend filtriert. Flüssigkeiten wurden dem Abwasser zugeführt und feste Bestandteile wurden mit dem Laborabfall entsorgt.

## **2.19 Entsorgung von Lösungsmitteln und Chemikalien**

Die Entsorgung von Lösungsmitteln wurde durch die weitgehende Wiederverwendung nach destillativer Aufarbeitung auf ein Minimum reduziert. Nicht wieder verwendbare Lösungsmittel wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nicht halogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- nicht halogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- halogenierte, mit Wasser mischbare Lösungsmittel
- halogenierte, nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittel.

Silber- und Ethidiumbromid-haltige Abfälle wurden getrennt gesammelt.

Die Lösungsmittel wurden ebenso wie die Chemikalienreste der zentralen Entsorgungseinrichtung der Leibniz Universität Hannover zugeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 $\beta,\beta$ -Carotin-abbauende Enzymaktivitäten im Medium während des Kulturverlaufs

Die Basidiomyceten *Cyathus pallidus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trametes suaveolens* und *Trametes versicolor* wurden auf  $\beta,\beta$ -Carotin-haltigen Agarplatten bei 25 °C kultiviert (2.2.6). Mit Mycelstücken von diesen Agarplatten wurden Vorkulturen angeimpft (2.2.7). Nach 7 Tagen (*T. suaveolens* und *T. versicolor*) bzw. nach 14 Tagen (*I. benzoinum* und *C. pallidus*) wurden Hauptkulturen angesetzt (2.2.8). Die Aktivität von  $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzymen wurde im Kulturüberstand der Hauptkulturen über 20 Tage verfolgt (Abb. 3.1).

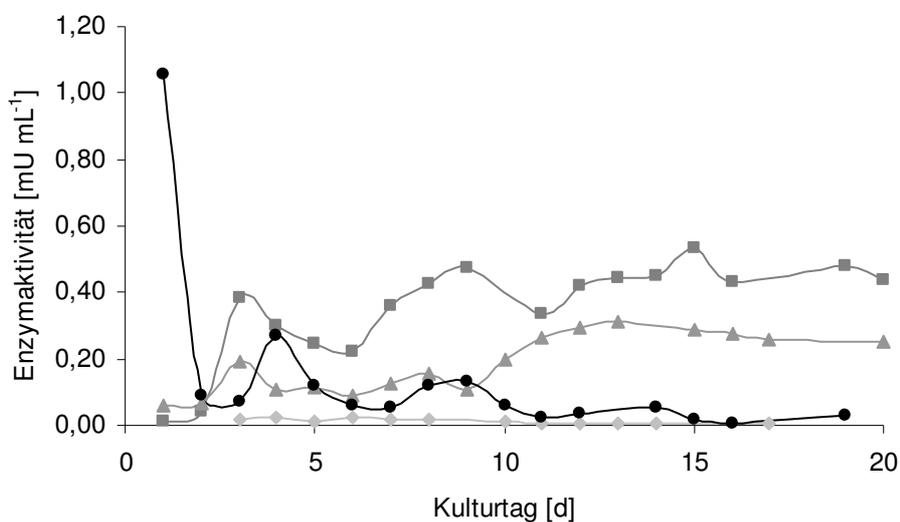


Abb. 3.1:  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauende Enzymaktivitäten während der Kultivierung  
 (—●— *Trametes suaveolens*; —■— *Ischnoderma benzoinum*;  
 —▲— *Trametes versicolor*; —◆— *Cyathus pallidus*)

Die Enzymaktivität wurde photometrisch bei 27 °C in 43 mM Citronensäure/113 mM Phosphat-Puffer, pH 5,5 bestimmt (2.3.4). Da bei

*I. benzoinum* unter diesen Bedingungen keine Enzymaktivität nachweisbar war, wurde 70 mM Citronensäure/60 mM Phosphat-Puffer, pH 3,5 verwendet.

Bei *I. benzoinum* war ein Anstieg der Enzymaktivität zwischen dem 2. und 3. Kulturtag zu verzeichnen. Die maximale Enzymaktivität war am 15. Kulturtag erreicht.

Bei *T. versicolor* zeigte die Enzymaktivität am 3. Kulturtag ein erstes, lokales Maximum. Die höchste Aktivität wurde zwischen dem 12. und 13. Kulturtag detektiert.

Bei *T. suaveolens* war bereits am 1. Kulturtag die höchste Enzymaktivität beobachten. Es folgte ein zweites Maximum am 4. Kulturtag und ein drittes, geringer ausgeprägtes am 9. Kulturtag.

Bei der Kultivierung von *C. pallidus* wurde kein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität beobachtet.

## **3.2 Charakterisierung der $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme aus *T. suaveolens***

### **3.2.1 Messung der Enzymaktivität**

Zur Messung der Enzymaktivität diente der von Ben Aziz *et al.* (1971) entwickelte und von Langhoff (2002) und Scheibner (2006) modifizierte Enzymtest. Hierbei wurde die enzymhaltige Probelösung mit einer wässrigen  $\beta,\beta$ -Carotin-Lösung (2.3.1) versetzt und die Extinktionsabnahme bei 450 nm photometrisch verfolgt (2.3.4).

### **3.2.2 Anwendbarkeit des Enzymtests**

Um die Enzymaktivität quantitativ bestimmen zu können, muss die Extinktionsabnahme über einen gewissen Zeitraum linear sein. Bei

entsprechend verdünnten Proben war dies für mindestens 10 min der Fall (Abb. 3.2).

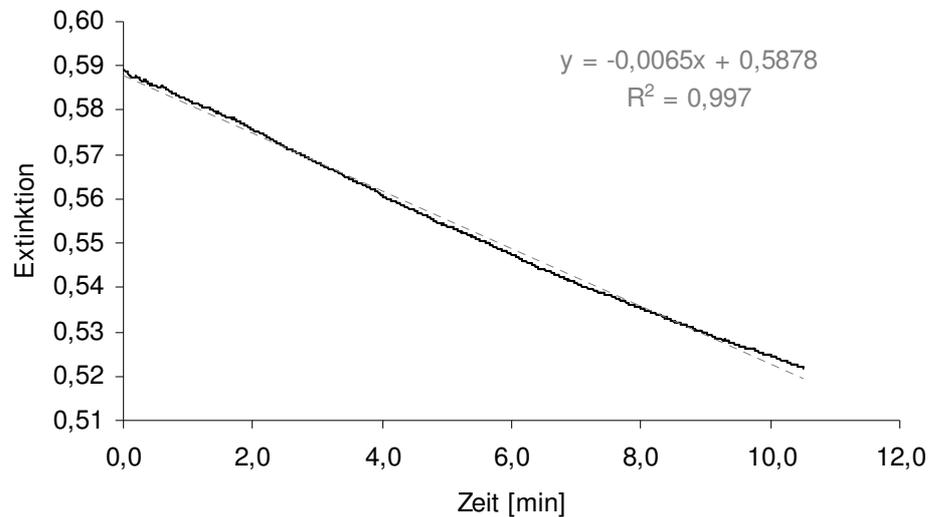


Abb. 3.2: Extinktionsabnahme bei 450 nm über die Zeit während des Enzymtests mit konzentriertem Kulturüberstand von *T. suaveolens*

Darüber hinaus müssen über einen Bereich Enzymkonzentration und Enzymaktivität proportional zueinander sein (Suelter, 1990). Um den Bereich zu ermitteln, in dem diese Proportionalität besteht, wurden Kulturüberstand von *T. suaveolens* und 43 mM Citronensäure/113 mM Phosphat-Puffer, pH 5,5 in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und der Enzymassay bei 27 °C durchgeführt.

Es wurde ein Konzentrationsbereich ermittelt, in dem Enzymkonzentration und Enzymaktivität proportional zueinander sind (Abb. 3.3).

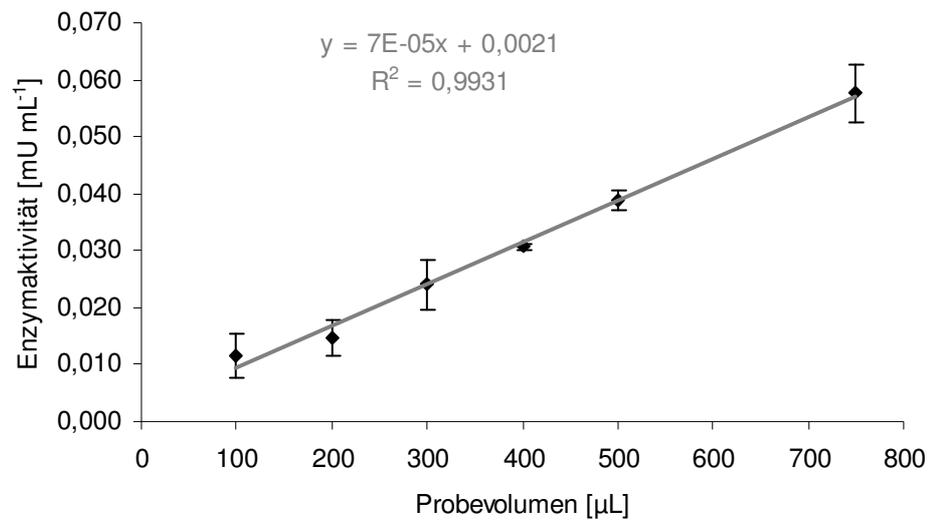


Abb. 3.3: Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Probenvolumen in Kulturüberstand von *T. suaveolens*

### 3.2.3 pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde konzentrierter Kulturüberstand mit Citronensäure/Phosphat-Puffer (2.3.4.2) versetzt und der Enzymtest bei einer Temperatur von 27 °C durchgeführt. Der pH-Wert der Pufferlösungen variierte zwischen pH 3,0 und pH 6,0. Bei pH 3,5 war die Enzymaktivität maximal (Abb. 3.4). Daher wurden alle weiteren Messungen bei diesem pH-Wert durchgeführt.

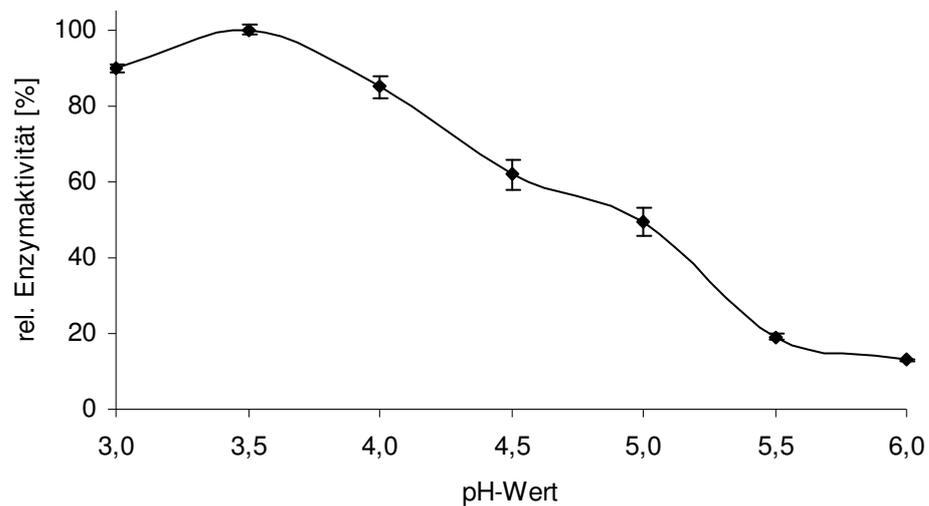


Abb. 3.4: Relative Enzymaktivität [%] in Abhängigkeit vom pH-Wert

### 3.2.4 Temperatur-Optimum

Für die Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde konzentrierter Kulturüberstand mit 70 mM Citronensäure/60 mM Phosphat-Puffer, pH 3,5 versetzt. Die Lösungen wurden jeweils 5 min bei der entsprechenden Temperatur vorgewärmt und dann für die Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt (2.3.4.1). Die höchste Enzymaktivität wurde bei einer Temperatur von 38 °C beobachtet (Abb. 3.5), weshalb diese Temperatur für alle weiteren Aktivitätsbestimmungen beibehalten wurde.

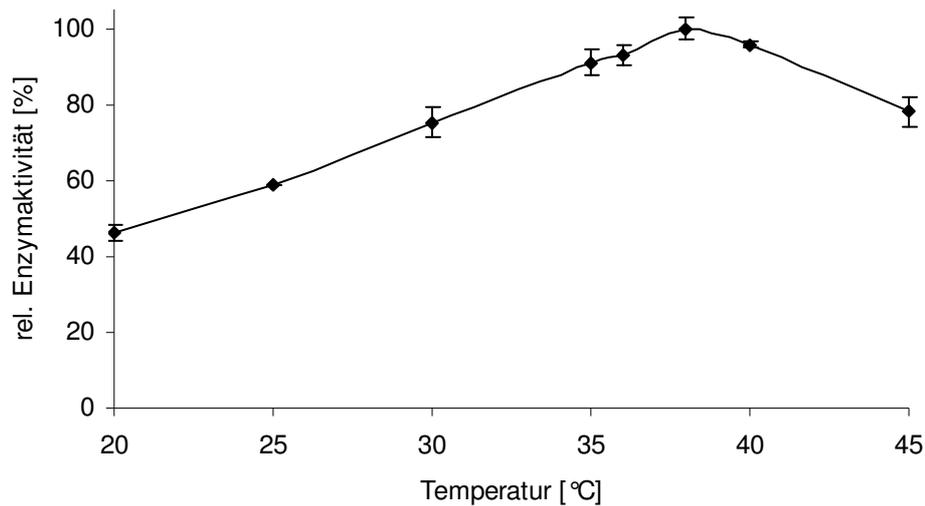


Abb. 3.5: Relative Enzymaktivität [%] in Abhängigkeit von der Temperatur

### 3.2.5 Variation der Pufferkonzentration

Um den Einfluss der Pufferstärke auf die Enzymaktivität zu ermitteln, wurde der Enzymtest mit Citronensäure/Phosphat-Puffer, pH 3,5 mit unterschiedlichen Pufferkonzentrationen durchgeführt. Dazu wurde konzentrierter Kulturüberstand mit dem entsprechenden Puffer versetzt und die Enzymaktivität bei 38 °C gemessen (2.3.4.3). Die höchste Enzymaktivität wurde in einem Bereich zwischen 7,0 mM Citronensäure/6,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 35 mM Citronensäure/30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> beobachtet (Abb. 3.6).

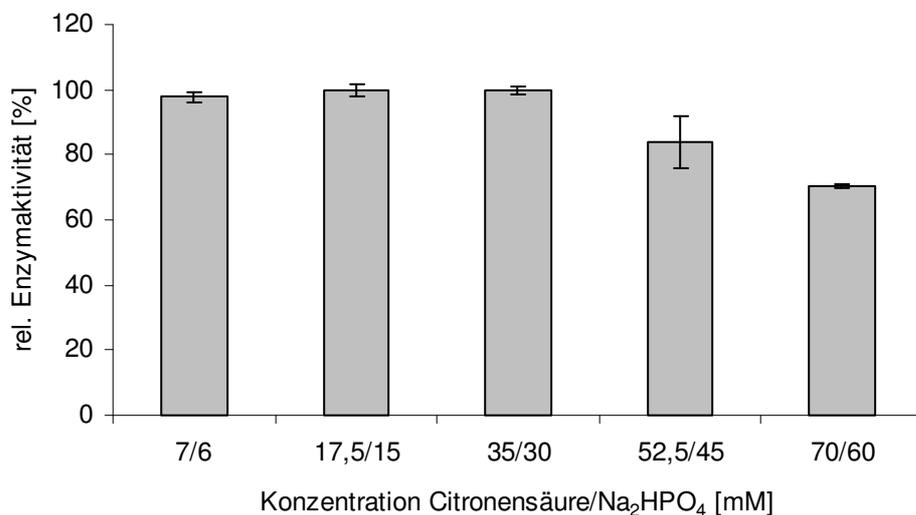


Abb. 3.6: Relative Enzymaktivität [%] in Abhängigkeit von der Konzentration des Citronensäure/Phosphat-Puffers

### 3.2.6 Einfluss von Wasserstoffperoxid

Der Enzymtest wurde mit konzentriertem Kulturüberstand unter Zusatz von 200 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführt (2.3.4.5). Dies führte zu einer Aktivitätssteigerung auf ca. 150% im Vergleich zur Enzymaktivität ohne Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Allerdings war diese Steigerung nur in den ersten 2 min des Enzymtests zu beobachten. Danach flachte die Kurve stark ab während die Extinktionsabnahme (und damit

die Enzymaktivität) ohne Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  über einen Zeitraum von 10 min konstant blieb.

### 3.2.7 Einfluss von Natriumchlorid

Um zu überprüfen, ob der Einsatz von Natriumchlorid-haltigen Pufferlösungen während der Enzymreinigung einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat, wurden für den Enzymtest Pufferlösungen mit 0 – 1 M NaCl eingesetzt (2.3.4.4). Um einen Einfluss der Pufferkonzentration auf die gemessenen Enzymaktivitäten auszuschließen, wurde die Bestimmung in zwei unterschiedlich konzentrierten Citronensäure/Phosphat-Puffern, pH 3,5 (7,0 mM/6,0 mM und 35 mM/30 mM) durchgeführt (Abb. 3.7). Bereits bei Zusatz von 0,05 M NaCl sank die Aktivität auf knapp über 80% der Aktivität ohne NaCl-Zusatz. Bei einer NaCl-Konzentration von 0,25 M betrug der Aktivitätsverlust 65%.

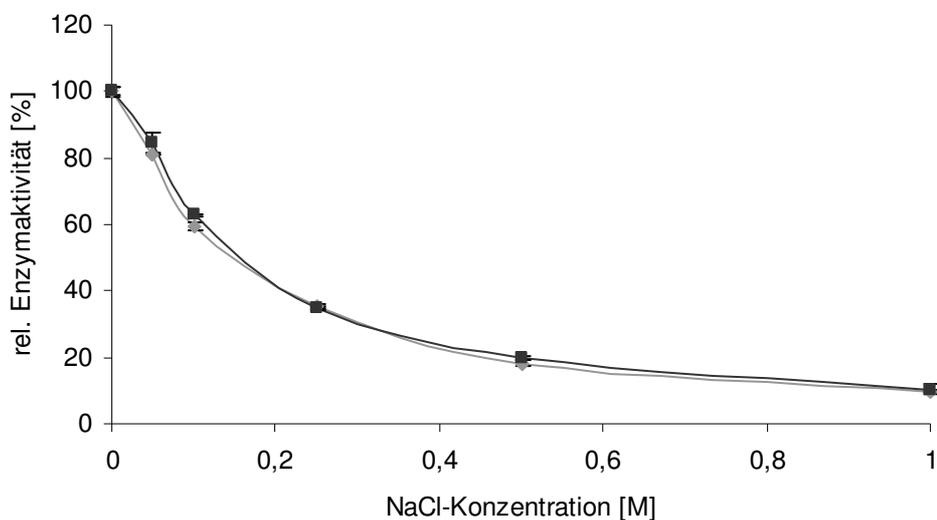


Abb. 3.7: Relative Enzymaktivität in Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration  
(—■— 35 mM Citronensäure/30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; —◆— 7 mM Citronensäure/6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)

Durch Dialyse gegen 7,0 mM Citronensäure/6,0 mM Phosphat-Puffer, pH 3,5 konnte die Enzymaktivität nicht wieder regeneriert werden.

### 3.2.8 Temperaturstabilität

Konzentrierter Kulturüberstand wurde mit Citronensäure/Phosphat-Puffer (7,0 mM/6,0 mM), pH 3,5 versetzt und bei 25 °C und 30 °C inkubiert. Nach 15, 30, 60 und 120 min wurde die Enzymaktivität bestimmt (Abb. 3.8). Auch nach 120 min war keine signifikante Abnahme der Enzymaktivität zu verzeichnen.

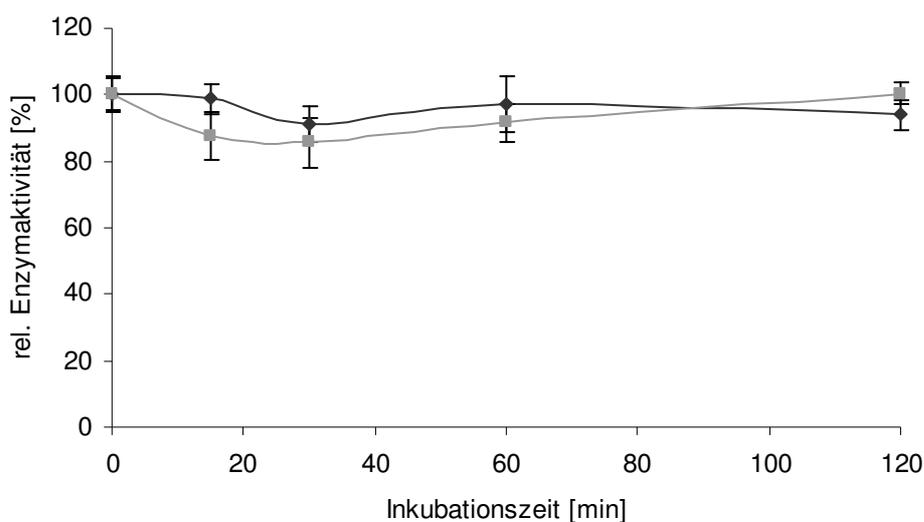


Abb. 3.8: Relative Enzymaktivität [%] in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (—◆— 25 °C; —■— 30 °C)

### 3.2.9 Einfluss von Spurenelementen

Sowohl bei der Konzentrierung als auch bei der Ionenaustauschchromatographie waren hohe Aktivitätsverluste zu verzeichnen, die durch Rekombination mit Filtrat bzw. Durchbruch teilweise minimiert werden konnten (siehe 3.3.1 und 3.3.2.1).

Die Enzymaktivität von konzentriertem Kulturüberstand von *T. suaveolens* wurde nach Zusatz von unterschiedlichen Mengen an Spurenelementlösung (2.2.2; enthält FeCl<sub>3</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> und CuSO<sub>4</sub>) in Citronensäure/Phosphat-Puffer (7 mM/6 mM), pH 3,5 bestimmt (Abb. 3.9).

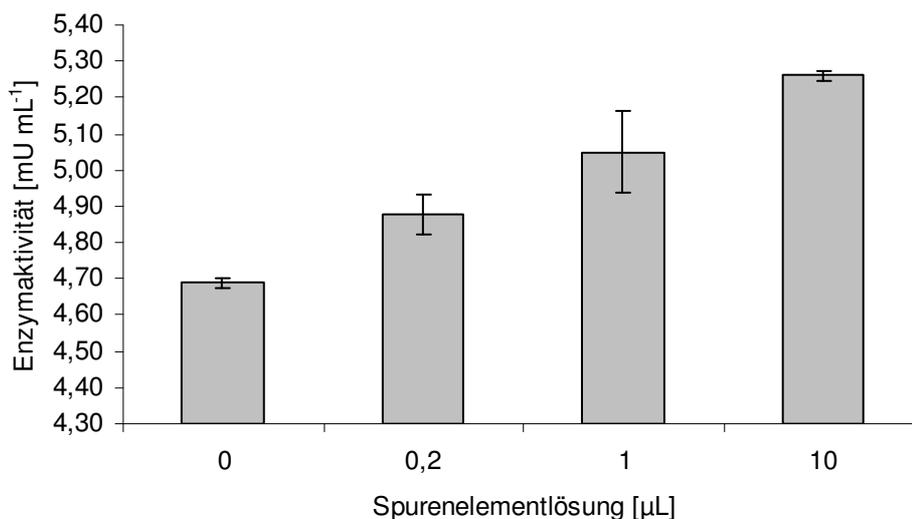


Abb. 3.9: Enzymaktivität [mU mL<sup>-1</sup>] nach Zugabe von Spurenelementlösung

Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von Spurenelementlösung deutlich gesteigert. Auf den Blindwert hatte die Spurenelementlösung hingegen keinen Einfluss. Hier wurde kein  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau beobachtet. Die enthaltenen Spurenelemente wurden anschließend einzeln zu dosiert, um zu ermitteln, welcher Bestandteil für die Aktivitätssteigerung verantwortlich ist.

10 µL einer Lösung des jeweiligen Spurenelementes wurden zum Enzymtest (2.3.4) zugesetzt. Die Konzentration der einzelnen Lösungen entsprach der Konzentration in der Spurenelementlösung (FeCl<sub>3</sub> und ZnSO<sub>4</sub>: 300 µM; MnSO<sub>4</sub>: 200 µM; CuSO<sub>4</sub>: 20 µM).

Der Zusatz von MnSO<sub>4</sub> führte zu einem signifikanten Anstieg der Enzymaktivität auf 145% im Vergleich mit einer Blindprobe ohne Zusatz eines Spurenelementes. Die anderen Spurenelemente hatten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität (Abb. 3.10).

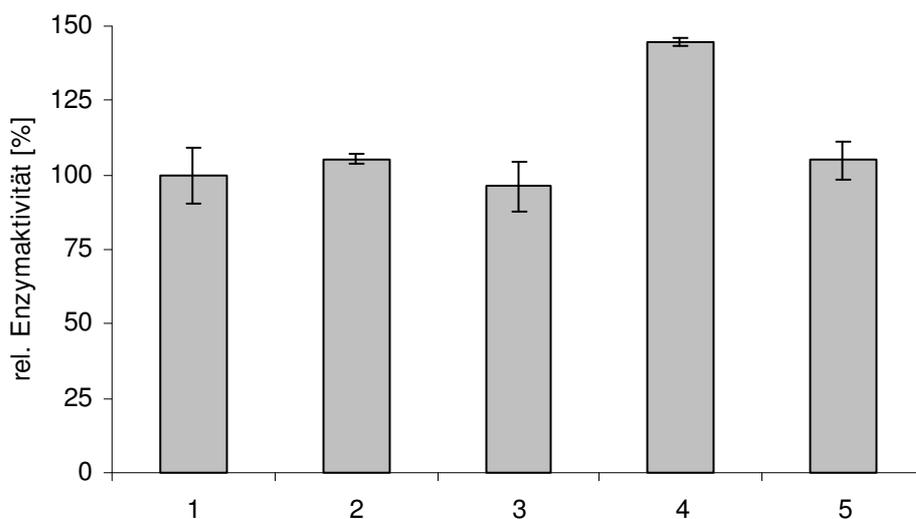


Abb. 3.10: Relative Enzymaktivität [%] nach Zusatz von Spurenelementen (1: ohne Zusatz; 2: + FeCl<sub>3</sub>; 3: + ZnSO<sub>4</sub>; 4: + MnSO<sub>4</sub>; 5: + CuSO<sub>4</sub>)

### 3.3 Reinigung der $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme aus *T. suaveolens*

#### 3.3.1 Konzentrierung

Bei der Konzentrierung von Kulturüberstand mittels „Tangential-Flow-Filtration“ (2.4.2) wurde das Volumen um den Faktor 6-8 verringert. Der Aktivitätsverlust betrug dabei über 40% (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Bilanzierung der Konzentrierung mittels „Tangential-Flow-Filtration“

Probe	Aktivität [mU mL <sup>-1</sup> ]	Gesamt- aktivität [mU]	Protein [mg mL <sup>-1</sup> ]	Gesamt- protein [mg]	Spez. Aktivität [mU mg <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]
Kultur- überstand	1,41	629	0,83	371	1,69	100
Konzentrat	5,12	353	1,08	74	4,76	56
Filtrat	0,01	4,8	0,78	292	0,01	0,7

Bei der Konzentrierung mittels Ultrafiltration (2.4.1) betrug der Aktivitätsverlust im Retentat teilweise bis zu 70% bei einer Verringerung des Volumens um den Faktor 9. Dabei wurden im Filtrat der Ultrafiltration nur 5% der eingesetzten Aktivität wiedergefunden. Wurden Filtrat und Retentat der Ultrafiltration rekombiniert, so lag die Enzymaktivität um etwa 25% höher als bei der Addition der Enzymaktivitäten in Retentat und Filtrat (Abb. 3.11). Die ursprünglich eingesetzte Enzymaktivität wurde allerdings nicht wieder erlangt.

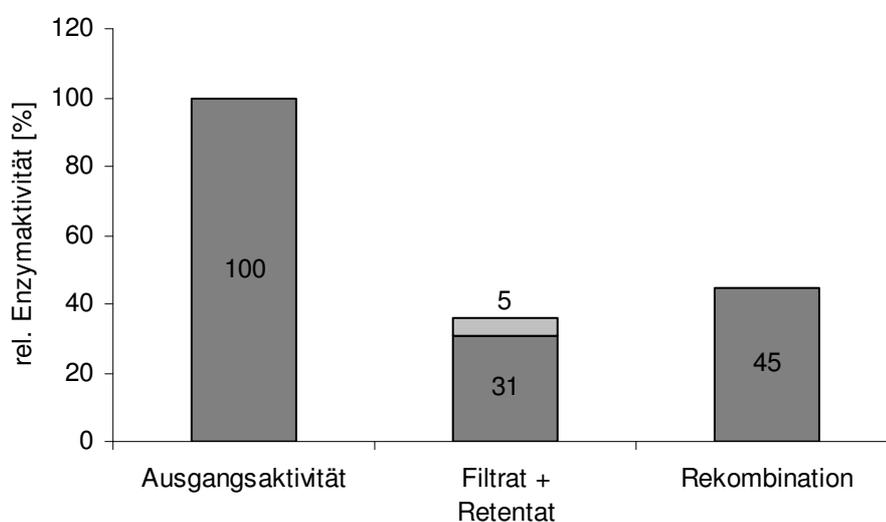


Abb. 3.11: Relative Enzymaktivität [%] vor und nach der Ultrafiltration (Amicon Ultra-4-Einheit, 10.000 MWCO) von Kulturüberstand von *T. suaveolens*

### 3.3.2 Ionenaustauschchromatographie

#### 3.3.2.1 Vorversuche

Im Vorfeld wurde mit konzentriertem Kulturüberstand von *T. suaveolens* eine Isoelektrische Fokussierung (2.8.2) mit anschließender Aktivitätsentfärbung (2.8.5) durchgeführt (Abb. 3.12).

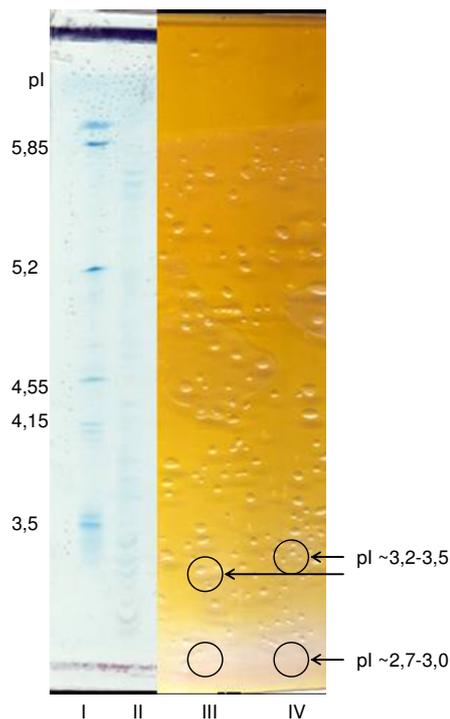


Abb. 3.12: IEF-Gel (pH 3-6) mit konzentriertem Kulturüberstand von *T. suaveolens* (links: Coomassie-gefärbt, rechts: nach Aktivitätsentfärbung; I: Standard, 5 µL; II-IV: konzentrierter Kulturüberstand, 10 µL)

Die Aktivitätsentfärbung ergab, dass der pI der gesuchten Enzyme eher im sauren Bereich lag. Daher wurde für die Reinigung ein schwacher Anionentauscher (DEAE Sepharose) eingesetzt. Der konzentrierte Kulturüberstand wurde auf die Säule aufgetragen und die Säule mit 5,5 mM Citronensäure/9,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 4,5 gewaschen. Die Zielproteine wurden anschließend mit einem pH-Shift zu 8,0 mM Citronensäure/3,9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 3 eluiert (2.5.1.1). In allen Fraktionen wurde die Enzymaktivität bestimmt. Lediglich in zwei Fraktionen wurde Aktivität detektiert. Insgesamt wurden in diesen beiden Fraktionen etwa 35% der auf die Säule gegebenen Aktivität wiedergefunden (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Bilanzierung der IEX an DEAE Sepharose

Konz. Kulturüberstand	Gesamtaktivität [mU]		Ausbeute [%]	
	3,11		100	
	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 1	Lauf 2
Fraktion 11	0,91	0,91	29	29
Fraktion 12	0,29	0,13	9	4

Durch Rekombination der aktiven Fraktionen mit dem Durchbruch konnte die Wiederfindung auf 65% der Ausgangsaktivität erhöht werden (Abb. 3.13). Der Zusatz von 0,2  $\mu$ L Spurenelementlösung zu den aktiven Fraktionen führte etwa zu der gleichen Erhöhung der Enzymaktivität (vgl. auch 3.2.9 und 3.3.1).

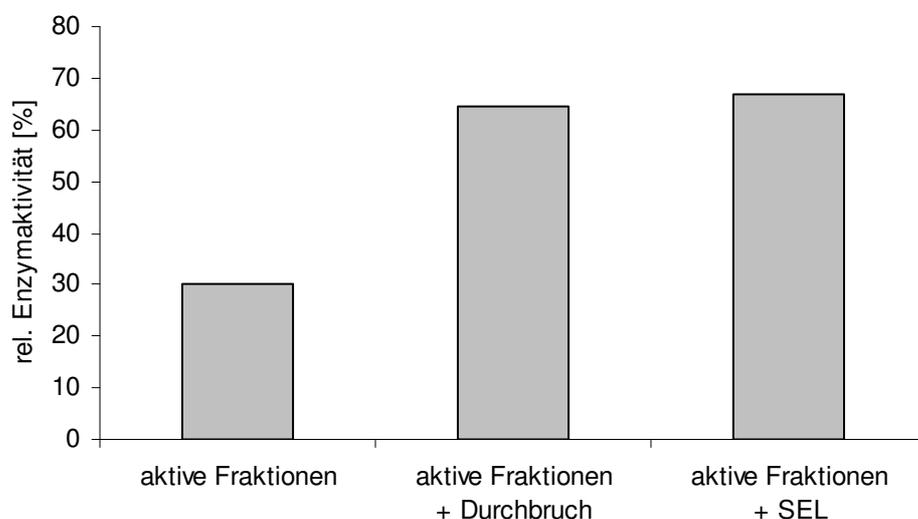


Abb. 3.13: Relative Enzymaktivität [%] in den aktiven Fraktionen der IEX nach Rekombination mit dem Durchbruch und nach Zusatz von Spurenelementlösung (SEL)

### 3.3.2.2 Scale-up

Um größere Enzymmengen reinigen zu können, wurde eine DEAE-Säule mit einem Volumen von 20 mL eingesetzt. Die Elution erfolgte wie bei den

Vorversuchen mit einem pH-Shift von 4,5 nach 3 (2.5.1.2). Enzymaktivität wurde in den Fraktionen 51-57 nachgewiesen (Abb. 3.14). Die Wiederfindung betrug etwa 27% bei einer Abtrennung von etwa 98% des Fremdproteins.

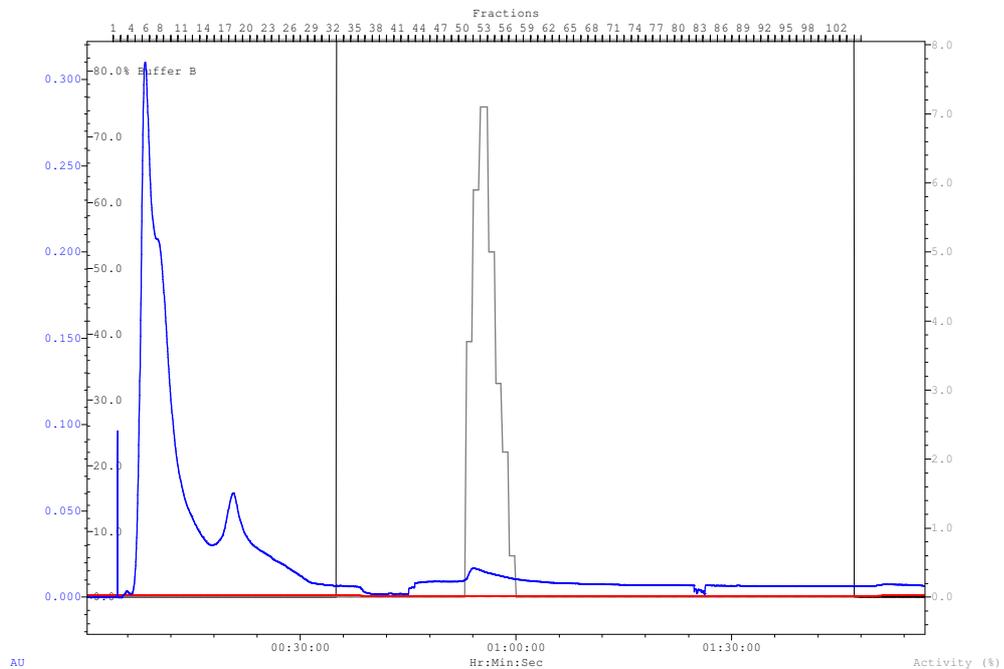


Abb. 3.14: IEX an DEAE-Sepharose; Verwendung einer 5 mL-Probenschleife  
(— UV-Absorption ( $\lambda = 280$  nm), — Leitfähigkeit,  
— Wiederfindung der Enzymaktivität in % (bezogen auf die eingesetzte Enzymaktivität))

Das auf die Säule gegebenen Volumen an konzentriertem Kulturüberstand wurde von 5 mL auf 20 mL erhöht. Die Trennung wurde dadurch nicht beeinflusst (Abb. 3.15).

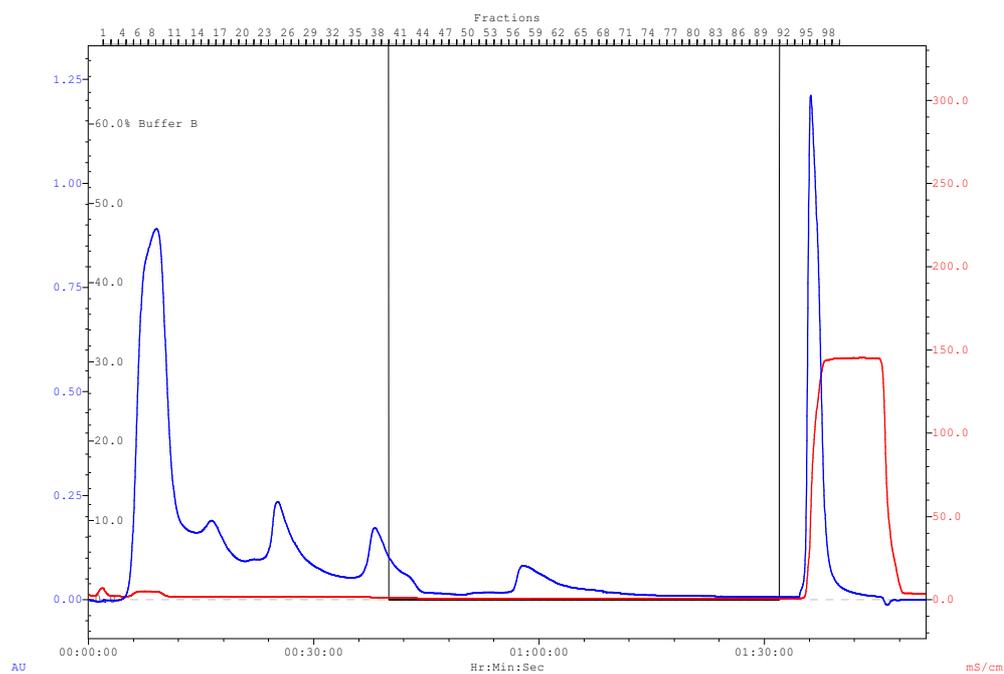


Abb. 3.15: IEX an DEAE-Sepharose; 20 mL Probenvolumen  
(— UV-Absorption ( $\lambda = 280$  nm), — Leitfähigkeit)

### 3.3.3 Gelfiltrationschromatographie

Die aktiven Fraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie wurden gepoolt, konzentriert und auf eine analytische Superdex 200-Säule aufgegeben. Die Elution erfolgte mit 35 mM Citronensäure/30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 3,5 (2.5.2.1). Enzymaktivität wurde nur in den Fraktionen 16 und 17 nachgewiesen (Abb. 3.16). Die Wiederfindung betrug ca. 80%.

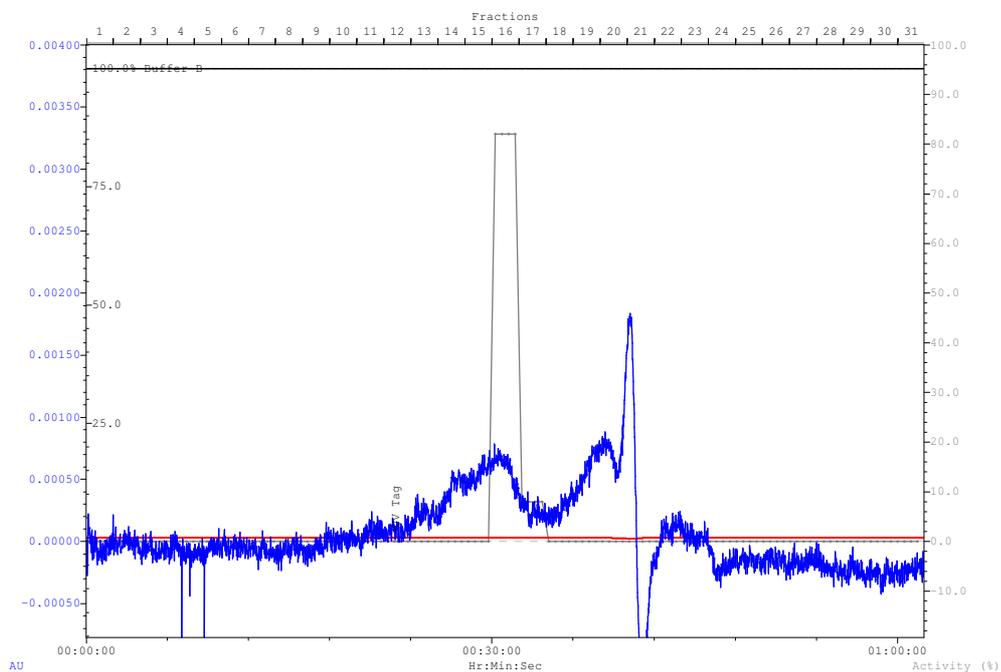


Abb. 3.16: GFC an Superdex 200  
 (— UV-Absorption ( $\lambda = 280$  nm), — Leitfähigkeit,  
 — Wiederfindung der Enzymaktivität in % (bezogen auf die eingesetzte Enzymaktivität))

### 3.3.4 Kombinierte Aufreinigung

Der Kulturüberstand wurde mittels „Tangential-Flow-Filtration“ konzentriert und über eine präparative DEAE-Säule (3.3.2.2) als erste Stufe gereinigt. Die aktiven Fraktionen wurden konzentriert (VivaSpin 15R, 10.000 Da MWCO) und auf die Superdex 200-Säule aufgegeben. Die aktiven Fraktionen mehrerer

GFC-Läufe wurden gepoolt und mittels Ultrafiltration (Amicon Ultra-4-Einheiten, 10.000 Da MWCO) konzentriert.

Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-Page (2.8.1) mit Silberfärbung (2.8.4) visualisiert (Abb. 3.17). Nach der GFC war nur noch eine Hauptbande mit einem abgeschätzten Molekulargewicht von 57 kDa zu erkennen.

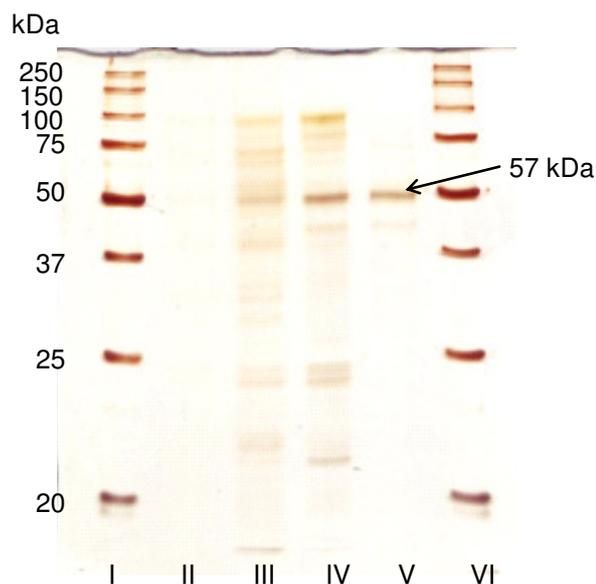


Abb. 3.17: SDS-Gel (12%ig) der einzelnen Reinigungsstufen der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens*  
 (I + VI: Standard, 2  $\mu$ L; II: Kulturüberstand, 20  $\mu$ L; III: konz. Kulturüberstand, 20  $\mu$ L;  
 IV: konz. IEX-Fractionen, 20  $\mu$ L; V: konz. GFC-Fraktion 16, 20  $\mu$ L)

Unter den nicht denaturierenden Bedingungen der GFC wurde ein Molekulargewicht von 52 kDa ermittelt (Abb. 3.18). Für die Bestimmung des Molekulargewichtes wurden die Retentionszeiten des Peakmaximums aus 11 verschiedenen GFC-Läufen gemittelt. Die Berechnung des Molekulargewichtes erfolgte über eine Kalibriergerade, bei der die Retentionskoeffizienten ( $K_{av}$ ) von Standardproteinen gegen die Logarithmen ihrer Molekulargewichte (MG) aufgetragen wurden (2.5.2.2;  $K_{av} = -0,3083 \times \log MG + 1,9707$ ;  $R^2 = 0,9887$ ).

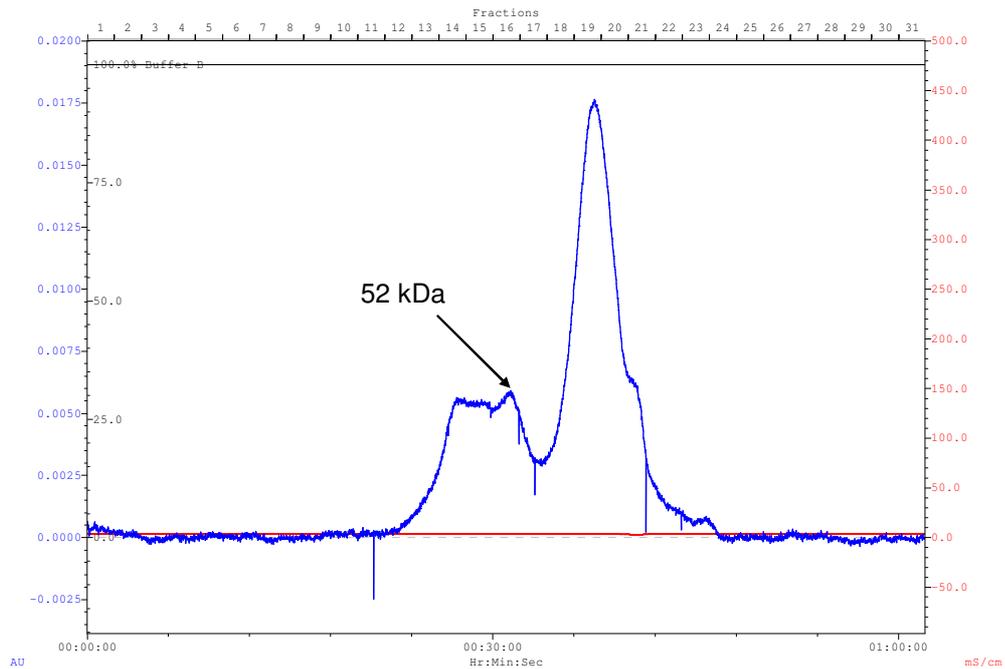


Abb. 3.18: 2. Reinigungsstufe des  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyms aus *Trametes suaveolens* (— UV-Absorption ( $\lambda = 280$  nm), — Leitfähigkeit)

Der Anteil des gereinigten Zielproteins am Gesamtprotein des Kulturüberstandes betrug 0,04%. Der Anreicherungsfaktor war 11. Bei Zusatz von  $\text{MnSO}_4$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum Enzymtest lag der Anreicherungsfaktor bei 21 (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Bilanzierung der Reinigung der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens* (blau: Standardenzymtest; rot: Enzymtest unter Zusatz von  $\text{MnSO}_4$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ )

	Protein		Aktivität		Ausbeute	spez. Aktivität	Anreicherung
	[mg mL <sup>-1</sup> ]	[mg]	[mU mL <sup>-1</sup> ]	[mU]	[%]	[mU mg <sup>-1</sup> ]	
Kultur- überstand	0,84	24,61	0,22	6,45	100	0,26	1
			0,40	11,72		0,47	
Konz. Kultur- überstand	1,27	4,83	0,97	3,69	57	0,76	3
			2,56	9,73	83	2,01	4
IEX (konz.)	0,20	0,12	0,33	0,20	3	1,63	6
			0,66	0,40	3	3,32	7
GFC (konz.)	0,09	0,01	0,26	0,04	0,6	2,92	11
			0,88	0,13	1	9,89	21

### 3.3.5 Bestimmung der Isoelektrischen Punkte

Mit der aktiven, konzentrierten GFC-Fraktion 16 wurde eine Isoelektrische Fokussierung (2.8.2) mit anschließender Silberfärbung (2.8.4) durchgeführt. Es wurden 6 Banden bei isoelektrischen Punkten zwischen 3,1 und 3,9 sichtbar (Abb. 3.19).

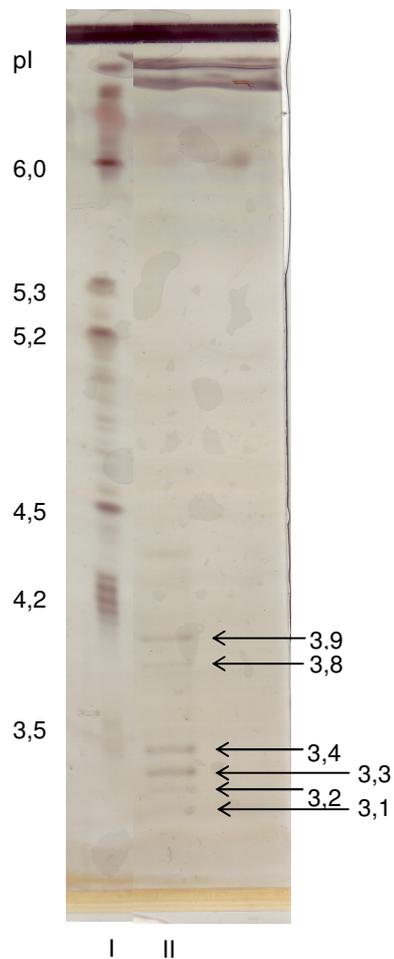


Abb. 3.19: IEF-Gel (pH 3-6) der konz. GFC-Fraktion 16 (I: Standard, 2  $\mu$ L; II: Fraktion 16, 50  $\mu$ L)

### 3.3.6 UV/Vis-Spektrum

Von der konzentrierten Probe nach der zweistufigen Reinigung wurde ein UV/Vis-Spektrum im Bereich von 350 bis 700 nm aufgenommen (2.7). Das Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 406 nm und zwei kleinere Maxima bei etwa 540 und 630 nm (Abb. 3.20).

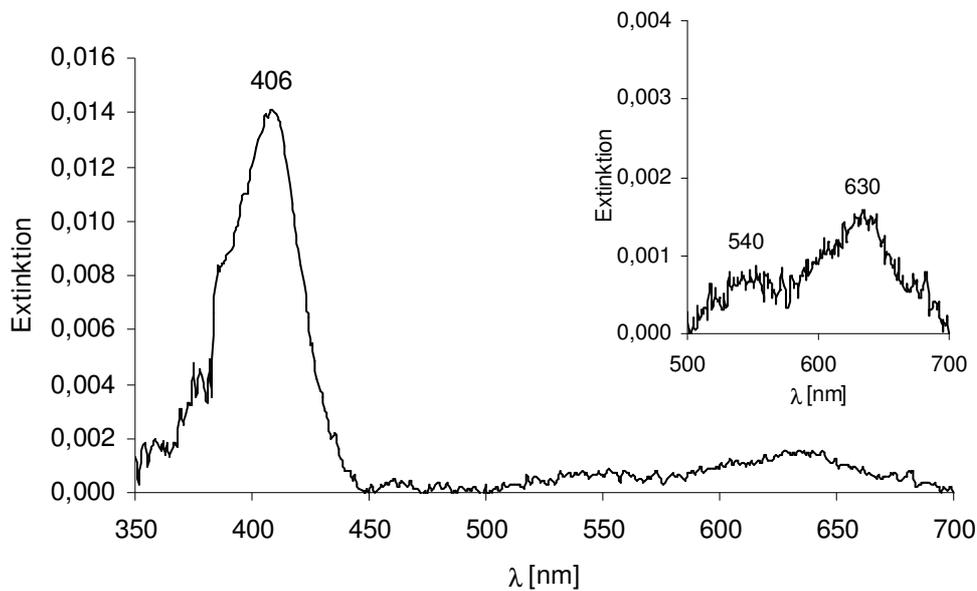


Abb. 3.20: UV/Vis-Spektrum des  $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyms aus *T. suaveolens* nach zwei Reinigungsstufen (oben rechts: Verstärkung des Bereiches von 500-700 nm)

### 3.3.7 Sequenzierung

Mit der konzentrierten Probe nach der zweistufigen Reinigung wurde eine SDS-Page mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt und die Bande bei 57 kDa ausgeschnitten. Nach Trypsin-Verdau der Bande wurde eine *de novo* Sequenzierung mittels ESI-MS/MS durchgeführt.

Die Sequenzierung ergab folgende Peptidsequenzen:

Peptid 1: ATGTVADPFLPAGR

Peptid 2: LQSDFLLGR

Peptid 3: LVPVPSDSVTDLLNR

Peptid 4: VDDSLPGTDFDSTPK

Peptid 5: SALTDCSDVLPR

(L = L oder I)

### 3.3.8 Sequenzvergleich

Mit allen erhaltenen Peptidsequenzen wurden Datenbankrecherchen durchgeführt (EMBL-EBI, Fasta – Protein Similarity Search). Für alle Sequenzen wurden die höchsten Homologien zu zwei „Manganese-repressed Peroxidasen“ aus *Trametes versicolor* gefunden. Ausgehend von diesen Homologien konnte die mutmaßliche Lage und Orientierung der Peptide in dem Enzym aus *T. suaveolens* bestimmt werden (Abb. 3.21).

O14406_TRAVE	MFSKALLSIVALAASFTAAVPSANKRATCSGGQTTANDACCVWFDVLDDI	50
Peptide TSU		
O14406_TRAVE	QSNLFHGGECEGENAHESLRLIFHDIAIFSPALTAAGQFGGGGADGSIMAH	100
Peptide TSU		
O14406_TRAVE	TDVEIQYAANGLDEIIEEQRPFALKHNVSFGDFIQFAGAVGVANCNGGP	150
Peptide TSU		
O14406_TRAVE	QIGFFAGRSNDSQPAPDKLVPLPSDSVTDILARVADAGFAPVELVWMLIS	200
Peptide TSU	<pre>              :     : .            LVPVPSDSVTDLLNR </pre>	
O14406_TRAVE	HTVAAQDKVDDSIPTGPFDPSTPFDFAQFFVESMLNGTLTPGSALHDGEV	250
Peptide TSU	<pre>               :     .           VDDSLPGTDFSTPK </pre>	
O14406_TRAVE	QSPLPGEFRLQSDFLIGRDSRTSCEWQKMIADRANMLQKFEQTVLKLGF	300
Peptide TSU	<pre>                :            LQSDFLGR </pre>	
O14406_TRAVE	SQSALTDSDVIPATGTVADPFLPAGKTMADIEAACAATPFPTLSAASG	350
Peptide TSU	<pre>                : .     :           SALTDCSDVLPRTATGTVADPFLPAGR </pre>	
O14406_TRAVE	PETTIPAVPLDS 362	
Peptide TSU		

Abb. 3.21: Vergleich der Aminosäuresequenz der „Manganese-repressed“ Peroxidase aus *T. versicolor* (UNIPROT:O14406\_TRAVE) mit den Peptidsequenzen aus *T. suaveolens* („L“ = „L“ oder „I“)

Weitere Homologien bestanden zu Manganperoxidasen (Peptide 1, 2, 4 und 5), Ligninperoxidasen (Peptide 2 und 5) und zu polyvalenten Peroxidasen (Peptide 3 und 4) (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Auswahl weiterer Homologien der Peptidsequenzen aus *T. suaveolens* zu bekannten Enzymen

UNIPROT Entry name	Organismus	Enzym	Sequenzlänge (Aminosäuren)	Identität [%]	E- value
Peptid 1: ATGTVADPFLPAGR					
Q2XQ51_9APHY	<i>Ganoderma formosanum</i>	Manganperoxidase	364	92,308	1,1
Q9UVD3_9APHY	<i>Ganoderma applanatum</i>	Manganperoxidase	364	92,308	1,1

UNIPROT Entry name	Organismus	Enzym	Sequenzlänge (Aminosäuren)	Identität [%]	E- value
Peptid 2: LQSDFLGR					
Q2TF20_9AGAR	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Manganperoxidase	175	88,889	26
Q08GD4_9APHY	<i>Phlebia tremellosa</i>	Ligninperoxidase	268	88,889	38
Peptid 3: LVPVPSDSVTDLLNR					
Q3SC77_9APHY	<i>Bjerkandera adusta</i>	Polyvalente Peroxidase	366	80,000	2,5
Peptid 4: VDDSLPGTDPFDSTPK					
Q4EW10_9APHY	<i>Coriolopsis gallica</i>	Manganperoxidase	193	85,714	0,095
Q96V55_PLEOS	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Manganperoxidase	141	85,714	0,15
Q9UR19_PLEER	<i>Pleurotus eryngii</i>	Polyvalente Peroxidase	361	85,714	0,35
Peptid 5: SALTDCSDVLPR					
Q2XQ50_9APHY	<i>Ganoderma australe</i>	Manganperoxidase	364	90,909	1,2
Q5TJC2_AGABI	<i>Agaricus bisporus</i>	Manganperoxidase	354	75,000	5,2
Q06326_PHACH	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Ligninperoxidase	371	72,727	7,3

### 3.4 Proteinbiochemische Arbeiten mit *Marasmius scorodonius*

Scheibner (2006) hat den Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin durch Kulturüberstände von *M. scorodonius* untersucht. Es wurden zwei Enzyme (MsP1 und MsP2) isoliert und biochemisch charakterisiert, die für den Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin verantwortlich sind.

### 3.4.1 Induktionsversuche

*M. scorodoni* wurde in SNL-Medium kultiviert. Zur Induktion der Produktion von MsP1 und MsP2 wurde das Medium (Vor- und Hauptkultur) mit 1 mL  $\beta,\beta$ -Carotin-Lösung ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 1 mL Lutein-Lösung ( $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) bzw. 0,1% (w/v) Lignin (organosolv) versetzt. Die Enzymaktivität der  $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme wurde in der Hauptkultur täglich bestimmt. Der Zusatz von Lignin führte im Vergleich mit der nicht induzierten Kultur zu einer Steigerung der Enzymaktivität um 50% (Abb. 3.22). Durch den Zusatz von  $\beta,\beta$ -Carotin und Lutein wurde die Enzymaktivität nicht gesteigert.

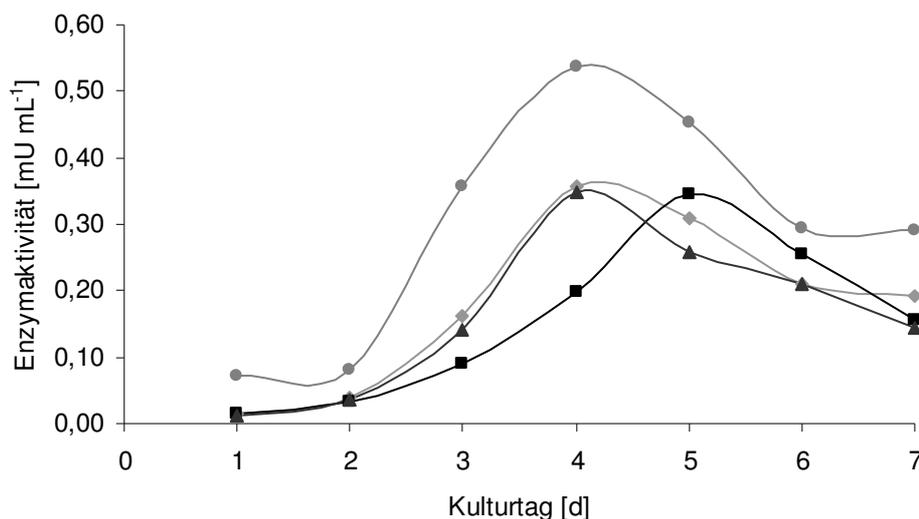


Abb. 3.22: Induktion von  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauende Enzymaktivitäten während der Kultivierung von *M. scorodoni*  
 (—◆— nicht induziert; —■— +  $\beta,\beta$ -Carotin; —▲— + Lutein; —●— + Lignin)

### 3.4.2 Kultivierung im Bioreaktor mit Ligninzusatz

Die Kultivierung erfolgte im 2 L-Bioreaktor unter Zusatz von 0,1% (w/v) Lignin (2.2.10). Die Enzymaktivität wurde täglich bestimmt. Im Vergleich zur Kultivierung im Schüttelkolben mit Ligninzusatz wurde die Enzymaktivität bei der Kultivierung im Bioreaktor mit Ligninzusatz um 44% gesteigert (Abb. 3.23).

Die höchste Aktivität wurde im Bioreaktor am 5. Kulturtag und damit einen Tag später als im Erlenmeyerkolben erreicht.

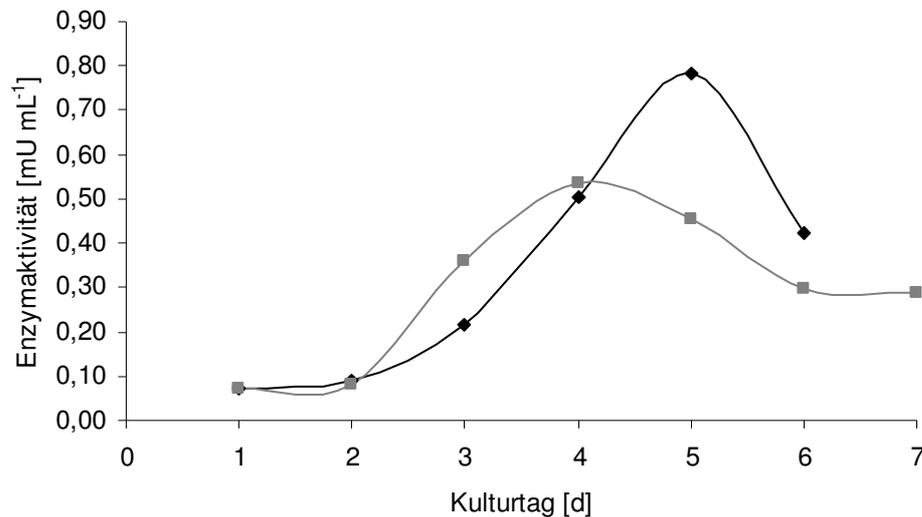


Abb. 3.23: Kultivierung von *M. scorodonius* im 2 L Bioreaktor und im Erlenmeyerkolben unter Zusatz von 0,1% Lignin  
(—◆— Bioreaktor; —■— Erlenmeyerkolben)

### 3.4.3 Abbau von Luteinestern aus *Tagetes oleoresin*

Der Abbau von Luteinestern aus *Tagetes oleoresin* mit konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodonius* wurde photometrisch verfolgt und mittels HPLC (2.6) bestimmt.

Die photometrische Bestimmung wurde analog zur Bestimmung der Enzymaktivität durchgeführt. Statt  $\beta,\beta$ -Carotin-Lösung wurde wässrige Luteinester-Lösung (2.3.1.1) eingesetzt. Die Abnahme der Extinktion wurde bei 450 nm verfolgt. Auch nach 60 min war noch eine lineare Abnahme der Extinktion zu beobachten (Abb. 3.24).

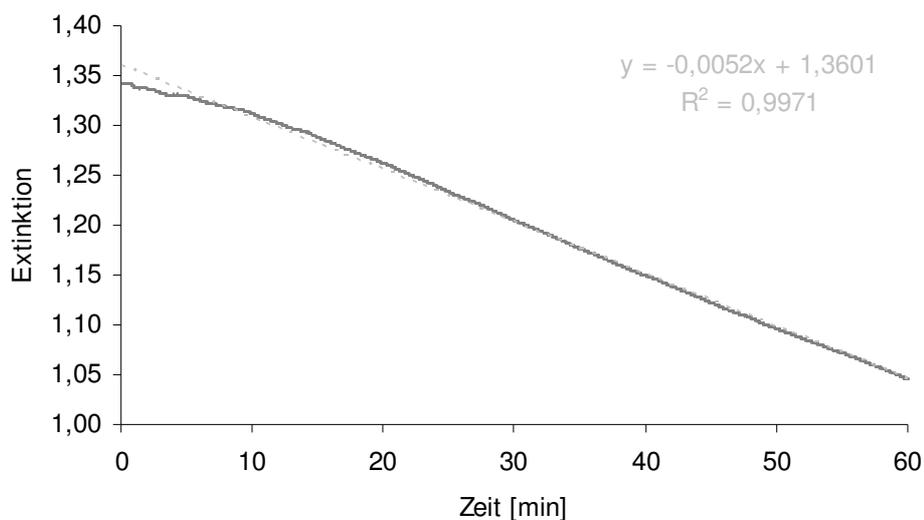


Abb. 3.24: Photometrische Bestimmung des Abbaus von Luteinestern bei 450 nm durch konzentrierten Kulturüberstand von *M. scorodoni*

Der Gehalt an Luteinestern (berechnet als Lutein) wurde vor und nach dem enzymatischen Abbau mittels HPLC bestimmt und die Enzymaktivität berechnet (Tab. 3.5). Nach 60 min waren 44% der zugegebenen Luteinester abgebaut. Aus dem Gehalt an Luteinestern vor dem enzymatischen Abbau und nach 60 min ergibt sich eine Enzymaktivität von  $1,9 \text{ mU mL}^{-1}$ . Im Vergleich dazu ist die Enzymaktivität für den  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau mit  $2,23 \text{ mU mL}^{-1}$  etwas höher.

Tab. 3.5: Quantifizierung des Abbaus von Luteinestern mit konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodoni* mittels HPLC (UV-Vis, 450 nm)

	$\Sigma$ Flächen [mAU s]	Gehalt an Luteinestern (berechnet als Lutein)			Enzymaktivität [mU mL <sup>-1</sup> ]
		[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{g}$ ]	[%]	
Vor Enzymabbau	1966	9,3	14,9	100	-
Nach 60 min	1029	5,3	8,4	56	1,9
Vergleich ( $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau, photometrisch)	-	-	-	-	2,23

Zusätzlich wurde eine IEF (2.8.2) mit anschließender Aktivitätsentfärbung (2.8.5) durchgeführt. Das Overlaygel enthielt wässrige Luteinester-Lösung. Es wurden zwei entfärbte Banden detektiert. Die isoelektrischen Punkte betragen 3,6 und 3,8 (Abb. 3.25).

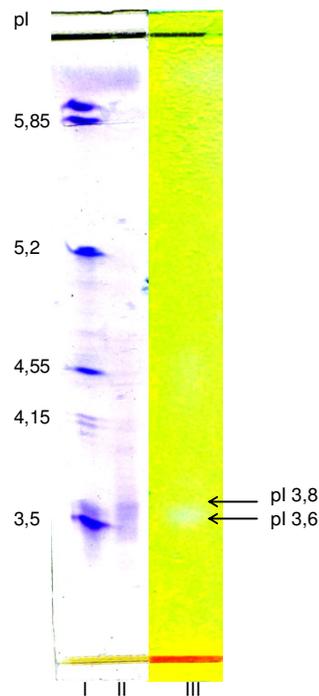


Abb. 3.25: Aktivitätsentfärbung mit Luteinester-Overlay durch konzentrierten Kulturüberstand von *M. scorodoni* nach IEF (pH-Bereich 3-6)  
(links: Coomassie-gefärbt, rechts: nach Aktivitätsentfärbung;  
I: Standard, 5 µL; II + III: Probe, 10 µL)

#### 3.4.4 Abbau von Capsanthinestern aus *Paprika oleoresin*

Der Abbau von Capsanthinestern aus *Paprika oleoresin* wurde analog zu 3.4.3 photometrisch verfolgt. Auch hier war nach 60 min noch eine Abnahme der Extinktion zu beobachten (Abb. 3.26).

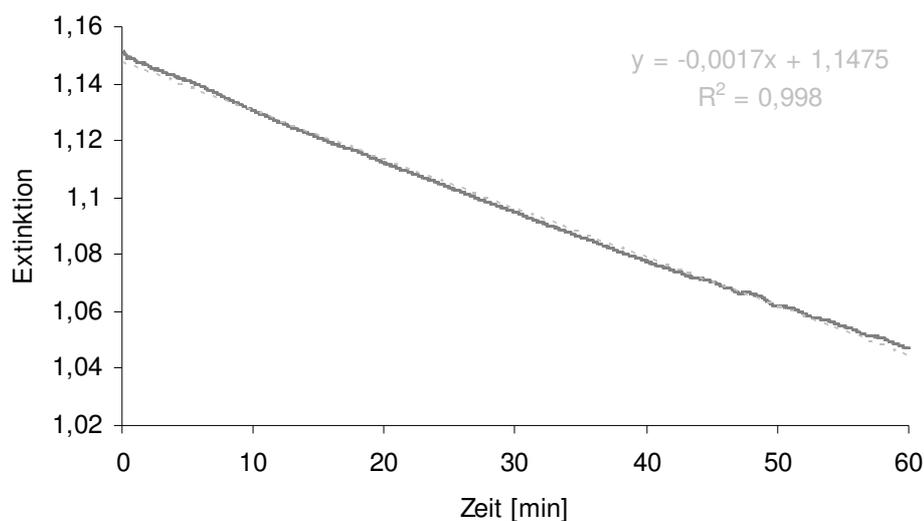


Abb. 3.26: Photometrische Bestimmung des Abbaus von Capsanthinestern bei 450 nm durch konzentrierten Kulturüberstand von *M. scorodoni*s

Die Quantifizierung des Abbaus und die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte mittels HPLC (2.6). Nach 60 min waren 8% der Capsanthinester abgebaut. Dies entspricht einer Enzymaktivität von  $0,1 \text{ mU mL}^{-1}$ . Dies sind nur 5% der Aktivität, die für den  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau bestimmt wurde (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Quantifizierung des Abbaus von Capsanthinestern mit konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodoni*s mittels HPLC (UV-Vis, 450 nm)

	$\Sigma$ Flächen [mAU s]	Gehalt an Capsanthinestern (berechnet als Lutein)			Enzymaktivität [mU mL <sup>-1</sup> ]
		[ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{g}$ ]	[%]	
Vor Enzymabbau	516	3,0	4,9	100	-
Nach 60 min	464	2,8	4,5	92	0,1
Vergleich ( $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau, photometrisch)	-	-	-	-	1,83

In einer IEF (2.8.1) mit anschließender Aktivitätsentfärbung (2.8.5) eines Capsanthinester-Agarose-Gels wurden entfärbte Banden bei isoelektrischen Punkten von 3,6 und 3,8 sichtbar (Abb. 3.27).

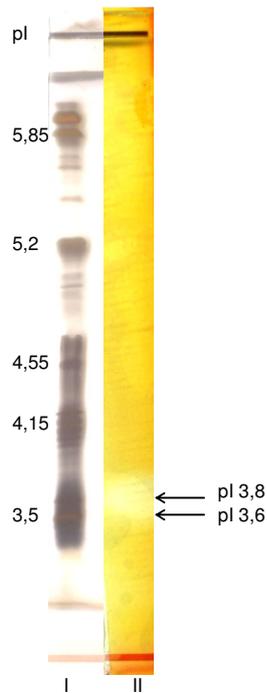


Abb. 3.27: Aktivitätsentfärbung mit Capsanthinester-Overlay durch konzentrierten Kulturüberstand von *M. scorodonius* nach IEF (pH-Bereich 3-6)  
(links: silbergefärbt, rechts: nach Aktivitätsentfärbung;  
I: Standard, 2  $\mu\text{L}$ ; II: Probe, 10  $\mu\text{L}$ )

### 3.4.5 Abbau von Bixin

Um den Abbau von Bixin photometrisch verfolgen und die Enzymaktivität berechnen zu können, wurde die Absorptionsmaxima einer wässrigen Bixinlösung ermittelt und der molare Extinktionskoeffizient bestimmt. Das UV/Vis-Spektrum zeigte drei lokale Maxima bei 438, 465 und 498 nm (Abb. 3.28 a). Der molare Extinktionskoeffizient wurde bei 465 nm bestimmt. Er betrug  $136.100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Abb. 3.28 b).

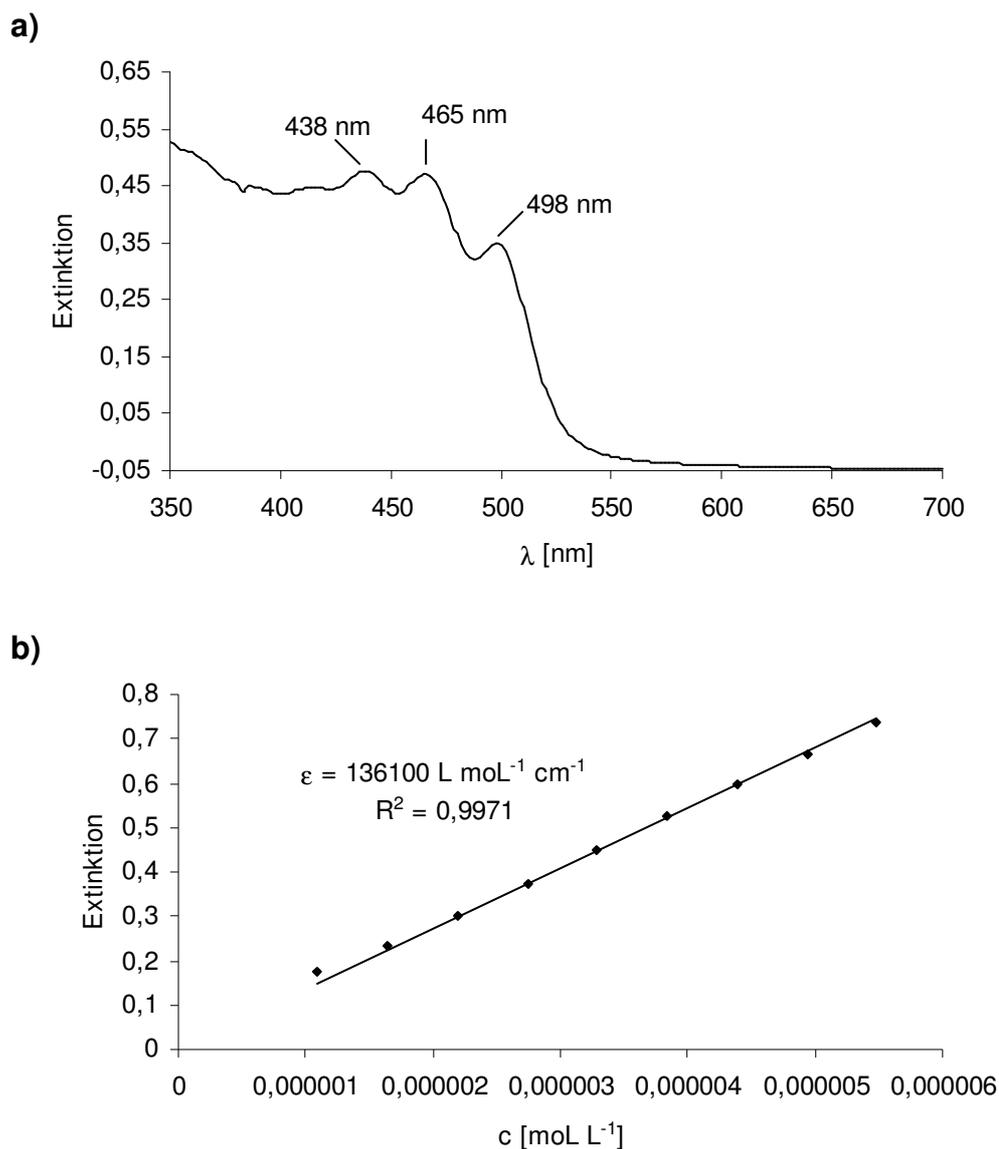


Abb. 3.28: Absorptionsmaxima **(a)** und molarer Extinktionskoeffizient bei 465 nm **(b)** von wässriger Bixinlösung

Die Enzymaktivität von konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodoni* wurde bei 465 nm und 27 °C in 50 mM Natriumacetat-Puffer bei pH 3,5 und pH 5 bestimmt. Im Vergleich zum  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau bei pH 3,5 liegt die Enzymaktivität für den Bixin-Abbau bei pH 3,5 um 62% und bei pH 5 um 77% niedriger (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: Enzymatischer Abbau von Bixin durch konzentrierten Kulturüberstand von *M. scorodoni* in 50 mM Natriumacetat-Puffer

	Enzymaktivität [mU mL <sup>-1</sup> ]	Relative Enzymaktivität [%]
pH 3,5	1,44	38
Blindwert, pH 3,5	0,00	0,1
pH 5	0,85	23
Blindwert, pH 5	0,01	0,2
Vergleich ( $\beta,\beta$ -Carotin, pH 3,5, 450 nm)	3,76	100

#### 3.4.6 Abbau von $\beta,\beta$ -Carotin unter Zusatz von Glucose und Glucoseoxidase

Der  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau mit konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodoni* wurde in 50 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,5 unter Zusatz von 50 mM Glucose und 0 bis 150 mU Glucoseoxidase durchgeführt (2.3.5.1). Durch die Zugabe von Glucose und Glucoseoxidase wurde die Enzymaktivität mehr als verdoppelt (Abb. 3.29). Die höchste Enzymaktivität wurde bei Zugabe von 100 mU Glucoseoxidase ermittelt, die um den Faktor 4,5 höher war als beim Vergleich ohne Zugabe von Glucoseoxidase.

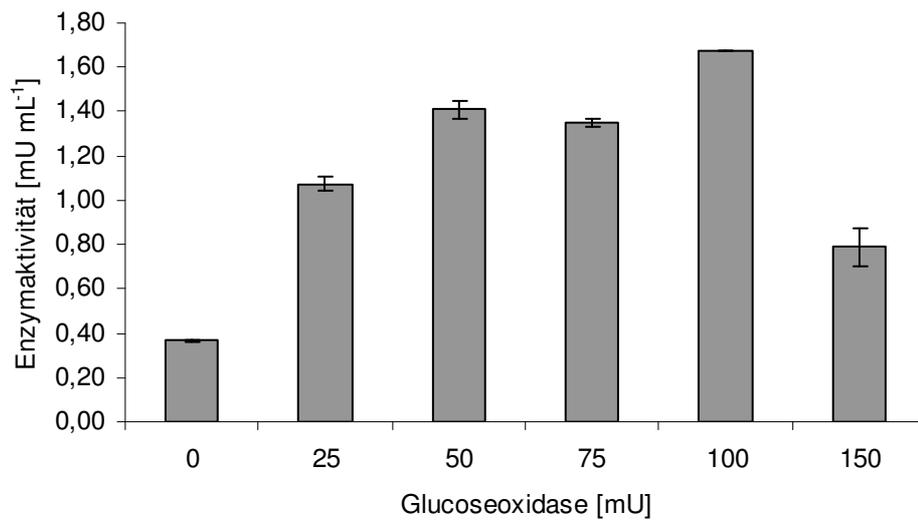


Abb. 3.29: Enzymaktivität von konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodoni* in Gegenwart von 50 mM Glucose und Glucoseoxidase

Die Glucosekonzentration wurde bei gleichbleibendem Zusatz von Glucoseoxidase (100 mU) variiert (5 bis 50 mM, 2.3.5.1). Bereits ein Glucosegehalt von 5 mM führte zu einer deutlichen Erhöhung der Enzymaktivität um den Faktor 6,9 (Abb. 3.30).

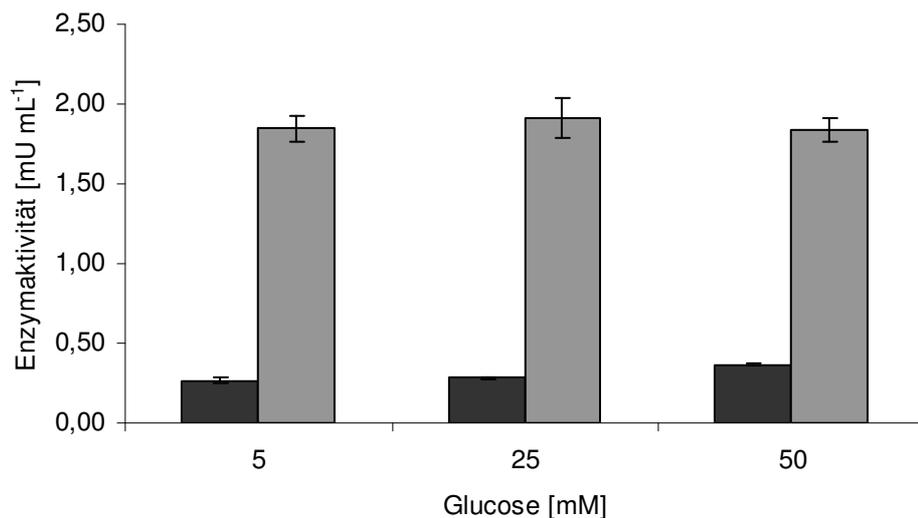


Abb. 3.30: Enzymaktivität von konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodoni* in Gegenwart von Glucose und Glucoseoxidase (■ ohne Glucoseoxidase, ■ mit 100 mU Glucoseoxidase)

### 3.4.7 Reinigung von MsP1 und MsP2

Das von Scheibner (2006) für die Isolierung von MsP1 und MsP2 etablierte Reinigungsschema wurde modifiziert. Als zweite Reinigungsstufe wurde anstelle der analytischen Superdex 200-Säule eine selbstgegossene präparative Gelfiltrationssäule mit Superdex 200 prep grade-Material verwendet (2.5.2.3). Das Elutionsprofil der präparativen Säule entsprach dem der analytischen Säule (Abb. 3.31).

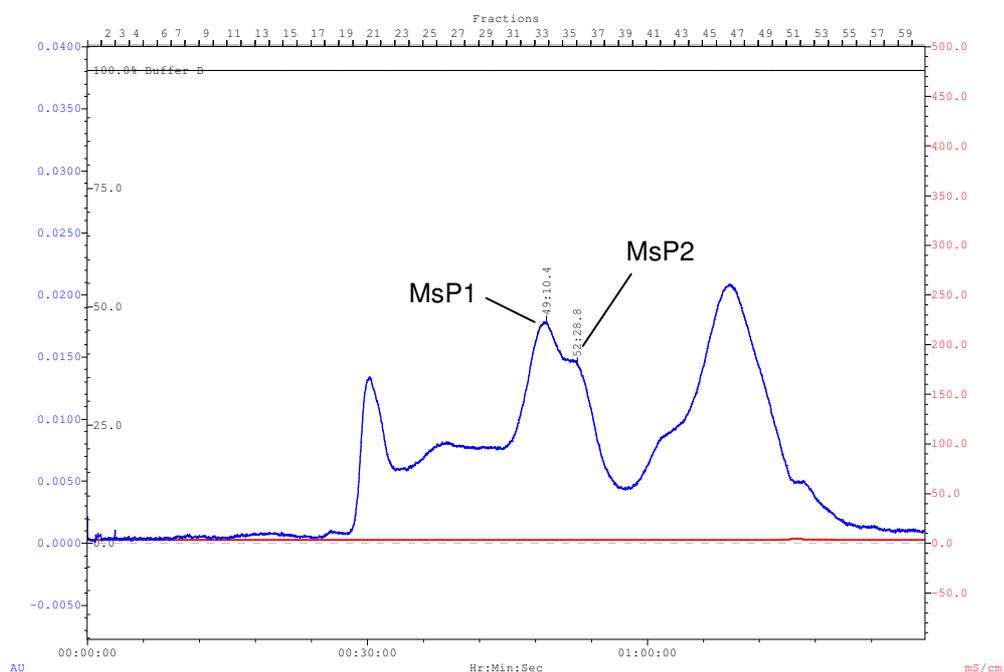


Abb. 3.31: Reinigung von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* mittels präparativer GFC  
(— UV-Absorption ( $\lambda = 280$  nm), — Leitfähigkeit)

Die Fraktionen 31-38 der GFC wurden vereinigt und konzentriert. Die Wiederfindung in diesen Fraktionen betrug 88%.

Insgesamt wurden 5,5 L Kulturüberstand mit einer Enzymaktivität von 1400 mU aufgearbeitet. Die Ausbeute nach der Zweistufenaufreinigung betrug über 70% bei einer spezifischen Aktivität von  $148,7 \text{ mU mg}^{-1}$  (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Bilanzierung der Reinigung von MsP1 und MsP2 aus Kulturüberstand von *M. scorodonius*

	Enzymaktivität		Protein		Ausbeute	spez. Aktivität
	[mU mL <sup>-1</sup> ]	[mU]	[mg mL <sup>-1</sup> ]	[mg]	[%]	[mU mg <sup>-1</sup> ]
Kultur- überstand	0,25	1400	-	-	100	-
IEX (konz.)	42,8	1188	1,3	36,1	85	32,9
GFC (konz.)	56,8	1021	0,38	6,88	73	148,7

### 3.5 Molekulare Identifizierung des *M. scorodonius*-Stammes CBS 137.83

Zur Identifizierung des *M. scorodonius*-Stammes CBS 137.83 wurde aus genomischer DNA (2.11) ein Fragment mit 823 bp amplifiziert, das die 25S Untereinheit der ribosomalen RNA codiert (Abb. 3.32).

```

ACTGCGAGTGAAGAGGGAAAAGCTCAAATTTAAAATCTGGCAGTCTCCGATTGTCGAGTTGTAAT
TTAGAGAAGTGTACCCGCGTTGGACCGTGTACAAGTTTCCTGGAATGGAACGTCATAGAGGGTGA
GAATCCCGTCTTTGACACGGACTACCAAGGCTTTGTGGTGCCTCTCGAAGAGTCGTGTTGTTTGG
GAATGCAGCACTAAATGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGGGAGAGACCGATAGCGA
ACAAGTACCGTGAGGGAAAAGATGAAAAGAACTTTGGAAAGAGAGTTAAACAGTACGTGAAATTGCT
GAAAGGGAAAACGCTTGAAGTCAGTCGCGTTGGCCGGGGATCAGCCTTCCTTTTGGTTGGTGTACTT
CCTGGTCGATGGGTCAGCATCAGTTTTGACCGGTGGATAAGAGCTTGAGGAATGTGGCATCTTCGG
GTGTGTTATAGCCTCTTGTGTATACATCGGTTGGGACTGAGGAACTCAGCACGCCGCAAGGCCGG
GTTTTTAACCACGTTCGTGCTTAGGATGCTGGCATAATGGCTTTAATCGACCCGCTTTGAAACACG
GACCAAGGAGTCTAACATGCCTGCGAGTGTGTTGGGTGAAAAACCCGAGCGCGTAATGAAAGTGAAA
GTTAGGATCTCTGTCGTGGAGAGCACTGACGCCCCGTCCAGACCTTCTGTGACGGTACCGCGGTTG
AGCATGTATGTTGGGACCCGAAAAGATGGTGAATATGCCTGAATAGGGTGAAGCCAGAGGAAACTC
TGGTGGAGGCTCGTAGCGATTCTGACGTGCA

```

823 bp

Abb. 3.32: Fragment der 25S Untereinheit der ribosomalen RNA  
aus *M. scorodonius* CBS 137.83  
(\_\_\_ Primerbindestellen)

Ein Datenbankvergleich (EMBL-EBI, WU-Blast2) ergab eine Homologie von 100% zu den *M. scorodonius*-Stämmen JEJ.586 (EM\_FUN:AF261331) und DAOM175382 (EM\_FUN:AF261332).

### **3.6 Molekularbiologische Charakterisierung von MsP2 und MsP1 aus *M. scorodonius***

Durch vorangegangene Arbeiten (Scheibner, 2006) waren die Edman-Sequenzen und einige Peptidsequenzen von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodonius* bekannt. Einige dieser Sequenzen wiesen Homologien zu zwei Peroxidasen (DyP aus *Thanatephorus cucumeris* (ursprünglich bezeichnet als *Geotrichum candidum*) und Peroxidase aus *Polyporaceae* sp.) und einer peroxidabhängigen Phenoloxidase (TAP aus *Termitomyces albuminosus*) auf (Abb. 3.33).

Ausgehend von den Homologievergleichen waren Primer abgeleitet und eine Vielzahl von PCRs mit unterschiedlichen Primerkombinationen durchgeführt worden. Die Sequenz von MsP1 war aus cDNA durch Zusammensetzen der Sequenzen überlappender Fragmente identifiziert worden (Scheibner, 2006).

a)

MRLSLFVVSVAVLVGSSSHVNAAKLGARQTRTTPLLTNFPGQAPLPTLTQHTTESGANDT  
 ILP **LNNIQGDILVGMKKQKE**RFVFFQVNDATSFKTALKTYVPERITSAAILISDPSQQPL  
 AFVNLGFSNTGLQALGITDDDLGDAQFPDGFADAANLGDDLSQWVAPFTGTTIHGVFLIG  
 SDQDDFLDQFTDDISSTFGSSITQVQALSG **DGSFLAFR**SARPGDQAGHEHFGFLDGISQP  
 SVTGWETTVPFGQAVVPPGIILTGRDGDGTGRPSWALHFQQKVPEFNAYTLANAIPANSA  
 GNLTQQEGAEFLGARMFGRWK **SGAP IDLAP TADD PALGADPQR**NNNFYSDTLTDETRCP  
 FGAHVRKTNPQDLGGPVDTFHAMRS **SIPYGPETSDAE**LASGVTAQDRGLLFVEYQSIIG  
 NGFRFQQINWANNANFPFSKPIITPGIEPIIGQTPRTVGGDPLNQNETFTVPLFVIPKG  
**GEYFFLPSISAL**TATIAA 498 aa

b)

MsP1:

Edman-Abbau: **ASF?AGL?LTDIQGDIL?TMKKNKELFF**

ESI-MS/MS:

Peptid 1: **GGEYFFSPS (L/I) SALR**Peptid 2: **Q (L/I) PYGPEVTDAEK**

Peptid 3: NSGTDAPNTPR

MsP2:

Edman-Abbau: **AP?L?LTDIQGDILIGMKKNKE?FF**

ESI-MS/MS:

Peptid 1: **DGSFLAFR**Peptid 2: **PQNTNNHLLR**Peptid 3: **LVLNTDFVSSR**Peptid 4: **FLADNAALTQGNADLL**Peptid 5: **SGAPVDLAPTADDVDLANDPQR**

Abb. 3.33: a) Aminosäuresequenz von DyP aus *T. cucumeris* (UNIPROT:Q8WZK8\_GEOCN); Sequenzhomologien: grün: zu Edman-Sequenzen von MsP1 und MsP2, blau: zu ESI-MS/MS-Sequenzen von MsP1, rot: zu ESI-MS/MS-Sequenzen von MsP2; kursiv: Unterschiede in den Sequenzen b) Peptidsequenzen von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni*; fett: sichere Identifizierung (ESI-MS/MS: „L“ = „L“ oder „I“) (Scheibner, 2006, modifiziert)

### 3.6.1 Identifizierung des 5'-Endes der MsP2-cDNA

Ausgehend von der Peptidsequenz 5 von MsP2 (Abb. 3.1) wurden Primer abgeleitet, indem die entsprechenden homologen Sequenzstücke aus *T. cucumeris*, *T. albuminosus* und *Polyporaceae sp.* übereinander gelegt wurden. Mit diesen Primern wurden PCRs gegen vorhandene Primer, die an das vordere Adapterstück der cDNA bzw. an die Peptidsequenz 1 aus MsP2 banden, durchgeführt (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Primer für die Identifizierung des 5'-Endes der MsP2-cDNA aus *M. scorodoni*

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Schmelz- temperatur [°C]
8991M / F19/5 rev1	5'>TTG GC(AG) AGA TC(AGT) ACA TCG TC<3'	59,8
8992M / F19/5 rev 2	5'>G(ACG)G C(GT)A GAT C(AG)A C(CT)G G<3'	52,4
0065M / F19 midfw1	5'>TGG (GT)TC (AT)TT CCT (CT)GC (ACT)TT C<3'	56,5
8444e / CT smart 3 for2	5'>GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT<3'	64,0

Zunächst wurden Gradienten-PCRs mit 0,1 µL cDNA von *M. scorodoni* als Template bei einer Hybridisierungstemperatur von 55 °C ± 10 °C durchgeführt (2.12.1, Tab. 3.10).

Tab. 3.10: Primerkombinationen zur Identifizierung des 5'-Endes der MsP2-cDNA aus *M. scorodoni*

5'-Primer	3'-Primer	Erwartete Fragmentgröße [bp]
0065	8991	~200
8444	8992	~1000
0065	8992	~200
8444	8991	~1000

Für die Primerkombination 8444/8991 ließ sich ein etwa 1000 bp großes Fragment spezifisch anreichern. Diese Primerkombination wurde für eine präparative PCR (2.12.2) verwendet. Die Hybridisierungstemperatur betrug 55,8 °C. Das PCR-Fragment wurde in den pCR 2.1-Vektor ligiert (2.17.2) und in *E. coli* TOP10F' zwischenkloniert (2.17.3). Aus drei sowohl beim Blau/Weiß-Screening (2.17.4) als auch bei der Kolonie-PCR (2.12.3) positiven Klonen wurden die Plasmide isoliert. Die entsprechenden Fragmente wurden sequenziert.

Die DNA-Sequenz des Fragmentes (Abb. 3.34 a) wies Homologien zu den Peroxidasen aus *T. cucumeris* und *Polyporaceae sp.*, der peroxidabhängigen Phenoloxidase aus *T. albuminosus* und zu MsP1 auf. Die übersetzte Aminosäuresequenz enthielt das Peptid 4 aus der ESI-MS/MS-Sequenzierung von MsP2 (Abb. 3.34 b), das bisher keine Homologien zu bekannten Aminosäuresequenzen gezeigt hatte. Auch die Edman-Sequenz, die Peptidsequenz 1 und Teile der Peptidsequenz 5 von MsP2 wurden gefunden.

## a)

```
GGGAGTGCCCCACTACTTTTCCTTCCTTCTTTCTTTCTTGCTTCAGTATGCGGCTCACT
TACCTTCCCTTGTTTGCAGGATCGCCATCCAGTCTGCATGTGCCTTTCCAACTTCTCC
AAGTCTTCCATATTAAGCCTCGTAGGACGAACTCCCTACTAATCAATCCCGATGCTCAG
CCAGACCTCCCAGCCGAAAGCAGGCTTCCACTGCGGCTGCTTCTGTGGGTTTGAACCTT
ACCGACATCCAAGGAGACATCTTAATCGGTATGAAGAAGAACAAGGAAATGTTCTTCTTC
TTCAGTATTGCAGATGCCGCTGCATTCAAATCCCCTTGGGCTCCGCTATTCTCCCTCTT
ATCACCTCGACGCAACAGCTGCTTGCTGTTGCCAGCCAGCCTACCACCGCTGTCAACCTT
GCCTTCTCCCAAACCGGATTGAATGCGCTGGGGCTTGCTGCTCAAGGCTTGGGGGACTCC
CTCTTTGCCAGTGGTCAGTTCAGCGGTGCACAGAGTCTCGGCGACCCGGGAACCTCGAAC
TGGGTCCAAGCGTTCGCTGGTACAGGCATACATGGTGTCTTCCTTCTCGCATCGGATACC
GTCGACAACGTGAATGCCGAGCTGTCGCAAATCCAGTCCATCTTGGGAACCTCCATCACT
GAGGCGTACCGCCTTCAAGGTGAGGCTCGTCCCGGCGATCAGCAAGGCCACGAACATTC
GGATTCATGGACGGAATCAGCAACCCTGCCATCGACGGATTCTCCACTGCGCTGCCTGGT
CAAGCCGTTCTCAGTCCCGGACTTTTCTGCTAGGAGAGGACGGCGATGGTTCCTCGTCT
TCGCGTCCGCTTGGGCAAAGGACGGCTCTTTCCTTGCTTTCGCCAGCTTCAACAGCGT
GTCCCAGAGTTCAACAAGTTCTCGCTGACAACGCTGCGCTAACACAGGGTAACGCTGAT
CTTCTCGGTGCCCGAATGATGGGACGGTGAAATCTGGTGCTCCGGTCGACCTTGCCCCC
ACCGCGGACGATGTTGATCTCGCC
```

1044 bp

## b)

```
GSAPTTFLPSFFPCYSMRLTYLPLFAGIAIQSACAFPNF'SKSSILKPRRTNSLLINPDAQ
PDLPTAKQASTAAASVGLNLDIQGDILIGMKKNKEMFFF'SIADAAAFKSHLGSAILPL
ITSTQQLLAVASQPTTAVNLAFSQTGLNALGLAAQGLGDSL'FASGQFSGAQSLGDPGTSN
WVQAFAGTGIHGVEFLASDTVDNVNAELS'QIQSILGTSITEAYRLOGEARPGDQOGHEHF
GFMDGISNPAIDGFSTALPGQAVLSPGLFLLGEDGDGSSSSRPSWAKDGSFLAFRQLQQR
VPEFNKFLADNAALTQGNADLLGARMGRWKSGAPVDLAPTADDVDLA
```

348 aa

Abb. 3.34: 5'-Ende der MsP2-cDNA

a) DNA-Sequenz; b) übersetzte Proteinsequenz

(blau: Edmansequenz, Peptid 1 und 5 aus MsP2, rot: Peptid 4 aus MsP2)

### 3.6.2 Ableitung neuer Primer ausgehend vom 5'-Ende der MsP2-cDNA

Ausgehend vom 5'-Ende der MsP2-cDNA wurden Primer für die Amplifizierung des 3'-Endes abgeleitet. Die Primer banden innerhalb der DNA-Sequenz, die das Peptid 4 aus MsP2 kodierte, da dort nur eine geringe Homologie zu MsP1 bestand. Als zweiter Primer wurde ein Primer gegen das hintere Adapterstück der cDNA verwendet (Tab. 3.11).

Tab. 3.11: Primer für die Identifizierung des 3'-Endes der MsP2-cDNA aus *M. scorodoni*

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Schmelz- temperatur [°C]
9709e / F19 cOA fw1	5'>GCT GAC AAC GCT GCG CTA AC<3'	64,0
9710e / F19 cOA fw2	5'>TTC CTC GCT GAC AAC GCT GC<3'	64,0
1473 / CT CDS3 rev3	5'>AGG CCG AGG CCG CCG ACA<3'	64,0

Mit den Primerkombinationen 9709/1473 und 9710/1473 ließ sich jeweils ein ca. 1000 bp großes Fragment spezifisch anreichern. Für die Primerkombination 9709/1473 wurde das Fragment bei einer Hybridisierungstemperatur von 58,1 °C amplifiziert und in *E. coli* transformiert. Die DNA-Sequenz wies Homologien zu den Enzymen aus *T. cucumeris*, *T. albuminosus* und *Polyporaceae sp.* auf. In der übersetzten Aminosäuresequenz wurden die Peptide 2 und 3 aus der Sequenzierung von MsP2 gefunden.

### 3.6.3 Identifizierung der cDNA-Sequenz von MsP2

Zusammengesetzt ergaben die beiden Teilstücke (3.6.1 und 3.6.2) die cDNA-Sequenz von MsP2 aus *M. scorodoni* (Abb. 3.35). Vor dem Startcodon befand sich ein nicht-kodierender Bereich bestehend aus 48 Nukleotiden (Abb. 3.36). Für den 3'-nicht-kodierenden Bereich wurden drei verschiedene Nukleotidsequenzen mit einer Länge von 279, 298 und 345 Nukleotiden bis zum Poly-A-Schwanz ermittelt (Abb. 3.36). Die cDNA-Sequenz von MsP2 ist je

nach 3'-nicht-kodierendem Bereich 1857, 1876 oder 1923 bp lang mit einem offenen Leseraster von 1530 bp Länge. Aus der DNA-Sequenz wurde die Aminosäuresequenz für das native Protein abgeleitet (Abb. 3.35). Das native Protein besteht aus 510 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 54 kDa. Durch Edman-Abbau (Scheibner, 2006) war der N-Terminus des reifen Proteins gekannt. Es besteht aus 453 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 48 kDa.

```

1  MRLTYLPLFAGIAIQSACAFNFSKSSILKPRRTNSLLINPDAQPDLP
1  accatccttgagactgtgtcattattataccaaatccaacggcgcgcca
   tgtcatcttcgtctaccgctcatcaccttacggcactttacacacatcc
   ggctctcgtgccccgtatctaccgctcaagttggccaactcttgaccgc

50  AKQASTAAASVGLNLTDIQGDILIGMKNKEMFFFFSIADAAAFKSHLG
148  gacgtaggggtgtacagacggatagaaaaagattttaagggggtatctg
   caacccccctgtatcatagatttgtaaaaatttttgtcaccctacatg
   aggtctgtttgtgctccaaccactgggcgagccccttatctacaccgc

99  SAILPLITSTQQLLAVASQPTTAVNLAFSQTGLNALGLAAQGLGDSLFA
295  tgacccaataccccgggaccaaggacgttcagttagcgcggcgtggtctg
   cttcttccaattctcgaccctatctcagctactgtccagtgacttc
   cttcttccggaggtttccgtcctcctcccacagtgggtttacggccctc

148  SGQFSGAQSLGDPGTSNWWQAFAGTGIHGVFLLASDTVDNVNAELSQIQ
442  agctaggcacggcgatagcgtggagacgggtccgtgaggagaggctcac
   ggatggcagtgacgccagctactcgcgtagttttccactaatacatcata
   ttgcctagtcccagcgcgagcttacattcctcagctccccgtcgggac

197  SILGTSITEAYRLQGEARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAIDGFSTALPGQ
589  tatgataaggtcccgggcccggcgcgtgtaggaaacgaggttagccgc
   cttgcctcacagttagcgcgaaagaaatgttagtgacctagtcctcga
   ccgaccctggcctgtgttccctgaccatcacgcaccctcccacctggtta

246  AVLSPGLFLLGEDGDGSSSRPSWAKDGSFLAFRQLQQRVPEFNKFLAD
736  ggcacgctccggggggttttcttgagggttcgtcccccgcgtaacg
   cttgcgttttgaagagccccgcgcaagcttctgataagtcataattca
   ctctcatcgaagccttcgtgtgtgagcctcttcogtagtcagccgcctc

295  NAALTQGNADLLGARMGRWKSAPVDLAPTADDVDLANDPQRNNNFNF
883  aggcacgagccggcaagctatggcggcgcagggggcgagccaaaat
   acctcagacattgcgttgggacgcctatcccaatatacaagaaat
   ctgaagtctttctcaggaggatttgctcctcccgtttcctccagccccct

344  THAGFTETDETHCPFSAHIRKTNPRSDFNQNTNNHIIRAGIPYGPEV
1030  acggtagaaggactcttgcaaaaacctgtacaaaacaacggactg
   cacgtcaccaacagctccatgacacgcatacaaaaattgogtcagcat
   cctccgctcatccccctcctggtagccccgccccctttttcatac

393  TDAEASSNTSSTDASLERGLAFVAYQSNIGNGFAFIQQNWVDNANFFFG
1177  aggggttaataaggacgcgtgtggtctaagagtgtagcatggagattg
   cacaccaccgcagctaggtcttcaacatgagctctaaagtaacattg
   tctacaccgcccgtccgtcgtctacagctccctactagtgtagccacca

```

```

442 KTTTPGIDPIIGSNAAQNNFAPNSPRPVSGLDPTDSTTIVTLNTDFVVS
1324 aaaccgagcaagtaggcaatgcatcccgtgcgcagtaagataagtggt
      accccgtacttgcaccaaataccaccgctcgtaccacccttctacatttc
      accgtttccccggttagccctcctattgcatccatgcgccccacccttt

491 RGGEYFFSPSLSAIQNTLSV
1471 cgggttttctctgacaactg
      gggaattccctcctaactct
      taagccccgctgcgcttt

```

Abb. 3.35: Protein- und DNA-Sequenz von MsP2 vom Start- bis zum Stopcodon  
(grün: N-Terminus des reifen Proteins, rot: potentielle N-Glykosidierungsstellen,  
blau: potentielle O-Glykosidierungsstellen)

a)

GGGAGTGCCCCACTACTTTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTGCTTCAGT 48 bp

b)

```

1 TGAAGAAGAAGCCCCAGTTGAATCCTATCGGACCCACCAATGTATATGTTCCATGTACAC
2 TGAAGAAGAAGCCTCAGTCGAATCCTATCAAACCCAACAATGTAAATGTTCCGTGTACAC
3 TGAAGAAGAAGCCTCAGTCGAATCCTATCAAACCCAACAATGTAAATGTTCCGTGTACAC
  ***** **

1 --CCATGGGCCCGTCAGCTCCGAGAAAACAGATATTGATATTTAA-AGGTTTCGCATAG
2 ACCCATGGACCCCGTCAGCTCCGAGAAAACAGATATTGATATTTAAGAGGTTTCGCATAA
3 ACCCATGGACCCCGTCAGCTCCGAGAAAACAGATATTGATATTTAAGAGGTTTCGCATAA
  *****

1 GTACCTATACGGCTAATGGGGAAGTGGGGCTTTTACGGACTCAAGGACTACTTGGG
2 -----TATACGGCTAATGGGGAAGTGGGGCTTTTGTGGACTCAAGGACTACTTGGT
3 -----TATACGGCTAATGGGGAAGTGGGGCTTTTGTGGACTCAAGGACTACTTGGT
  *****

1 TACTCACTAGAAACACATACTATCGTTTACAAAACTATGGACTTCGAAGGGATA--GGG
2 TACTCACTAGAAATACATACTATCGTTTACACAAACTATGGACTTCGAAGGGATATAGGA
3 TACTCACTAGAAATACATACTATCGTTTACACAAACTATGGACTTCGAAGGGATATAGGA
  ***** **

1 TTATCTACTACTGGTATATAATTGTGTATAGGTCTGCTGAAACAAATTATTTTACTACT
2 TTATTTACTACTGGTATATAATTGTGTAGAGGTCTGCTGAATCG-Poly-A 279 bp
3 TTATTTACTACTGGTATATAATTGTGTAGAGGTCTGCTGAAACAAATTATTTTACACA
  **** *****

1 GTC-Poly-A 298 bp
2
3 GTCTAGCTTTCAAATTTCCTTTCAGTCAGAATCATGAATACTGTAGTCT-Poly-A 345 bp

```

Abb. 3.36: a) 5'-nicht-kodierender Bereich der cDNA von MsP2;  
b) 3'-nicht-kodierende Bereiche der cDNA von MsP2

Die Aminosäuresequenz von MsP2 wurde mittels der Programme NetNGly 1.0 (Gupta *et al.*, 2004) und NetOGly 3.1 (Julenius *et al.*, 2005) auf das Vorhandensein von Glykosidierungsstellen untersucht. MsP2 besitzt vier

potentielle N-Glykosidierungsstellen und drei potentielle O-Glykosidierungsstellen (Abb. 3.35).

Eine Datenbanksuche mittels NCBI-blastp ergab auf Proteinebene eine Homologie von 50% zwischen MsP2 und der peroxidabhängigen Phenoloxidase TAP aus *T. albuminosus*. Eine Homologie von jeweils 49% bestand zu der Peroxidase DyP aus *T. cucumeris* und einer Peroxidase aus *Polyporaceae sp.*. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von MsP1 und MsP2 (EMBOSS-Align) ergab eine Homologie von 63%.

### 3.6.4 Amplifizierung der Gesamtsequenz von MsP2

Ausgehend von der cDNA-Sequenz von MsP2 (3.6.3) wurden Primer für die Amplifizierung der Gesamtsequenz von MsP2 abgeleitet (Tab. 3.12). Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass das amplifizierte Fragment sowohl das Start- als auch das Stopcodon von MsP2 enthielt.

Tab. 3.12: Primer zur Amplifizierung der Gesamtsequenz von MsP2

Primer (Nummer/Name)	Sequenz	Schmelz- temperatur [°C]
1361E / F19-Start fw1	5'>AGT ATG CGG CTC ACT TAC CTT CC<3'	70,0
1362E / F19-Ende rev1	5'>TCA AAC AGA AAG CGT GTT CTG GAT CG<3'	76,0

Als Template wurden sowohl cDNA als auch genomische DNA von *M. scorodoni* eingesetzt. Bei der Verwendung von cDNA wurde bei einer Hybridisierungstemperatur von 68,1 °C ein etwa 1500 bp großes Fragment amplifiziert und in *E. coli* transformiert. Die übersetzten Aminosäuresequenzen aus zwei DNA-Sequenzen unterschieden sich in 8 (Ile 428 → Leu, Asn 431 → Ala, Ile 448 → Val, Asn 455 → Val, Ser 465 → Gly, Thr 479 → Lys, Leu 483 → Ile, Val 489 → Ser) bzw. 9 (zusätzlich Thr 106 → Ala) Aminosäuren von der zusammengesetzten Sequenz von MsP2. Mit genomischer DNA als Template

wurde ein 2135 bp großes Fragment bei einer Hybridisierungstemperatur von 60,8 °C amplifiziert und in *E. coli* transformiert. Das Fragment enthielt 10 Introns von 53, 57, 69, 55, 58, 59, 59, 83, 54 und 55 Nukleotiden Länge (Abb. 3.37).

cDNA	ATGCGGCTCACTTACCTTCCCTTGTTTGCGGGCATCGCCATCCAGTCTGC	50
gen. DNA	 ATGCGGCTCACTTACCTTCCCTTGTTTGCGGGCATCGCCATCCAGTCTGC	50
cDNA	ATGTGCCTTTCCAACTTCTCCAAGTCTTCCATATTAAGCCTCGTAGGA	100
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      ATCTGCCCTTCCAGACTTCTTCAAGTCTTCCGTATTGAAGCCTCGTAGGA	100
cDNA	CGAACTCCCTACTAATCA-----	118
gen. DNA	 CGAACTCCCTACTAATCAGTGAGCTTAGCCATATCCTACCCTGTCTCAA	150
cDNA	-----ATCCCGATGCTCAGCCAGACCTCCCGACC	147
gen. DNA	 ACTGACCAACAAATTGTGCAGATCCCGATGCTCAGCCAGACCTCCCGACC	200
cDNA	GCAAAGCAGGCTTCCACTGCGGCTGCTTCTGTGGGTTTGAACCTTACCGA	197
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      GCACAGCAGGCTTCCACTGCGGCTGCTTCTGTGGGTTTGAACCTTACCGA	250
cDNA	CATCCAAGGAGACATCTT-----	215
gen. DNA	 CATCCAAGGAGACATCTTGTATGTTTCATCGGTATTGTCTAGTCTGATGAT	300
cDNA	-----AATCGGTATGAAGAAGAACAAGGAA	240
gen. DNA	 CGCAACATTACGTATGATTTACAGAATCGGTATGAAGAAGAACAAGGAA	350
cDNA	ATGTTCTTCTTCTTTCAGTATTGCAGATGCCGCTGCATTCAAATCCCACTT	290
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      ATGTTCTTCTTCTTTCAGTATTGCAGATGCCGCTGCATTCAAATCCCACTT	400
cDNA	GGGCTCCGCTATTCTCCCTCTTATCACCTCGACGCAACAGCTGCTTGCTG	340
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      GGACTCCGCTATTCTCCCTCTTATCACCTCGACGCAACAGCTGCTTGCTG	450
cDNA	TTGCCAGCCAGCCTACCACCGCTGTCAACCTTGCCCTTCTCCCAAACCGGA	390
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      TTGCCAGCCAGCCTACCACCGCTGTCAACCTTGCCCTTCTCCCAAACCGGA	500
cDNA	TTGAATGCGCTGGGGCTTGCTGCTCAAGGCTTGGGGGACTCCCTCTTTGC	440
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      TTGAATGCGCTGGGGCTTGCTTCCCAGGGCTTGGGGGACTCCCTCTTTGC	550
cDNA	CAGTGGTCAGTTCAGCGGTGCACAGAGTCTCGGCGACCCGGGAACCTCGA	490
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      CAGTGGTCAGTTCAGCGGTGCACAGAGTCTCGGCGACCCGGGAACCTCGA	600
cDNA	ACTGGGTCCAAGCCTTCGCTGGTACAGGCATACATGGTGTCTTCTTCTC	540
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      ACTGGGTCCAAGCCTTCGCTGGTACAGGCATTCATGGTGTCTTCTTCTC	650
cDNA	GCATCGGATACCGTCGACAACGTGAATGCCGAGCTGTCGCAAATCCAGTC	590
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      GCATCGGATACAATCGACAACGTGAATGCCGAGCTGTCGCAAATCCAGTC	700
cDNA	CATCTTGGGAACCTCCATCACTGAGGCGTACCGCCTCAGGGTGAGGCTC	640
gen. DNA	.     .     .     .     .     .     .     .     .      CATCTTGGGAACCTCCATCACTGAGGCGTACCGCCTCAGGGTGAGGCTC	750
cDNA	GTCCC GGCGATCAGCAAGGCCACGAAC-----	667
gen. DNA	.     .     .     .      GTCCC GACGATCAGCAAGGCCACGAACGTAAGATCATTTTCGCTTTTTTTC	800

cDNA	-----ATTT	671
gen.DNA	CTTCAAGCTCAGTCTCTCTAACGGCGACTTTTCGTGATTGTGCAGATT	850
cDNA	CGGATTCATGGACGGAATCAGCAACCCTGCCATCGACGGATTCTCCACTG	721
gen.DNA	CGGATTCATGGACGGAATCAGCAACCCTGCCATCGACGGATTCTCCACTG	900
cDNA	CGCTGCCTGGTCAAGCCGTTCTCAGTCCCGGACTTTTCCTGCTAGGAGAG	771
gen.DNA	CGCTGCCTGGTCAAGCTGTCTCAGTCCCGGACTTTTCCTGCTAGCAGAG	950
cDNA	GACGGCGATGGTTCCTCGTCTTCGCGTCCGCTTTGGGCAAAGGACGGCTC	821
gen.DNA	GACGGCGATGGTTCCTCGTCTTCGCGTCCGCTTTGGGCAAAGGACGGCTC	1000
cDNA	TTTCCTTGCTTTCCGCCAGCTTCAACAGCGTGTCCAGAGTTCAACAAGT	871
	.	
gen.DNA	TCTCCTTGCTTTCCGCCAGCTTCAACAGCGTGTCCAGAGTTCAACAAGT	1050
cDNA	TCCTCGCTGACAACGCTGCGCTAACACAGGGTAACGCTGATCTTCTCGGT	921
gen.DNA	TCCTCGCTGACAACGCTGCGCTAACACAGGGTAACGCTGATCTTCTCGGT	1100
cDNA	GCCCCAATGATGGGACGGTGAAATCT-----	948
gen.DNA	GCCCCAATGATGGGACGGTGAAATCTGTAAGTACCTTACCCACTCCGAT	1150
cDNA	-----GGTGTCCGGTCGACCTT	966
gen.DNA	GGCTGTCTCTAACCAACTCCACTGCTTTCCAGGGTGTCCGGTCGACCTT	1200
cDNA	GCCCCACCGCGGACGATGTTGATCTCGCCAATGACCCCCAAAGGAACAA	1016
	.     .     .     .     .     .     .     .     .	
gen.DNA	GCCCCACTGCGGATGATGTTGATCTCGCTAATGACCCCCAAAGGAACAA	1250
cDNA	CAACTTCAACTTTACCCACGCCGTTTTACCGAGACCACTGACGAAACTC	1066
	.     .     .     .     .     .     .     .     .	
gen.DNA	CAACTTCAACTTTACCCACCCCGATTTACCGAGACCACTGACCCAGACTC	1300
cDNA	ACTGCCCTTCTCCGCTCACATCCGTAAGACGAACCCCTCGATCGGACTTC	1116
	.     .     .     .     .     .     .     .     .	
gen.DNA	ACTGCCCTTCTCTGCTCACATCCGTAAGACGAACCCCTCGATCGGACTTC	1350
cDNA	AACCCCCAGAACACCAACAACCACATCATCCGTGCTGGTATTCTTACGG	1166
	.     .     .     .     .     .     .     .     .	
gen.DNA	AACCCCTGAACACCGCAACCACATCATCCGTGCTGGTATTCTTACGG	1400
cDNA	ACCTGAAG-----	1172
gen.DNA	ACCTGAAGGTACGGCAATCGCTTCGCAATGGATGGAGAATCTATAACCT	1450
cDNA	-----TCACTGACGCTGAAGCCTCATCCAACACGTCCAG	1208
gen.DNA	AACTACTGCCCGCTAGTCACTGACGCTGAAGCCTCATCCAACACGTCTAG	1500
cDNA	CACGGACGCTAGCCTCGAGCGTGGCTTGGCTTTCG-----	1242
gen.DNA	CACGGACGCTAGCCTCGAGCGTGGCTTGGCTTTCGGTATGGAAACTTCTG	1550
cDNA	-----TTGCAT	1249
gen.DNA	TTTCCTTTAAGAAGTGCAGTACTGCTCTCTATCGCTCATCAGTTGCAT	1600
cDNA	ACCAATCGAACATTGGCAACGGCTTTGCATTTCATTCAACAGAATTGGGTT	1299
gen.DNA	ACCAATCGAACATTGGCAACGGCTTTGCATTTCATTCAACAGAATTGGGTT	1650
cDNA	GACAACGCAAACCTTCTTCTTCGGAAAAACCA-----	1330
gen.DNA	GACAACGCAAACCTTCTTCTTCGGAAAAACCAAGTCTTGCAAGTTTAT	1700







cDNA	CAGCGAAATAACAACCTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTG	1079
gen. DNA	CAGCGAAATAACAACCTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTG	1350
cDNA	CCCTTTCTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGATCTTGGGG	1129
gen. DNA	CCCTTTCTCTGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGTGATCTTGGGG	1400
cDNA	GTATTAATAAATTCCTAAACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCGTAT	1179
gen. DNA	GTATTAATAAATTCCTAAACCAACACATAATCCGAGCGGGAATTCGTAT	1450
cDNA	GGACCCGAAG-----	1187
gen. DNA	GGACCCGAAGGTGCCATTTATTCTGCATCGTCCCTGCAGCATAATTCTGA	1500
cDNA	-----TTACCGACGCTGAAAAAGCGTCAAATAGCTC	1220
gen. DNA	TTCTTCTTTTTGGTTCAGTTACCGACGCTGAAAAAGCGTCAAATAGCTC	1550
cDNA	TAGCACTGACCCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTG-----	1257
gen. DNA	TAGCACTGACCCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGGTGAGTAGAAAAG	1600
cDNA	-----TGGCCTATCAG	1269
gen. DNA	CCCTATTTAGAGCGACAGGCCCTAATTTGGAAGATTCTAGTGGCCTATCAG	1650
cDNA	TCTAATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAA	1319
gen. DNA	TCTAATATCCAGAACGGATTTCGTATTCCTTCAAAGAATTGGGTTGATAA	1700
cDNA	TACGAA-----	1325
gen. DNA	TACGAAGTGCCTTCTGCCGAATTCTGTCTGCAGCTTGAACTAATCACA	1750
cDNA	-----TTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCAT	1361
gen. DNA	TTGTAAAAACGCAGTTTCTTCCGACCCGGCACTGGTGTAGATCCTCTCAT	1800
cDNA	CG-----	1362
gen. DNA	CGGTAATGCAGCTGCATTTCGAAGAAAGCCCTCCTAGTCGTTGCTAATGAA	1850
cDNA	-----GTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCAGTACCCCAACA	1402
gen. DNA	TACGTTTTTAGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCAGTACCCCAACA	1900
cDNA	CGCCTCGTGTGCTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATC	1452
gen. DNA	CGCCTCGTGTGCTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATC	1950
cDNA	GAAATTGATATCG-----	1464
gen. DNA	GAAATTGGTATCGGTATGTGTATCCGCTTCTATGAACTTACATTCCCG	2000
cDNA	-----ATTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGCGAATACTTCTT	1499
gen. DNA	CTAACCTGTGCTCAGATTTTCGTAGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTCTT	2050
cDNA	CTCGCCCTCACTTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTTCAGTCTAG	1542
gen. DNA	CTCGCCCTCACTTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTTCAGTCTAG	2093

Abb. 3.38: Vergleich der Sequenzen von MsP1 aus genomischer DNA und cDNA

### 3.7 Charakterisierung von MsP1 (rekombinant) aus *Aspergillus niger*

MsP1 wurde bei DSM in Delft in *A. niger* überexprimiert. Der enzymhaltige Kulturüberstand wurde für Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

#### 3.7.1 SDS-PAGE

Mit Kulturüberstand von *A. niger* + MsP1 und als Vergleich mit Kulturüberstand eines *A. niger*-Stammes ohne Insert wurde eine SDS-Page (2.8.1) durchgeführt. Bei dem Kulturüberstand mit rekombinantem MsP1 wurde eine deutliche Bande bei 71 kDa gefunden (Abb. 3.39). Bei der Vergleichsprobe waren keine Banden detektierbar.

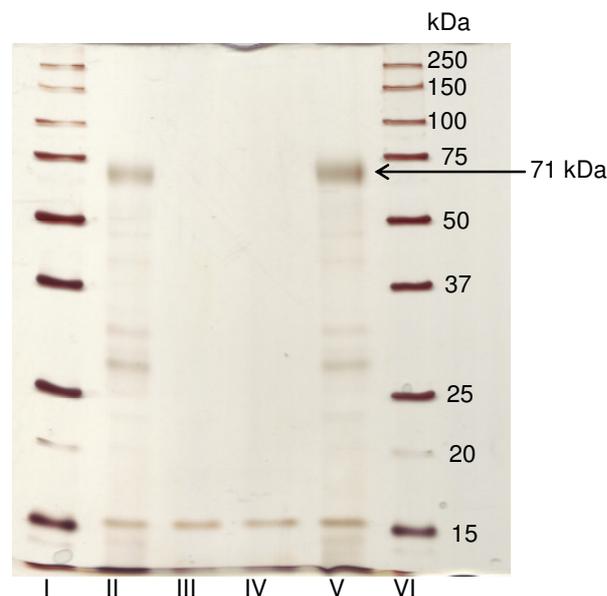


Abb. 3.39: SDS-Gel (12%ig) von MsP1 (rekombinant)  
(I + VI: Standard, 2 bzw. 1  $\mu$ L; II + V: *A. niger* + MsP1, 10 bzw. 15  $\mu$ L;  
III + IV: *A. niger* ohne Insert, 10 bzw. 15  $\mu$ L)

### 3.7.2 Abbau von $\beta,\beta$ -Carotin

Der Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin wurde photometrisch bei 450 nm und 27 °C in 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 6 verfolgt (2.3.6). Es wurde 1  $\mu$ L Kulturüberstand von *A. niger* + MsP1 für die Bestimmung eingesetzt. Ohne Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgte kein Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin. Nach Zugabe von 10  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (20 mM) wurde eine starke Abnahme der Extinktion beobachtet (Abb. 3.40). Die Enzymaktivität im MsP1-haltigen Kulturüberstand betrug ca. 400 mU mL<sup>-1</sup>. In der Vergleichsprobe war keine Enzymaktivität nachweisbar.

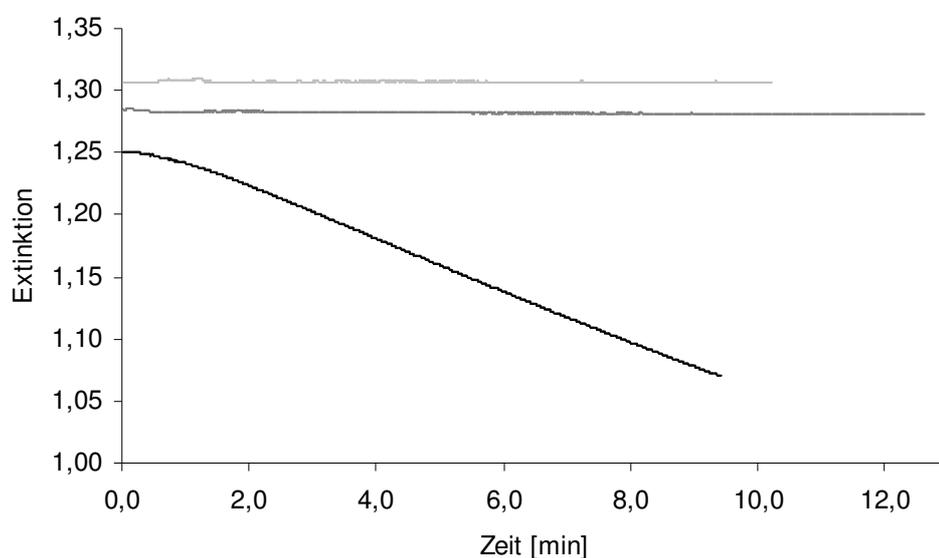


Abb. 3.40: Extinktionsabnahme bei 450 nm während des  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbaus (— *A. niger* + MsP1 nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe, - - - *A. niger* + MsP1 ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe, ··· Vergleich nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe)

Die Enzymaktivität wurde unter Zusatz unterschiedlicher Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bestimmt (2.3.6.1). Die höchste Aktivität war bei Zusatz von 200 nmoL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu beobachten (Abb. 3.41). Bei Zugabe von 2000 nmoL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> betrug die Aktivität noch 68% dieser Aktivität.

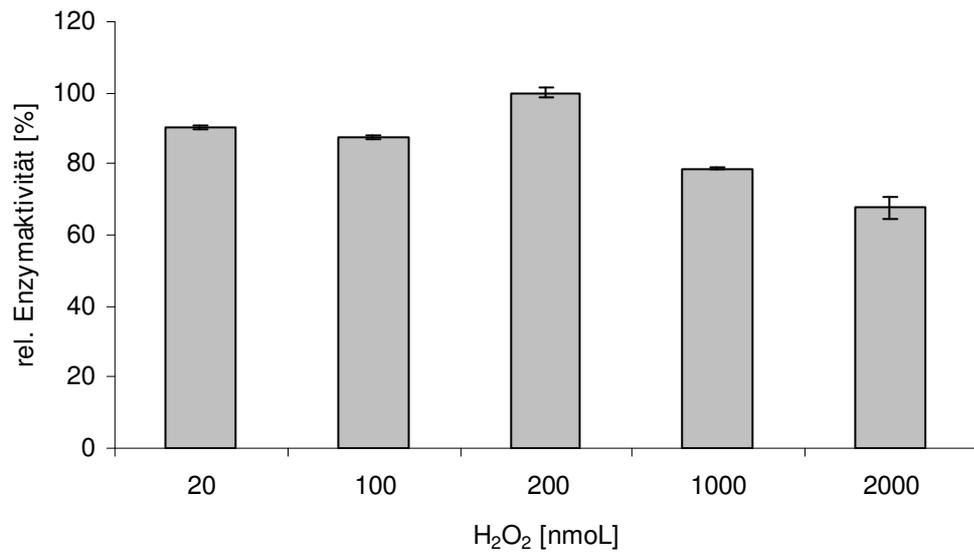


Abb. 3.41: Relative Enzymaktivität [%] von MsP1 (rekombinant) in Abhängigkeit von der zugegebenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge

Bei Zugabe von 10 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fand eine Extinktionsabnahme über 10 min statt (Abb. 3.42).

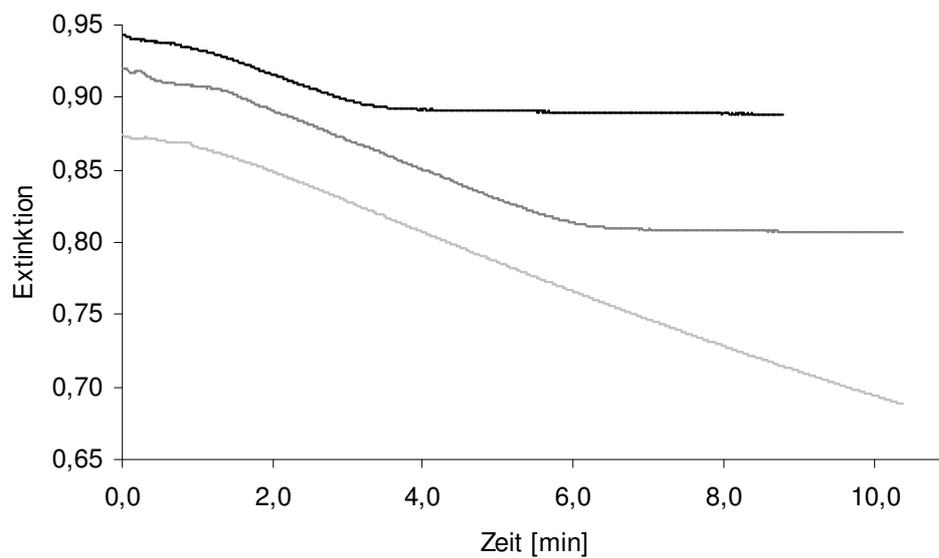


Abb. 3.42: Extinktionsabnahme bei 450 nm von *A. niger* + MsP1 bei Variation der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe (— + 2 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, — + 5 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, — + 10 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Bei Zugabe von 5 nmolL  $\text{H}_2\text{O}_2$  war nur noch eine Extinktionsabnahme über maximal 6 min und bei Zusatz von 2 nmolL  $\text{H}_2\text{O}_2$  über 3 min zu beobachten (Abb. 3.42).

### 3.7.3 UV/Vis Spektren

Die UV/Vis Spektren von Kulturüberstand mit rekombinantem MsP1 und von Kulturüberstand eines Stammes ohne Insert wurden von 350-700 nm aufgenommen. Für das rekombinante Enzym MsP1 wurde ein Absorptionsmaximum bei 406 nm ermittelt (Abb. 3.43).

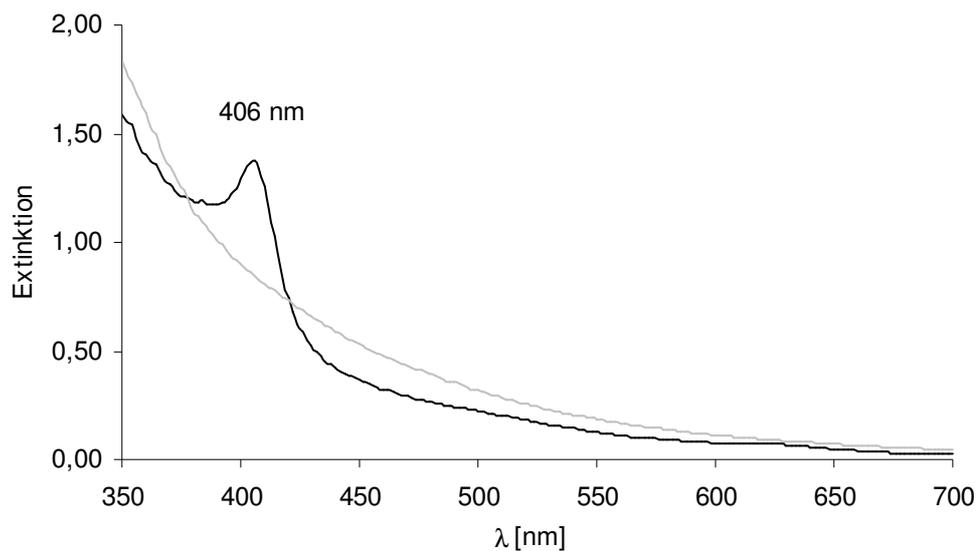


Abb. 3.43: UV/Vis-Spektrum von MsP1 (rekombinant)  
(— *A. niger* + MsP1, - - - *A. niger* ohne Insert)

### 3.7.4 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltrationschromatographie wurde mit Kulturüberstand von *A. niger* + MsP1 an einer präparativen Superdex 200-Säule durchgeführt (2.5.2.3). Die Bedingungen entsprachen denen bei der Reinigung von MsP1 und MsP2 aus *Marasmius scorodoni*. Enzymaktivität wurde in den Fraktionen 31-38 detektiert (Abb. 3.44). Die spezifische Aktivität (bezogen auf den  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau) in diesen Fraktionen betrug  $112 \text{ mU mg}^{-1}$ .

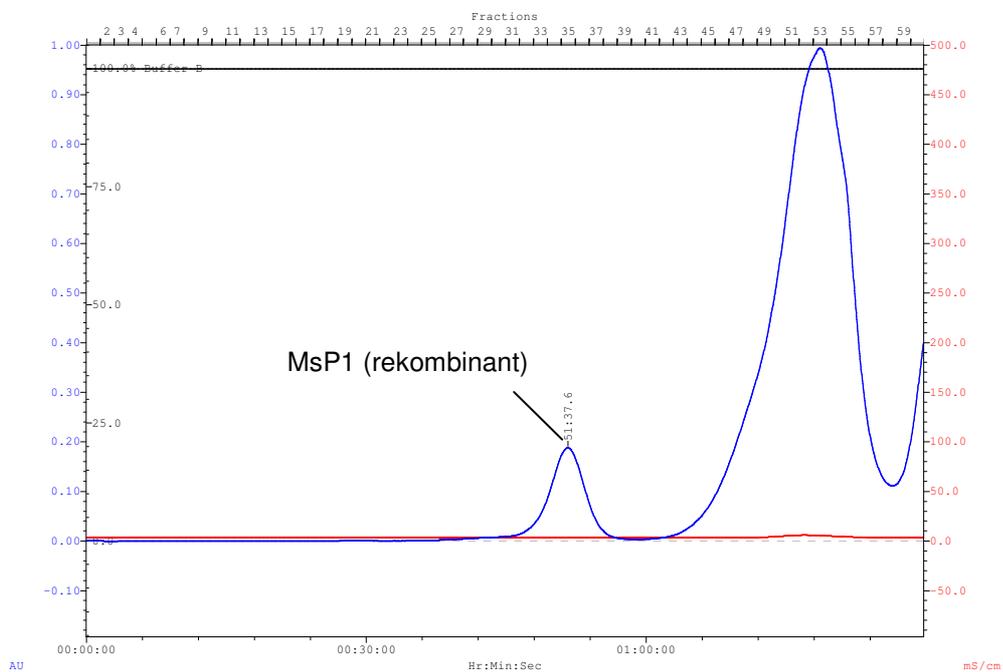


Abb. 3.44: Reinigung von MsP1 (rekombinant) aus *A. niger* mittels präparativer GFC (— UV-Absorption ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ), — Leitfähigkeit)



## 4 Diskussion

### 4.1 Screening auf $\beta,\beta$ -Carotin-abbauende Enzymaktivitäten

Die Basidiomyceten *Cyathus pallidus*, *Ischnoderma benzoinum*, *Trametes suaveolens* und *T. versicolor* waren in vorangegangenen Arbeiten (Langhoff, 2002) auf Grund ihrer Befähigung zur Terpen-Biosynthese in einem Screening auf ihre Fähigkeit zum  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau untersucht worden. Alle vier Organismen zeigten eine Entfärbung eines  $\beta,\beta$ -Carotin-Agars. Bei der Umsetzung von  $\beta,\beta$ -Carotin mit Kulturüberständen über einen Zeitraum von 14 Stunden wurden Abbauraten von 85% für *C. pallidus*, 95% für *I. benzoinum*, 60% für *T. suaveolens* und 98% für *T. versicolor* ermittelt (Langhoff, 2002). Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Bildung von  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen während des Wachstums in Submerskultur dieser vier Basidiomyceten untersucht. Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde ein von Ben Aziz *et al.* (1971) entwickelter und von Langhoff (2002) und Scheibner (2006) modifizierter Enzymtest verwendet. Da die  $\beta,\beta$ -Carotin-spaltenden Enzyme VPL3 aus *P. eryngii* (Langhoff, 2002) und MsP1 und MsP2 aus *Marasmius scorodoni* (Scheibner, 2006) in Citronensäure/Phosphat-Puffer die höchste Aktivität bei pH 3,5 bzw. pH 5 aufwiesen, wurde die Bestimmung der Enzymaktivität zunächst unter leicht sauren Bedingungen in 43 mM Citronensäure/113 mM Phosphat-Puffer, pH 5,5 durchgeführt. Die Ergebnisse über die Bildung von  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen während des Kulturverlaufes bildeten die Grundlage für die Entscheidung, welcher der Pilze im weiteren Verlauf der Arbeiten näher betrachtet wurde.

*C. pallidus* zeigte unter den gewählten Bedingungen über einen Zeitraum von 17 Tagen keinen Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin. Für *I. benzoinum* war nur bei einem pH von 3,5 und nicht bei einem pH von 5,5 Enzymaktivität nachweisbar. Beide Pilze kamen aus diesen Gründen nicht für weitere Untersuchungen in Betracht.

Zudem dauerte die Anzucht der Biomasse in der Vorkultur mit 14 Tagen für beide Pilze doppelt solange wie für die zwei *Trametes*-Spezies (3.1).

Bei *T. versicolor* traten am 3. und am 12./13. Kulturtag zwei lokale Maxima der Enzymaktivität auf (3.1).

*T. suaveolens* zeigte Aktivitätsmaxima am 1., 4. und 9. Kulturtag. Die Enzymaktivität am 1. Kulturtag war die höchste innerhalb des Screenings gemessene Aktivität (3.1). Ein erhöhter Sauerstoffeintrag während des Homogenisierens der Vorkultur kommt als Ursache für die erhöhte Enzymproduktion in Betracht. So wird die Manganperoxidase-Aktivität in *Phanerochaete chrysosporium* durch Zufuhr von 100%igem Sauerstoff während der Kultivierung deutlich erhöht und liegt um den Faktor 4 bis 13 über der Manganperoxidase-Aktivität in Kulturen, die unter Luftatmosphäre angezüchtet werden (Li *et al.*, 1995).

*T. versicolor* gehört zu einem der am besten untersuchten ligninabbauenden Basidiomyceten. Es sind mindestens 16 Ligninperoxidasen und mindestens 5 Manganperoxidasen aus *T. versicolor* bekannt (Johansson; Nyman, 1993). Viele dieser Peroxidasen wurden bereits auf molekularer Ebene charakterisiert (Johansson *et al.*, 1993, Johansson *et al.*, 2002, Jönsson; Nyman, 1992, Black; Reddy, 1991).

Im Gegensatz dazu sind aus *T. suaveolens* bisher keine Enzyme auf molekularer Ebene charakterisiert worden. Daher wurden die  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens* im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht.

## 4.2 $\beta,\beta$ -Carotin-abbauende Enzyme aus *Trametes suaveolens*

*Trametes suaveolens*, auf Grund des Geruches nach Anis auch Wohlriechende Tramete oder Anistramete genannt, gehört zu den Weißfäulepilzen und wächst ausschließlich auf Weiden und Pappeln (Jahn, 1963). Im Gegensatz zu vielen anderen Weißfäulepilzen besiedelt *T. suaveolens* nicht nur das Holz toter sondern auch lebender Bäume (Jahn, 1963, Trinkaus; Reinhofer, 2005). Bisher wurden nur die flüchtigen Bestandteile in frischen Fruchtkörpern und in Submerskultur sowie die Biotransformationswege von L-Phenylalanin zu Benzaldehyd untersucht (Rösecke *et al.*, 2000, Birkinshaw *et al.*, 1944, Lomascolo *et al.*, 2001).

Mit den  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen wurden erstmals Enzyme aus *T. suaveolens* gereinigt und charakterisiert. Die Sequenzierung nach der zweistufigen Reinigung ergab 5 Peptidsequenzen, die alle Homologien zu den „Manganese-repressed“ Peroxidasen NPR und MrP aus *T. versicolor* aufwiesen (3.3.8, Collins *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2005). Zusätzlich bestanden Homologien zu Lignin- und Manganperoxidasen und polyvalenten Peroxidasen aus verschiedenen Basidiomyceten. Allerdings waren diese Homologien auf einzelne Peptide beschränkt (Tab. 3.4). Daher können die  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens* am ehesten den „Manganese-repressed“ Peroxidasen zugeordnet werden. Für eine genaue Zuordnung müssen die Enzyme aus *T. suaveolens* jedoch auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Die durch die Sequenzierung erhaltenen Peptide (3.3.7) bieten dabei einen ersten Anhaltspunkt für die Ableitung von Primern zur Amplifizierung der cDNA-Sequenzen.

Sowohl für NPR (Collins *et al.*, 1999) als auch für MrP (Kim *et al.*, 2005) ist die Aminosäuresequenz aus der cDNA-Sequenz abgeleitet worden. Bislang ist keines der beiden Enzyme gereinigt und biochemisch charakterisiert worden. Die NPR codierende cDNA ist 1362 bp lang und beinhaltet ein offenes Leseraster von 1089 bp. Das native Protein besteht aus 362 Aminosäuren. Die Länge des reifen Proteins wird mit einer Länge von 336 Aminosäuren

vorausgesagt (Collins *et al.*, 1999). Die Homologie von NPR zu bekannten Lignin- und Manganperoxidasen aus *T. versicolor* liegt auf Aminosäureebene bei etwa 45 – 50% (Collins *et al.*, 1999). Die nächste Verwandtschaft besteht zu PGV, einer Peroxidase aus *T. versicolor* (Collins *et al.*, 1999). Diese Peroxidase zeigt keine auffälligen Abweichungen von den Substratbindestellen von Lignin- und Manganperoxidasen und enthält die Mn(II)-Bindestelle der Manganperoxidasen (Jönsson *et al.*, 1994). Auch NPR enthält die Aminosäurereste, die für die Bindung von Mn(II) verantwortlich sein sollen (Collins *et al.*, 1999, Abb. 4.1).

		■ ■ ▼ ▼	
Tv NPR	ATCSGGQ-TTANDACCVWFVDLDDIQSNLFHGGECGENAHESLRLIFHDAIAFSPALTA		59
Tv PGV	VACPDGVNTATNAACQFLFAVRDDIQKNLFDNGECGEDVHESLRLTFHDAIGFSRSAEAN		60
Pc MNP1	-VCPDGT-RVSHAACCAFIPLAQDLQETIFQN-ECGEDAHEVIRLTFHDAIAISRLQ---		54
Cs MNP1	VTCSDGT-VVPDSMCCDFIPLAQDLQSMVLQN-ECGEDAHEIIRLTFHDAIAISQSL---		55
Po MNP1I	ATCAGGQ-VTANAACCVLFFLMEIDLQKNLFDGACGEDAHEALRLTFHDAIGFSPSR---		56
Tv LPG1II	VACPDGVNTATNAACQFLFAVRDDLQENLHFHGGELCTAEAHESLRLTFHDAIASPALEQQ		60
Pc LPO811	ATCANGK-TVGDASCCAWFDVLDLQANMFHGGQCGAEAEHESIRLVFHDSIAISPAEAK		59
Pr LPG3	ATCPDGT-QLMNAECCALLAVRDDLQNNMFNN-ECGDEAHEALRLTFHDAIASPAEAT		58
	* * ** * * * ** ** * *		
	▼	● ▼	
Tv NPR	GQFGGGGADGSI MAHTDVEIQYAANGLDEIIEEQRPFALKH-NVSGDFIQFAGAVGVA		118
Tv PGV	GTFGGGGADGSI SIFASIE TNFHASLGIDEIVGEQAPFIARH-NLTVGDFIQFAGAVGVS		119
Pc MNP1	GPKAGGGADGSM L LFP TVEPNF SANNGIDDSVNNLIPFMQKHNTISAADLVQFAGAVALS		114
Cs MNP1	PPSAGTGADGSM L LFP LVEPEFQASNGIDDSVNNLIPFLSSHPNITAGDLVQFAGAVALT		115
Po MNP1I	GVMG--GADGSVITFSDETVNFPANLIGIDEIVEAEKPF LARH-NISAGDLVHFAGTLAVT		113
Tv LPG1II	GIFGGGGADGSI AIFSDIETAFHPNIGLDEIVELQKPF IARH-NLSVADFIQFAGAIGAS		119
Pc LPO811	GKFGGGGADGSI MIFDIT IETAFHPNIGLDEVVAMQKPFVQKH-GVTPGDFIAFAGVALS		118
Pr LPG3	GQFGGGGADGSI MIFSDIETK FHPNIGLDEVVESFRPFQQRS-GMGVADFIQFSGAVGTS		117
	***** * * * * *		
	▼▼	● ●	
Tv NPR	NCNGGPQIGFFAGRSNDSQPAPDKLVLPSDSVTDILARVADAG---FAPVELVWMLISH		175
Tv PGV	NCPGAPRLQFL LGRPNATQAPDKTIPEPFDTVDSILARFLDA--ADFSPAEVVALLASH		177
Pc MNP1	NCPGAPRLEFLAGRPNKTI AAVDGLIPEPQDSVTKILQRFEDAG--GFTPFVVSLLASH		172
Cs MNP1	NCPGAPR-ELLAGRKNAPAPIDGLIPVQDNVSTIILARFADAG--NFSPEVVSLLASH		172
Po MNP1I	NCPGAPRIPFFLGRPPAKAASP IGLVPEPFDITITDILARMDDAG---FVSVVVWLLSAH		170
Tv LPG1II	NCAGAPQLAA FVGRVDATQAPDGLVPEPFDITDQIFARLADASQGEFDEILT VVLLVAH		179
Pc LPO811	NCPGAPQMNF TGRKPATQAPDGLVPEPFDITVDQI IARVND--GEFDELELVWMLSAH		176
Pr LPG3	NCPGAP TLNAF IGRKDATQAAPDGLVPEPFDVNTIILARFNDA--GDFDELET VVFLIAH		175
	* * * * * ** * * * * * * * * *		
	▼	■ ● ● ● ●	
Tv NPR	TVAAQDKVDDSI PGTPFDSTP SDFDAQFFVESMLNGTLTPGSALHDGVEQSPL-----		228
Tv PGV	TIAAADEVDP TI PGTPFDSTPELFD TQFFIETQLRGTFPGTAGNQGEVLSPL-----		230
Pc MNP1	SVARADKVDQTI DAAPFDSTPFTFD TQVFLVLLKGVGFPGSANNTGEVASPLPLGS---		229
Cs MNP1	SVARADKVDPTLDAAPFD TTPFTFD TQIFLEVLLKGVGFPGLDNNTGEVASPLPFGDTST		232
Po MNP1I	SVAAAHDVDETI PGTPFDSTPNLFD SQIF IETQLRGISFPGTGGNHGVEQSPL-----		223
Tv LPG1II	TVAAANDVDP TVPGSPFDSTPEVWDTQFFVEVLNGTTFPGTGDNQGEVASPI-----		232
Pc LPO811	SVAAVNDVDP TVQG LFPDSTP G I FDSQFFVETQFRGTLFPGSGGNQGEVESGM-----		229
Pr LPG3	SVAAQNDIDPAVSHAPFDSTP SVM DQGF IETQLRGVEF IGSGGIEGVAESPV-----		228
	* * * * * * * * * * * * * * *		
Tv NPR	----PGEFRLQSDFLIGRDSRTSCEWQKMIADRANMLQKFEQTVLKL--LGFQSALTD		282
Tv PGV	----PGEMRLQSDSELARDSRTACEWQSMVNNQSKMMTAFAMAAMAKLAVIGQDVSQILD		286
Pc MNP1	--GSDTGEMRLQSDFALAHDPRTACI WQGFVNEQAFMAASFRAAMSKLAVLGHNRNSLID		288
Cs MNP1	GGNDTGMMRLQSDFALARDERTACFWQGFVDQDFMAQSFQAAFEKMAILGNSAADLINC		292
Po MNP1I	----KEMRLQSDHFLARDDRTSCEWQSMNTDQKIQDRFSDTLFKMSMLGQNQDAMID		279
Tv LPG1II	----AGEFRLQSDFAIARDSRSACEWQSFVDNQPKAQAMFQVFVHDL SIFGQDINSLVDC		288
Pc LPO811	----AGEIRIQTDHTLARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQIFLAL TQLGQDPNAMTDC		285
Pr LPG3	----KGEFRLMSDQQIARDNR TACEWQSF GTDQAKLQNRQFIFEAMGQLGTDPTTLID		284
	* * * * * * * * * * * * * * *		

Tv NPR	<u>SDVIP</u> IATGTVA--- <u>DPFLPAGK</u> TMADIEAACAAATPFPTLSAASGP-ETTIPAVPLDS-- 336
Tv PGV	SEVIPMPPPPAS---AAHFPAGLSNADVEQACAETPFPTLQTDGP-ETSVAPVPPS--- 339
Pc MNP1	SDVVPVKPATG--QPAMFPASTGPDLELSCPSERFPTLTTPGASQSLIAHCPDGMS 346
Cs MNPI	SAVVPQSVGPVT--VPATFPATTGPDQLNCTSETFPSSLIDPGATETLIPHCPDGTE 350
Po MNPII	SDVIPVPAALVT---KPHLPAGKSKTDVEQACATGAFPALGADPGP-VTSVPRVPPA--- 332
Tv LPGIII	TEVVP IPAPLQG---VTHFPAGLTVNDIDQPCVETPFPTLPTDGP-ATSVAPVPLP--- 341
Pc LPO811	SDVIPLSKPIPGNGPFSFFPPGKSHSDIEQACAETPFPSLVTLPGP-ATSVARIPPHKA- 343
Pr LPG3	SDVLPVPPPLS---TVPHFPAGITINDVEPACAETPFPTLPTDGP-ATAVAAVPRD--- 337
	* * * * * * * *
Tv NPR	-----
Tv PGV	-----
Pc MNP1	CPGVQFNGPA---- 356
Cs MNPI	CPSLQFSGPATDSP 364
Po MNPII	-----
Tv LPGIII	-----
Pc LPO811	-----
Pr LPG3	-----

Abb. 4.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen von NPR und verschiedenen Mangan- und Ligninperoxidasen (Collins *et al.*, 1999, modifiziert)

(■: Manganbindestellen; ▼: konservierte Reste der Pflanzenperoxidasesuperfamilie; ●: Bindestellen für aromatische Substrate in Ligninperoxidasen; \_\_\_: Homologie zu den Peptidsequenzen aus *T. suaveolens* (vgl. Abb. 3.22); Tv NPR: Peroxidase NPR aus *T. versicolor*; Tv PGV: Peroxidase PGV aus *T. versicolor*; Pc MNP1: Manganperoxidase MNP1 aus *Phanerochaete chrysosporium*; Cs MNPI: Manganperoxidase MNPI aus *Ceriporiopsis subvermispora*; Po MNPII: Manganperoxidase MNPII aus *Pleurotus ostreatus*; Tv LPGIII: Ligninperoxidase LPGIII aus *T. versicolor*; Pc LPO811: Ligninperoxidase LPO811 aus *P. chrysosporium*; Pr LPG3: Ligninperoxidase LPG3 aus *Phlebia radiata*)

Außerdem sind die 10 konservierten Aminosäurereste der Pflanzenperoxidasesuperfamilie vorhanden (Collins *et al.*, 1999, Welinder; Gajhede, 1993, Abb. 4.1). So sind die Regionen um das sogenannte distale Histidin (Rest 47) und den Argininrest 43, die für die Ladungsstabilisierung während der Reaktion des Häms mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verantwortlich sein sollen, und um das proximale Histidin (Rest 175), das als axialer Ligand des Häms dient, konserviert (Abb. 4.1, Collins *et al.*, 1999, Bosshard *et al.*, 1984, Poulos *et al.*, 1993, Poulos; Kraut, 1980). Die Aminosäurereste, die in Ligninperoxidasen mit aromatischen Substraten wechselwirken, sind hingegen nicht enthalten (Collins *et al.*, 1999, Poulos *et al.*, 1993). In Bezug auf den Seringehalt (26 Reste) ist NPR näher mit den Manganperoxidasen (24 Reste) als mit den Ligninperoxidasen (16 Reste) verwandt (Collins *et al.*, 1999, Johansson *et al.*, 1993). Allerdings enthält NPR nur acht Cysteinreste und kann somit, wie die Ligninperoxidasen, nur vier Disulfidbrücken bilden (Collins *et al.*, 1999, Poulos *et al.*, 1993, Limongi *et al.*, 1995). In Manganperoxidasen ist hingegen noch eine fünfte Disulfidbrücke enthalten, die für die korrekte Ausbildung der

Manganbinderegion verantwortlich sein soll (Sundaramoorthy *et al.*, 1994). NPR kann somit, obwohl es die Manganbinderegion der Manganperoxidasen enthält, nicht eindeutig den Mangan- oder den Ligninperoxidasen zugeordnet werden (Collins *et al.*, 1999). Da die cDNA-Sequenz von MrP eine Homologie von über 96% zu NPR aufweist (Kim *et al.*, 2005), gilt für dieses Enzym das Gleiche.

#### 4.2.1 Einfluss von $Mn^{2+}$ auf die Enzymaktivität

Sowohl bei NPR als auch bei MrP wird das Transkriptionslevel der codierenden cDNA durch den Zusatz von 0,5  $\mu M$  bzw. 1  $\mu M$   $Mn^{2+}$  während der Kultivierung abgesenkt (Collins *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2005). Für Manganperoxidasen aus *P. chrysosporium* wird hingegen ein induzierender Effekt auf die Gentranskription durch  $Mn^{2+}$  beschrieben (Brown *et al.*, 1991, Gettemy *et al.*, 1997, Gettemy *et al.*, 1998). Dieser Effekt wird auf ein „metal response“ Element in der Promoterregion der Gene zurückgeführt (Gold; Alic, 1993). Das SNL-Medium (2.2.1), das für die Kultivierung von *T. suaveolens* verwendet wurde, enthält 0,2  $\mu mol L^{-1}$   $Mn^{2+}$ . Diese  $Mn^{2+}$ -Konzentration ist um den Faktor 2,5 bzw. 5 niedriger, als die von Collins *et al.* (1999) bzw. Kim *et al.* (2005) verwendeten Konzentrationen. Die Kultivierung von *T. suaveolens* ohne  $Mn^{2+}$  und unter Zusatz erhöhter  $Mn^{2+}$ -Konzentrationen könnte Aufschluss darüber geben, ob die Bildung der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme eher wie bei NPR und MrP aus *T. versicolor* oder wie bei Manganperoxidasen reguliert wird.

Bei der Konzentrierung von Kulturüberständen von *T. suaveolens* mittels Ultrafiltration wurden hohe Aktivitätsverluste beobachtet, die durch die Rekombination von Filtrat und Retentat minimiert werden konnten (3.3.1). Auch bei der Ionenaustauschchromatographie an einem schwachen Anionentauscher wurde ein hoher Verlust an Enzymaktivität verzeichnet. Durch Rekombination der aktiven Fraktionen mit dem Durchbruch konnte die Wiederfindung verbessert werden (3.3.2.1). Diese beiden Beobachtungen sprechen dafür, dass bei der Ultrafiltration und der IEX niedermolekulare (< 10 kDa) und möglicherweise kationische (da im Durchbruch nach dem Anionentauscher enthaltene) Bestandteile abgetrennt werden, die neben den Enzymen am

$\beta,\beta$ -Carotin-Abbau beteiligt sind. Der Zusatz von Spurenelementlösung zu den aktiven Fraktionen der IEX führte zur gleichen Erhöhung der Enzymaktivität wie bei der Rekombination mit dem Durchbruch (3.3.2.1). Die Zugabe der einzelnen Spurenelemente zum Enzymtest ergab, dass der Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin durch  $Mn^{2+}$  signifikant gesteigert werden konnte, während die übrigen Spurenelemente keinen Einfluss auf die Aktivität hatten (3.2.9). Möglicherweise verläuft der  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau durch die Enzyme aus *T. suaveolens* nach einem ähnlichen Mechanismus, wie er für den Abbau von phenolischen Ligninbestandteilen durch Manganperoxidasen beschrieben ist (Abb. 4.2).

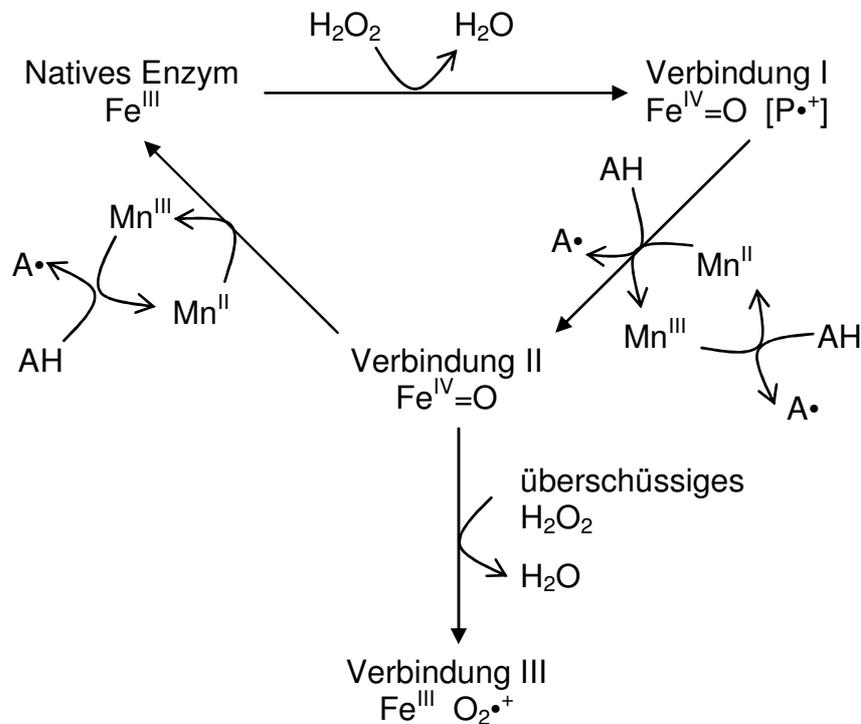


Abb. 4.2: Katalytischer Kreislauf der Manganperoxidasen (Gold *et al.*, 1989, modifiziert)  
(AH: Substrat (Phenol oder aromatisches Amin); A<sup>•</sup>: Radikal; [P<sup>•+</sup>]: Porphyrin- $\pi$ -Kationradikal)

Durch eine Übertragung von zwei Elektronen vom Eisen(III) der Manganperoxidase auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kommt es zunächst zur Bildung eines Porphyrin-Kation-Radikals, das einen Fe(IV)-Oxo-Komplex enthält (Verbindung I) (Wariishi *et al.*, 1988). Verbindung I wird durch Übertragung eines Elektrons von Mn(II)

oder von einem Substrat (Phenol oder aromatisches Amin) zu Verbindung II ( $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) reduziert (Wariishi *et al.*, 1988).  $\text{Mn}(\text{II})$  wird dabei zu  $\text{Mn}(\text{III})$  oxidiert, das seinerseits ein Substratmolekül oxidieren kann. Verbindung II wird durch  $\text{Mn}(\text{II})$  wieder zum nativen Enzym reduziert (Wariishi *et al.*, 1988, Wariishi *et al.*, 1989). Ein Überschuss von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt zur Bildung von Verbindung III ( $\text{Fe}^{\text{III}} \text{O}_2^{\cdot-}$ ) (Wariishi *et al.*, 1988). Verbindung III kann nicht mehr zum nativen Enzym reduziert werden und ist nicht mehr am katalytischen Kreislauf beteiligt. Während sowohl  $\text{Mn}(\text{II})$  als auch eine Vielzahl von Phenolen und aromatischen Aminen Verbindung I zu Verbindung II oxidieren können, kann Verbindung II nur durch  $\text{Mn}(\text{II})$  wieder zum nativen Enzym reduziert werden (Abb. 4.2, Wariishi *et al.*, 1988, Wariishi *et al.*, 1989). Somit ist  $\text{Mn}(\text{II})$  für die Vollendung des katalytischen Kreislaufes der Manganperoxidase zwingend notwendig (Wariishi *et al.*, 1988, Wariishi *et al.*, 1989).

Der Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin in den (teilweise) gereinigten Fraktionen nach der IEX und der GFC konnte durch Zusatz von  $\text{MnSO}_4$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum Enzymtest deutlich gesteigert werden (Tab. 3.3). Dies erhärtet die Vermutung, dass die Spaltung des  $\beta,\beta$ -Carotins ähnlich dem Abbau phenolischer Ligninbestandteile durch Manganperoxidase verläuft. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass es noch einen zweiten, Mangan und  $\text{H}_2\text{O}_2$  unabhängigen, Abbaumechanismus gibt, da auch in Abwesenheit von  $\text{Mn}(\text{II})$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\beta,\beta$ -Carotin durch die gereinigten Enzyme aus *T. suaveolens* abgebaut wurde, wenn auch in geringerem Maße. Dies spräche dafür, dass es sich bei den  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen nicht um typische Manganperoxidase handelt. Die Umsetzung von verschiedenen typischen Substraten von Mangan- und Ligninperoxidase (z.B. Veratrylalkohol, Guajacol,  $\text{Mn}(\text{II})$  im Mn-Oxidationstest) mit den Enzymen aus *T. suaveolens* könnte Aufschluss über die katalytischen Fähigkeiten der Enzyme geben. Durch „site directed“-Mutagenese der codierenden cDNA könnten zudem Kenntnisse über die an der  $\beta,\beta$ -Carotin-Spaltung beteiligten Aminosäurereste gewonnen werden. Auch die Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse der Enzyme aus *T. suaveolens* kann Erkenntnisse über Lage und Funktion der aktiven Zentren der Enzyme geben.

### 4.2.2 Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Enzymaktivität

Der Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum Enzymtest führte zu einem starken Anstieg der Enzymaktivität im Vergleich zum Enzymtest ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Allerdings war diese Steigerung nur während der ersten 2 min zu beobachten, danach flachte die Kurve stark ab, während die Extinktion ohne Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 10 min konstant abnahm (3.2.6).

Wie oben diskutiert, wird das native Enzym bei Manganperoxidase durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Verbindung I oxidiert (Abb. 4.2). Im weiteren Verlauf des katalytischen Kreislaufes kommt es zur Bildung von Verbindung II, die durch überschüssiges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Verbindung III übergehen kann. Verbindung III kann nicht mehr zum nativen Enzym reduziert werden und scheidet aus dem katalytischen Kreislauf aus (Abb. 4.2).

Dies erklärt die Beobachtungen bei Zusatz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum Enzymtest mit konz. Kulturüberstand aus *T. suaveolens*. Möglicherweise wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Vergleich zu den  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen aus *T. suaveolens* im Überschuss zugesetzt. Durch vermehrte Bildung von Verbindung I kommt es zunächst zu einem Anstieg der Enzymaktivität. Im weiteren Verlauf nimmt die Aktivität jedoch durch Bildung von Verbindung III stark ab, da ein Teil der Enzyme aus dem katalytischen Kreislauf ausscheidet.

### 4.2.3 Reinigung der $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens*

Die biochemische Charakterisierung ergab für den Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin durch *T. suaveolens* in Citronensäure/Phosphat-Puffer ein Temperaturoptimum von 38 °C und ein pH-Optimum von 3,5. Bisher sind nur drei weitere Enzyme aus zwei Basidiomyceten bekannt, die ebenfalls  $\beta,\beta$ -Carotin abbauen können (Langhoff, 2002, Scheibner, 2006). Für den  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau durch VPL3 aus *Pleurotus eryngii* wurden Optima bei 34 °C und pH 3,5 in Citronensäure/Phosphat-Puffer beschrieben (Langhoff, 2002), während das Temperaturoptimum für MsP1 und MsP2 aus *Marasmius scorodonius* bei 27 °C und das pH-Optimum in Citronensäure/Phosphat-Puffer bei 5 lag (Scheibner,

2006). Da sowohl das Temperatur- als auch das pH-Optimum eher den optimalen Bedingungen für die polyvalente Peroxidase aus *P. eryngii* entsprechen, könnten die  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens* nähere Verwandtschaft zu VPL3 aus *P. eryngii* als zu MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* aufweisen. Daher wurde die Reinigungsstrategie für die Enzyme aus *T. suaveolens* an die Reinigung der polyvalenten Peroxidase aus *P. eryngii* angelehnt. Diese wurde durch einen dreistufigen Reinigungsprozess bestehend aus Hydrophober Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose, Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose (Elution durch pH-Shift von pH 4,5 zu pH 3,5) und Gelfiltrationschromatographie an Superdex 200 isoliert (Langhoff, 2002).

Der Kulturüberstand von *T. suaveolens* wurde zunächst mittels Ultrafiltration bzw. „Tangential-Flow-Filtration“ konzentriert, um niedermolekulare Mediumbestandteile abzutrennen und das Volumen zu reduzieren (3.3.1, vgl. 4.2.1).

Als erster Reinigungsschritt sollte eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt werden, weil auf eine IEX-Säule große Volumina aufgetragen werden können, die das Säulenvolumen um ein Mehrfaches übersteigen (Rehm, 2002). Da durch den Zusatz von NaCl die Aktivität der Enzyme aus *T. suaveolens* stark inhibiert wurde und auch durch Dialyse nicht wieder regeneriert werden konnte (3.2.7), sollten die Enzyme durch einen pH-Shift und nicht durch einen NaCl-Gradienten von der Ionenaustauschersäule eluiert werden. Eine isoelektrische Fokussierung mit anschließender Aktivitätsentfärbung mit konzentriertem Kulturüberstand von *T. suaveolens* hatte ergeben, dass der pI der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme eher im sauren Bereich zwischen 3 und 3,5 liegen (Abb. 3.12). Daher wurde ein schwacher Anionenaustauscher (DEAE-Sepharose) für die Reinigung eingesetzt, und die Proteine wurden bei pH 4,5 an die Säule gebunden. Bei der Verwendung von Anionenaustauschern soll der pH-Wert des Startpuffers etwa eine pH-Einheit über dem pI der Zielenzyme liegen. Dadurch wird gewährleistet, dass die gesuchten Enzyme negativ geladen sind und an die Säule binden, während Proteine mit einem höheren pI nicht gebunden werden. Dadurch wird die Kapazität der Säule für die Zielenzyme erhöht. Für die Elution der  $\beta,\beta$ -Carotin-

abbauenden Enzyme wurde ein Elutionspuffer verwendet, dessen pH-Wert (pH 3) unter bzw. bei dem vermuteten pI der Zielenzyme lag (3.3.2.1), damit diese positiv geladen bzw. ungeladen vorliegen und somit nicht mehr an den Anionentauscher binden. Durch die IEX konnten etwa 98% der Fremdproteine abgetrennt werden (3.3.2.2). Bis zu 20 mL konzentrierter Kulturüberstand wurden auf die IEX-Säule gegeben (3.3.2.2); für die Reinigung größerer Enzymmengen kann dieses Volumen noch vergrößert werden, bis die Bindungskapazität der Säule erreicht ist.

Als zweiter Reinigungsschritt wurde die Gelfiltrationschromatographie eingesetzt. Dabei werden Moleküle in erster Linie nach ihrer Größe getrennt, wobei zuerst die größeren und dann die kleineren Moleküle von der Säule eluiert werden. Nach der GFC wurde nur noch in zwei Fraktionen Enzymaktivität nachgewiesen (3.3.3). Zunächst wurde eine analytische GFC-Säule eingesetzt; für die Reinigung größerer Enzymmengen kann analog zur Reinigung von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodonius* ein Up-Scaling auf eine präparative Säule durchgeführt werden (3.4.7).

Durch die Kombination von IEX und GFC konnten die  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens* zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden. Bei der SDS-Page war nur noch eine Hauptbande zu erkennen (Abb. 3.17). Der Anteil der Zielenzyme am Gesamtprotein des Kulturüberstandes betrug 0,04% bei einer Anreicherung von 11 bzw. 21 und einer Ausbeute von 0,6 bzw. 1% (Tab. 3.3; vgl. 4.2.1). Die Reinigung von 2 Ligninperoxidasen (LiP1 und LiP2) und 2 Manganperoxidasen (MnP1 und MnP2) aus *Bjerkandera adusta* ergab Ausbeuten zwischen 3,8% (MnP2) und 15,9% (LiP1) bei Anreicherungen zwischen 4,5 (MnP2) und 5,5 (LiP2) (Heinfling *et al.*, 1998). Zwei Manganperoxidasen aus *P. eryngii* wurden mit einer Ausbeute von 56% und einer Anreicherung von 25 gereinigt (Martinez *et al.*, 1996). Der Anteil der isolierten Peroxidasen am Gesamtproteingehalt des Kulturüberstandes liegt bei *P. ostreatus* zwischen 0,6 und 8% (Kamitsuji *et al.*, 2004). Der vergleichsweise geringe Anteil der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens* am Gesamtproteingehalt des Kulturüberstandes und die geringe Ausbeute sind teilweise auf die großen Verluste bei der Ultrafiltration zurückzuführen (3.3.1),

die nur teilweise durch die Abtrennung von niedermolekularen Bestandteilen zu erklären sind (4.2.1). Möglicherweise binden die Zielenzyme irreversibel an die Membranen der Ultrafiltrationseinheiten.

#### 4.2.4 Molekulargewicht und isoelektrische Punkte

Das ermittelte Molekulargewicht der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens* lag bei 57 kDa (SDS-Page) bzw. 52 kDa (GFC) (3.3.4). Die Molekulargewichte von Manganperoxidasen liegen im Bereich zwischen 42 kDa (Kamitsuji *et al.*, 2004) und 55 kDa (Gold *et al.*, 2000), wobei viele ein Molekulargewicht von 43 bis 45 kDa aufweisen (Heinfling *et al.*, 1998, Johansson; Nyman, 1993, Martinez *et al.*, 1996).

Bei der IEF waren sechs Banden bei pI-Werten von 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,8 und 3,9 sichtbar (Abb. 3.19). Dies kann durch das Vorhandensein von Isoenzymen mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und/oder durch unterschiedliche Glykosidierung der Enzyme erklärt werden. So fanden Johansson und Nyman (1993) in *T. versicolor* eine Vielzahl von Isoenzymen von Lignin- und Manganperoxidasen. Die insgesamt 16 Ligninperoxidasen wiesen pIs zwischen 3,1 und 3,7 und Molekulargewichte zwischen 42 und 46 kDa auf, während die 5 Manganperoxidasen pIs zwischen 2,9 und 3,2 bei einer Molekulargewichtsverteilung von 44 bis 45 kDa zeigten. Mit neun der Enzyme (6 Lignin- und 3 Manganperoxidasen) wurden partielle Sequenzierungen durchgeführt (Johansson *et al.*, 1993). Diese ergaben, dass acht der neun Enzyme unterschiedliche, wenn auch sehr ähnliche N-Termini besitzen und somit Isoenzyme sind. Johansson *et al.* (1993) vermuteten, dass es sich auch bei den 14 restlichen Lignin- und Manganperoxidasen um Isoenzyme handelt. Sie schlossen aber auch nicht aus, dass unterschiedliche Glykosidierungsmuster einen Beitrag zur chromatographischen Heterogenität der Enzyme leisten. Bei Mangan- und Ligninperoxidasen handelt es sich um glykosidierte Proteine mit Kohlenhydratgehalten zwischen 3 und 21% (Johansson *et al.*, 1993, Martinez *et al.*, 1996, Heinfling *et al.*, 1998, Kamitsuji *et al.*, 2004). Um zu klären, ob die unterschiedlichen pI-Werte bei den  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen aus

*T. suaveolens* durch Isoenzyme mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen oder durch unterschiedliche Glykosidierungsmuster zustande kommen, kann eine Chromatofokussierung als dritte Reinigungsstufe durchgeführt werden. Dabei wird auf einer Ionenaustauschersäule durch Verwendung eines speziellen Elutionspuffers (Polypuffer) ein linearer pH-Gradient erzeugt. Die Enzyme werden in der Reihenfolge ihrer isoelektrischen Punkten eluiert. So können noch Proteine getrennt werden, deren pI sich um weniger als 0,1 pH-Einheiten unterscheiden (Rehm, 2002). Die einzelnen Enzyme können anschließend mittels Edman-Abbau und nach Trypsin-Abbau mittels ESI-MS/MS sequenziert werden, um zu prüfen, ob sie sich in ihren Aminosäuresequenzen unterscheiden.

#### 4.2.5 UV/Vis-Spektrum

Das UV/Vis-Spektrum der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme aus *T. suaveolens* zeigt ein deutliches Absorptionsmaximum bei 406 nm und zwei kleinere Maxima im Bereich von 540 und 630 nm (Abb. 3.20). Sowohl Lignin- als auch Manganperoxidase enthalten Eisenprotoporphyrin IX (Häm) als prosthetische Gruppe (Gold *et al.*, 1989). Häm-Proteine zeigen eine starke Absorptionsbande bei ca. 400 nm (Soret-Bande) sowie zwei schwächere Banden bei ca. 530 und 550 nm (Lottspeich; Zorbas, 1998). Für native Lignin- und Manganperoxidase wurden Absorptionsmaxima bei etwa 407, 502 und 632 nm beschrieben (Abb. 4.3, Gold *et al.*, 1989).

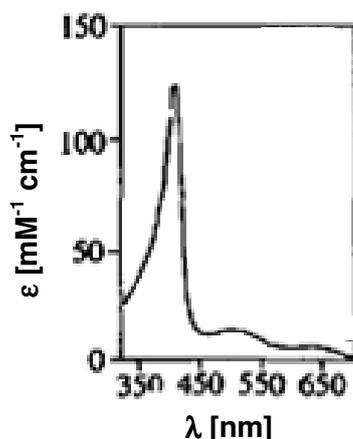


Abb. 4.3: Absorptionsspektrum einer nativen Manganperoxidase aus *Dichomitus squalens* (Perie *et al.*, 1996, modifiziert)

Aufgrund der Lage der Absorptionsmaxima ist davon auszugehen, dass es sich auch bei den  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzymen aus *T. suaveolens* um Häm-Proteine handelt. Die Abweichung des zweiten Maximums (ca. 530 nm) vom zweiten Maximum der Lignin- und Manganperoxidasen (502 nm) könnte darauf hindeuten, dass die Enzyme aus *T. suaveolens* weder zu den Lignin- noch zu den Manganperoxidasen, sondern zu einer anderen, mit diesen möglicherweise verwandten, Gruppe gehören.

### 4.3 *Marasmius scorodonius*

*Marasmius scorodonius*, wegen seines intensiven Geruchs und Geschmacks nach Knoblauch auch Knoblauchswindling genannt, wächst auf Holz und anderen pflanzlichen Resten (Ainsworth *et al.*, 1973). Er gehört zu den Weißfäulepilzen und wird als Würzpilz verwendet.

#### 4.3.1 Induktion der $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme

Scheibner (2006) isolierte zwei Peroxidasen (MsP1 und MsP2), welche  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau oxidativ abzubauen vermögen. Die Aktivität dieser Enzyme im Kulturüberstand betrug durchschnittlich  $0,3 \text{ mU mL}^{-1}$ . Ihr Anteil am Gesamt-

protein des Kulturüberstandes betrug lediglich ca. 0,2% (Scheibner, 2006). Durch Induktion der Enzymproduktion sollte dieser Anteil erhöht werden. Zu diesem Zweck wurde das Kulturmedium mit  $\beta,\beta$ -Carotin, Lutein bzw. Lignin versetzt und die Aktivität der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme während der Kultivierung verfolgt (3.4.1). Obwohl MsP1 und MsP2 sowohl  $\beta,\beta$ -Carotin als auch Lutein abbauen können (Scheibner, 2006, Hardebusch, 2006), wurde die Enzymaktivität im Kulturüberstand durch Zusatz von  $\beta,\beta$ -Carotin bzw. Lutein nicht erhöht (3.4.1). Der Zusatz von Lignin führte im Vergleich mit einer nicht induzierten Kultur hingegen zu einer Steigerung der Enzymaktivität um etwa 50%, wobei die höchste Enzymaktivität in beiden Kulturen am 4. Kulturtag erreicht war (3.4.1).

Am Ligninabbau durch Weißfäulepilze sind in erster Linie Laccasen, Lignin- und Manganperoxidasen beteiligt (Martinez *et al.*, 2005). Bei MsP1 und MsP2 aus *M. scorodonius* handelt es sich ebenfalls um Peroxidasen, die allerdings keine Homologien zu den Lignin- und Manganperoxidasen anderer Basidiomyceten aufweisen (Scheibner, 2006, 4.3.5). Da die Produktion von MsP1 und MsP2 in Submerskultur durch den Zusatz von Lignin induziert werden kann, ist es wahrscheinlich, dass auch diese Enzyme am Ligninabbau beteiligt sind. Die Umsetzung von Lignin und Ligninmodellkomponenten mit isoliertem MsP1 und MsP2 wird in Nachfolgearbeiten Aufschluss darüber geben, inwiefern diese Enzyme am Ligninabbau beteiligt sind.

Um schnell größere Enzymmengen produzieren zu können, wurde *M. scorodonius* unter Zusatz von Lignin im 2 L-Bioreaktor kultiviert. Dabei stieg die Aktivität der  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme im Vergleich zur Kultivierung im Schüttelkolben mit Ligninzusatz um 44% (3.4.2). Die höchste Aktivität wurde einen Tag später als im Schüttelkolben erreicht.

Möglicherweise führt ein erhöhter Sauerstoffeintrag durch das stetige Durchleiten von Druckluft im Bioreaktor im Vergleich zum Schüttelkolben zu einer gesteigerten Enzymproduktion. So konnte die Manganperoxidase-Aktivität in *P. chrysosporium* durch Zufuhr von 100%igem Sauerstoff (10 min pro Tag) während der Kultivierung im Vergleich zur Kultivierung unter Luftatmosphäre

deutlich gesteigert werden (Li *et al.*, 1995). Bei der Kultivierung von *Thanatephorus cucumeris* in einem 7 L-Fermenter führte die Zufuhr von 60%igem Sauerstoff im Vergleich zur Zufuhr von Luft (jeweils 2 L min<sup>-1</sup>) ebenfalls zu einer deutlichen Steigerung der Peroxidaseaktivität (Kim; Shoda, 1998).

#### 4.3.2 Abbau von Xanthophyllestern und Bixin

Hardebusch (2006) zeigte, dass MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* nicht nur  $\beta,\beta$ -Carotin, sondern auch eine Vielzahl anderer Carotinoide (Lutein, Zeaxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin, Lycopin,  $\beta$ -Apo-8'-carotinal und  $\beta$ -Apo-12'-carotinal) zu flüchtigen Aromastoffen abbauen können. Da viele Xanthophylle in Pflanzen als Mono- und Diester vorliegen, wurden ein Gemisch aus Capsanthinestern (aus *Paprika oleoresin*, Abb. 4.4) und ein Gemisch aus Luteinestern (aus *Tagetes oleoresin*, Abb. 4.4) jeweils mit konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodoni* umgesetzt. Photometrisch und mittels HPLC-Analyse konnte ein Abbau der Lutein- und Capsanthinester beobachtet werden (3.4.3 und 3.4.4). Die berechneten Enzymaktivitäten waren jedoch jeweils geringer als für den  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau. Möglicherweise wird der Zugang zur Carotinoidstruktur für die Enzyme durch die Veresterung erschwert, was zu einer langsameren Umsetzung führt. Eine isoelektrische Fokussierung mit anschließender Aktivitätsentfärbung ergab, dass sowohl Lutein- als auch Capsanthinester von Enzymen mit isoelektrischen Punkten von 3,6 und 3,8 abgebaut werden (Abb. 3.25 und Abb. 3.27). Für die  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauenden Enzyme MsP1 und MsP2 wurden isoelektrische Punkte von 3,7 bzw. 3,5 ermittelt (Scheibner, 2006). Da die Bestimmung der isoelektrischen Punkte nach der Aktivitätsentfärbung durch die Diffusion der Proteine in das Agarosegel und eine damit verbundene Verbreiterung der entfärbten Bereiche erschwert ist, ist davon auszugehen, dass MsP1 und MsP2 auch für den Abbau der Xanthophyllester verantwortlich sind. Eine genaue Klärung kann die Umsetzung der Xanthophyllester mit isoliertem MsP1 und MsP2 bringen.

Durch die Kombination von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* mit einer Xanthophyllester-spaltenden Carboxylesterase aus *Pleurotus sapidus* (Zorn *et al.*, 2005) könnten aus Xanthophyllestern wirtschaftlich relevante Aromastoffe hergestellt werden, ohne die Ester vorher alkalisch verseifen zu müssen.

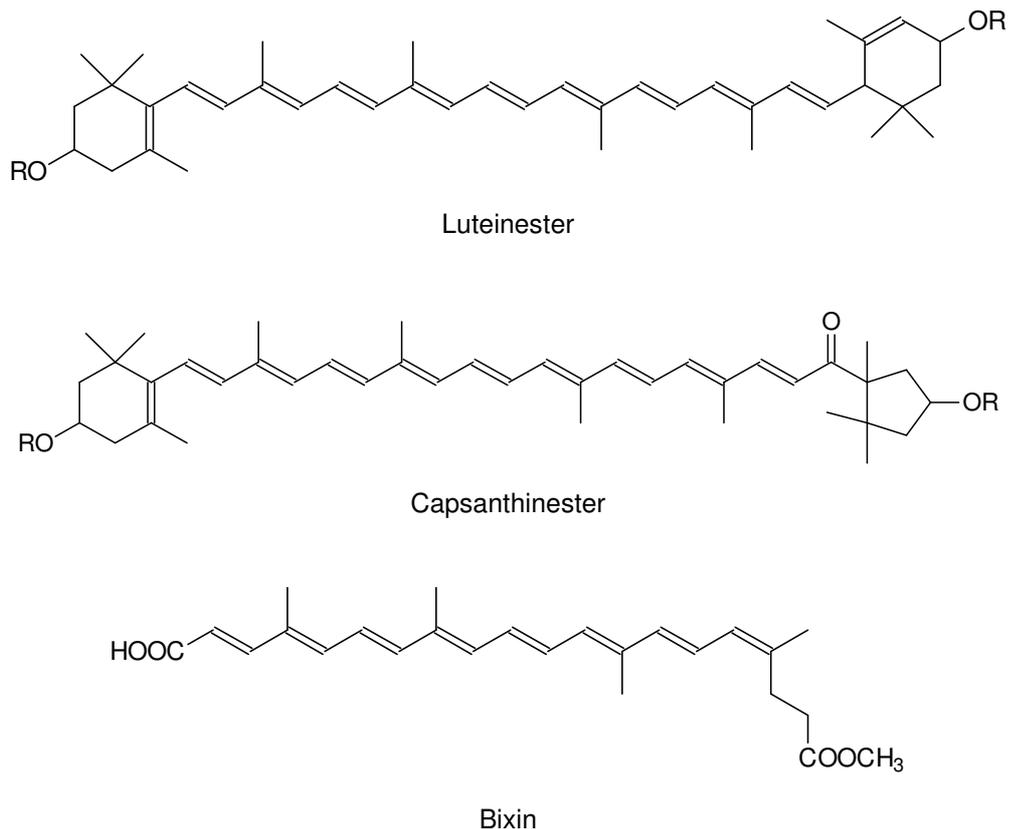


Abb. 4.4: Strukturformeln von Lutein- und Capsanthinestern und Bixin  
(R = Carbonsäure oder Wasserstoff)

Bei Bixin handelt es sich um ein offenkettiges Xanthophyll mit zwei endständigen Carboxylgruppen von denen eine als Methyl ester vorliegt (Abb. 4.4). Es kommt natürlicherweise in den Samen des Raku- oder Orleanstrauches (*Bixa orellana*) vor (Belitz *et al.*, 2001) und ist als E 160b für die Färbung von Margarine, Käse, Feinen Backwaren, Speiseeis, Snacks, Likören, Räucherfisch und Dessertspeisen zugelassen (Anlage 1 Teil B und C zu § 3, Abs. 1 ZZuIV). Bei der Färbung von Käse verbleibt ein Teil des Bixins in

der Molke. Wenn die Molke weiterverarbeitet werden soll (z.B. in Säuglingsnahrung) kann die Färbung des Produktes unerwünscht sein (Zorn *et al.*, 2006).

Eine wässrige Bixinlösung wurde bei pH 3,5 und pH 5 mit konzentriertem Kulturüberstand von *M. scorodoni* versetzt und der Abbau photometrisch verfolgt. Die Enzymaktivität für den Bixinabbau liegt um 62% bzw. 77% niedriger als für den  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau bei pH 3,5 (3.4.5). Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass auch andere Xanthophylle durch konzentrierte Kulturüberstände von *M. scorodoni* im Vergleich zu  $\beta,\beta$ -Carotin langsamer abgebaut wurden (Hardebusch, 2006).

#### **4.3.3 Abbau von $\beta,\beta$ -Carotin unter Zusatz von Glucose und Glucoseoxidase**

Der Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin durch MsP1 und MsP2 wurde durch Zugabe von  $H_2O_2$  deutlich gesteigert (Scheibner, 2006, Hardebusch, 2006). Glucoseoxidase oxidiert Glucose unter Bildung von  $H_2O_2$  zu Gluconsäure. Diese Reaktion sollte mit dem  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau gekoppelt werden. Die kontinuierliche Neubildung von  $H_2O_2$  durch die Glucoseoxidase soll gewährleisten, dass  $H_2O_2$  für den  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau über einen längeren Zeitraum ausreichend zur Verfügung steht. Durch den Zusatz von Glucose und Glucoseoxidase konnte die Enzymaktivität für den  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau durch MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* deutlich gesteigert werden, wobei ein Zusatz von 100 mU Glucoseoxidase zu der höchsten Zunahme führte (3.4.6 und 2.5.3.1). Bei einem Zusatz von 150 mU Glucoseoxidase lag die Enzymaktivität noch über der Aktivität ohne Zusatz von Glucoseoxidase, aber deutlich unter der Aktivität bei einem Zusatz von 100 mU Glucoseoxidase. Möglicherweise wird durch die Zugabe von 150 mU Glucoseoxidase so viel  $H_2O_2$  gebildet, dass es zu einer teilweisen Inaktivierung von MsP1 und MsP2 kommt, wie es auch z.B. für Manganperoxidasen durch die Bildung von Verbindung III durch überschüssiges  $H_2O_2$  beschrieben ist (Abb. 4.2). Die zugesetzte Menge an Glucose ist für das Ausmaß der Aktivitätssteigerung nicht von Bedeutung

(3.4.6). Glucose muss als Substrat für die Glucoseoxidase lediglich im Überschuss vorhanden sein, damit die Umsatzrate stabil bleibt.

#### 4.3.4 Reinigung von MsP1 und MsP2

Für die Reinigung von MsP1 und MsP2 wurde das von Scheibner (2006) entwickelte Reinigungsschema modifiziert. Da die Enzyme aus mehreren Litern Kulturüberstand isoliert werden sollten, wurde als zweite Reinigungsstufe eine präparative anstelle der analytischen Superdex-Säule eingesetzt (3.4.7). Nach den zwei Reinigungsstufen waren sowohl die Ausbeute mit über 70% als auch die spezifische Aktivität mit  $148,7 \text{ mU mg}^{-1}$  etwas höher als die von Scheibner (2006) ermittelten Werte (Ausbeute: 50%, spezifische Aktivität:  $119,27 \text{ mU mg}^{-1}$ ). Die präparative Superdex-Säule ist somit für die Reinigung größerer Enzymmengen eine gute Alternative zur analytischen Säule. Auf die präparative Säule kann im Vergleich zur analytischen das 10fache Probevolumen aufgegeben werden. Da ein Lauf der präparativen Säule mit ca. 90 min nur etwa 20 min länger dauert als ein Lauf der analytischen Säule, ergibt sich ein Zeitersparnis von über 10 Stunden bei Verwendung der präparativen Säule bei gleichbleibender Ausbeute und spezifischer Aktivität. Durch die zusätzliche Verwendung einer größeren IEX-Säule könnte der Zeitbedarf weiter minimiert werden.

#### 4.3.5 Das Enzym MsP2

Das Enzym MsP2 aus *M. scorodonius* gehört auf Grund seiner Homologie (49%) zu einer ungewöhnlichen Peroxidase (DyP) aus *Thanatephorus cucumeris* Dec1 (ursprünglich bezeichnet als *Geotrichum candidum* Dec1 (Sugano *et al.*, 2006)) zur Familie der DyP-ähnlichen Enzyme. Wegen ihrer Sequenzhomologien können neben MsP2 auch MsP1 aus *M. scorodonius*, eine peroxidabhängige Phenoloxidase (TAP) aus *Termitomyces albuminosus* und eine Peroxidase (PoP) aus *Polyporaceae sp.* in diese Familie eingeordnet werden (Abb. 4.5).

TAP	MQLK--NFLAATAAFVALSQPIAAYHV--KRARSSPLIVFPFGQALPTAAQVQSTASGD	56
PoP	MQLK--HFLAATAAFSAVTQSAFAYHV--KRARSSPLIGSFPQPPLPTIAEVQSSSAGN	56
DyP	MRLS--LFVVSVAVLVGSSSHVNAAKLGARQTRTTPLLTNFPQAPLPTLTQHTTESGAN	58
MsP1	MKLFASVFAAIVASHYASATAHIRAFNVKPRRTNSLLITPPQPPPLPSAQQAASASS--	58
MsP2	MRLTYLPLFAGIAIQSACAFPNFSKSSILKPRRTNSLLINPDAQPDLPQASTAAA--	58
	* * * * *	
TAP	DS-IPFENIQADILVGMKKQNEKFVFFHINNAATFKSVLKYAPANITSVATLIGPISAQ	115
PoP	DS-LPFENIQGDILVGMKKDKEKFVFFHINNATTFKSFLKYAPANITSVQTIIGPASGQ	115
DyP	DTILPLNNIQGDILVGMKKQKERFVFFQVNDATSFKTALKTYVPERITSAAILISDPSQQ	118
MsP1	SAGLNLDIQGDILIGMKNKELFFFVSVTDAATFKAKLGSIDLGLITSTDQLLANT-Q	117
MsP2	SVGLNLDIQGDILIGMKNKEMFFFVSIADAAAFKSHLGSAILPLITSTQQLLAVAS-Q	117
	* *	
TAP	PQAVNVVAFSQAGLALGVTDN-LGDTAFTGGQFADASDGLGDDTN-TWEPAFKGTNIDG	173
PoP	PQAFVNLAFSHTGFGALGVADD-LQDTAFTAGQFADAPS-FGDDTS-TWEEAFKGTNVDG	172
DyP	PLAFVNLGFSNTGLQALGITDD-LGDAQFPDQGFADAAN-LGDDLS-QWVAPFTGTTIHG	175
MsP1	PVTAVNVAFSSTGLKALGITDD-LKDPVFEAGMLSNVSDLSDPGTGNWVPGFVGTSVHG	176
MsP2	PTTAVNLAFSQTGLNALGLAAQGLGDSLFASGQFSGAQS-LGDPGTSNWVQAFAGTGIHG	176
	* *	
TAP	VFLIISDQDSIITQYQDDLQAKLGDAWTVVYDLSGAARPGDQF <b>HEHF</b> GYLDGISNPLIK	233
PoP	VFLIGSDVTTTNYRDDLKAKLGDAWTVLLDLSAARPGAEG <b>HEHF</b> GYLDGISNPTIP	232
DyP	VFLIGSDQDFLDQFTDDISSTFGSSIITQVQALSASARPGDQAG <b>HEHF</b> GFLDGISQPSVT	235
MsP1	VLLASDTIDNVNTELANIQTILNGSITIEIHRLQGAARPGDQ <b>QHEHF</b> GFMDGISNPAVD	236
MsP2	VLLASDTVDNVNAELSQIQSILGTSITIEAYRLQGEARPGDQ <b>QHEHF</b> GFMDGISNPAID	236
	* *	
TAP	GFG---EPLPGQAFIDPGIILVGRANDTVTT-RPAWALDGSFLAFRKLKQLVPEFHKYTL	289
PoP	GFG---TPFPQAVVD SGVIFAGRTNDPVTN-RPSWALDGSFLVFRKLKQLVPEFHKWTL	288
DyP	GWET--TVFPQAVVPPGIILTGRDGDGTGT--RPSWALDGSFMAFRHFQKVPEFNAYTL	291
MsP1	GFTPPAEIRPGQALIPPGIMLLGEANDTFQNDRPPWAKDGSFLVFRQMQRAPFENKFLQ	296
MsP2	GFS---TALPGQAVLSPGLFLLGEDGDGSSSRPSWAKDGSFLAFRQLQQRVPEFNKFLA	293
	* *	
TAP	DNALQ-NQSGNLSTEEGALLGSRMFGRWNSGAPIDLTPDVDDPALGNDPNRNNNFNYIH	348
PoP	DNALQ-NQAGNLTVEEGALLGSRMFGRWNSGAPIDLTPDVDDPTLGNPQRNNNFNYIH	347
DyP	ANAIPANSAGNLTQQEGAEFLGARMFGRWKSAPIDLAPTADDPALGADPQRNNNFYDS-	350
MsP1	DHALN---MPNMTSEQGADLLGARIVGRWKSAPIDLTPLVDDPVLAAQNQRNNNFDFSD	353
MsP2	DNAA-----LTQGNADLLGARMGRWKSAPVDLAPTADDVLDLANDPQRNNNFTH	345
	* *	
TAP	PGEDPATDQSRCPFTA <b>H</b> IRKTNPRDLESQNLIP <b>EFH</b> AIRAGTPYGPEVSYAESSSNTTQ	408
PoP	PGEDLTDETRCPFTA <b>H</b> VRKTNPRDLEAQGLIPDL <b>FH</b> AIRAGTPYGPEVTDAESNSNTTS	407
DyP	---DTLTDETRCPFGA <b>H</b> VRKTNPR--QDLGGPVDT <b>FH</b> AMRSSIPYGPETSDAELASGVTA	405
MsP1	A-----TNQTRCPFSA <b>H</b> IRKANPRGDLGGINKFPNQ <b>HI</b> IRAGIPYGPEVTDAEKASNSS	408
MsP2	AGFTETTDETHCPFSA <b>H</b> IRKTNPRSDFNPNQ--TNN <b>HI</b> IRAGIPYGPEVTDAEASSNTSS	403
	* *	
TAP	ID----RGLAFVEYQSNISNGFRFQQVNWANNKFPFNKSISEPLDVPVIGQDK-----	458
PoP	ID----RGLAFVEYQSVISNGFRFQQVNWANNANFPFNKSEP-LGLDVPVIGQG-----	455
DyP	QD----RGLLFVEYQSIIGNGFRFQQINWANNANFPFSKPIIT-PGIEPIIGQT-----	453
MsP1	TDPSLERGLAFVAYQSNIQNGFVFLQKNWVDNTNFFR----PGTGVDPVLIQNSRNSGTD	464
MsP2	TDASLERGLAFVAYQSNIGNGFVFIQKNWVDNANFFFG-KTTPPGIDPIIGSNAQN-NF	461
	* *	
TAP	--GANRITTLGNPLNVSESLIP-DFIVSNGGEYFFAPSITSIVETLAA	504
PoP	----TRQTFGLDPRNASDSLTIIP-QIIISNGGEYFFSPSITALVEHFGA	499
DyP	---TPRTVGGLDPLNQNETFTVP-LFVVPKGGYFFLPSISALTATIAA	498
MsP1	APNTPRVVSGLDPNNAATSTIEIDIDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIRTVLSV	513
MsP2	APNSPRVSGLDPTDSTTIVTLNTDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIQNTLSV	510
	* *	

Abb. 4.5: Vergleich der Aminosäuresequenzen einer peroxidabhängigen Phenoloxidase (TAP) aus *T. albuminosus*, einer Peroxidase (PoP) aus *Polyporaceae sp.*, einer Peroxidase (DyP) aus *T. cucumeris*; MsP1 aus *M. scorodoni* und MsP2 aus *M. scorodoni* (\*: konservierte Aminosäure; ■: an der Hämbindung beteiligter Histidinrest; ▲: an der Hämbindung beteiligter Asparaginsäurerest; rot: konservierte Histidinreste)

Die Homologie zwischen diesen Enzymen beträgt zwischen 46% (TAP – MsP2 und PoP – MsP1) und 76% (TAP – PoP). Da es sich bei DyP um eine sekretierte, eisenhaltige Peroxidase handelt, wurde sie der Klasse II der Superfamilie der Pflanzenperoxidasen zugeordnet (Sugano *et al.*, 1999). Die Klasse II enthält die extracellulären Pilzperoxidasen, zu denen unter anderem die Mangan- und Ligninperoxidasen gezählt werden (Welinder, 1992).

Die Häm-Peroxidasen der Superfamilie der Pflanzenperoxidasen verfügen über zwei konservierte Histidinreste und einen konservierten Argininrest. Während ein Histidin als axialer Ligand zum Häm dient, sollen der zweite Histidinrest und Arginin an der Ladungsstabilisierung während der Reaktion des Häms mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beteiligt sein (Bosshard *et al.*, 1984, Poulos; Kraut, 1980, Poulos *et al.*, 1993). Zunächst wurde angenommen, dass die beiden konservierten Histidinreste in DyP an den Positionen 51 und 174 (Zählung ausgehend vom nativen Protein) vorhanden seien, während der Argininrest nicht konserviert sei (Sugano *et al.*, 1999). Sowohl MsP2 als auch MsP1 enthalten an Position 175 (ausgehend vom nativen Protein) ebenfalls einen Histidinrest. Da dieser Histidinrest jedoch weder in TAP noch in PoP vorhanden ist, ist es unwahrscheinlich, dass er an der Hämbindung beteiligt ist. Keines der vier anderen Enzyme besitzt einen Histidinrest, der dem Histidin 51 in DyP entspricht. Zudem liegt dieser Histidinrest innerhalb des Exportsignals des Enzyms und geht somit bei der Prozessierung des Proteins verloren (Sugano *et al.*, 2000). Alle fünf Enzyme verfügen jedoch über vier konservierte Histidinreste (Abb. 4.5). Durch Röntgenstrukturanalyse eines heterolog in *Aspergillus oryzae* exprimierten, deglykosidierten und kristallisierten DyPs wurde gezeigt, dass das Histidin an Position 164 und die Asparaginsäure an Position 278 (Zählung jeweils ausgehend vom reifen Protein) an der Hämbindung beteiligt sind (Sato *et al.*, 2004). Durch „site-directed mutagenesis“-Versuche konnte die Rolle des Histidins 164 bestätigt werden, während der Histidinrest 166 keinen Einfluss auf die Hämbindung und somit auf die Enzymaktivität hatte (Sugano *et al.*, 2004). Sowohl in MsP2 als auch in den anderen DyP-ähnlichen Enzymen sind der Histidinrest und der Asparaginsäurerest, die Histidin 164 bzw. Asparaginsäure 278 in DyP entsprechen, konserviert. Da die Enzyme in den entsprechenden

Regionen große Homologien zu DyP aufweisen, ist davon auszugehen, dass diese Aminosäurereste auch in den anderen Enzymen der DyP-Familie an der Hämbindung beteiligt sind. Genauere Auskunft darüber und über weitere, an der Hämbindung beteiligte, Aminosäurereste kann durch Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse von MsP2 gewonnen werden.

Die MALDI-TOF-Analyse von MsP2 ergab ein Molekulargewicht von 52,4 kDa (Scheibner, 2006). Das reife Protein hat, ausgehend von der übersetzten Aminosäuresequenz von MsP2, hingegen ein berechnetes Molekulargewicht von 48 kDa (3.6.3). Diese Differenz in den Molekulargewichten ist wahrscheinlich auf eine Glykosidierung des Proteins von ca. 8% zurückzuführen. So enthält das reife Enzym MsP2 vier potentielle N- und drei potentielle O-Glykosidierungsstellen (Abb. 3.36).

MsP1 und TAP enthalten jeweils acht potentielle N-Glykosidierungsstellen und eine potentielle O-Glykosidierungsstelle (Scheibner, 2006, Johjima *et al.*, 2003) während DyP drei potentielle N-Glykosidierungs- und mehrere potentielle O-Glykosidierungsstellen enthält (Sugano *et al.*, 1999). Für PoP wurden mittels NetNGly 1.0 (Gupta *et al.*, 2004) und NetOGly 3.1 (Julenius *et al.*, 2005) acht potentielle N-Glykosidierungsstellen und eine potentielle O-Glykosidierungsstelle ermittelt. Die Kohlenhydratanteile werden mit ca. 23% für MsP1 und 17% für DyP angegeben (Scheibner, 2006, Sugano *et al.*, 1999) Für TAP lässt sich aus dem berechneten Molekulargewicht für das reife Protein von 48,6 kDa und den mittels SDS-Page und GFC ermittelten Molekulargewichten von 67 bzw. 57 kDa (Johjima *et al.*, 2003) ein Glykosidierungsgrad von 27 bzw. 15% errechnen. MsP2 enthält mit 8% somit deutlich weniger Saccharide als die anderen DyP-ähnlichen Enzyme. Der Glykosidierungsgrad scheint allerdings keinen Einfluss auf die Enzymaktivität zu besitzen. So wurde für DyP gezeigt, dass die Enzymaktivität unabhängig vom Glykosidierungsgrad des Proteins ist (Sugano *et al.*, 2000, Sugano *et al.*, 2004). Da keine der potentiellen N-Glykosidierungsstellen in allen fünf Enzymen vorhanden ist, ist davon auszugehen, dass die Glykosidierung für die katalytische Aktivität der DyP-ähnlichen Enzyme nicht essentiell ist. Auch bei einer Manganperoxidase (MnPH4) und zwei Ligninperoxidasen (LiPH2 und LiPH8) aus *P. chrysosporium*

und diversen anderen Enzymen hat die Glykosidierung keinen Effekt auf die Enzymaktivität (Nie *et al.*, 1999, Lis; Sharon, 1993). Allerdings scheint insbesondere die O-Glykosidierung einen Einfluss auf die Thermostabilität von Enzymen zu haben (Lis; Sharon, 1993, Nie *et al.*, 1999). Auch für DyP wurde beschrieben, dass eine geringere Glykosidierung zu einer Abnahme der Thermostabilität führt (Sugano *et al.*, 2000, Sugano *et al.*, 2004). Im Allgemeinen ist die Glykosidierung charakteristisch für sekretierte Proteine (Lis; Sharon, 1993); sie schützt vor proteolytischem Verdau, erhöht die Stabilität und die Wasserlöslichkeit (Lis; Sharon, 1993, Rehm, 2002).

MsP2 besitzt vor dem N-Terminus des reifen Proteins keine typische Schnittstelle für eine Signalpeptidase. Lediglich zwischen den Aminosäuren 19 und 20 wurde mittels SignalP 3.0 (Bendtsen *et al.*, 2004) eine potentielle Schnittstelle ermittelt. Von MsP1 und DyP ist ähnliches bekannt (Scheibner, 2006, Sugano *et al.*, 1999, Sugano *et al.*, 2000).

Möglicherweise erfolgen bei der Bildung der nativen Enzyme zwei Prozessierungsschritte. Nach der Expression von DyP in *Aspergillus oryzae* fanden Sugano *et al.* (1999), dass das rekombinante Enzym denselben N-Terminus besaß wie das native Enzym. Da *A. oryzae* und *T. cucumeris* verschiedenen Gattungen angehören, folgerten die Autoren, dass der zweite Prozessierungsschritt nicht durch eine Signalpeptidase, sondern durch das Enzym selbst erfolgt. Für diese Hypothese gibt es bisher keinen experimentellen Beleg. Da eine Vielzahl an Signalpeptiden existieren, die sich in ihrer Länge und ihrer Struktur unterscheiden (Kreil, 1981), wäre es auch denkbar, dass die DyP-ähnlichen Enzyme eine bislang unbekannte, pilzspezifische Peptidaseschnittstelle enthalten.

#### **4.3.6 Die Intron-Exon Organisation von MsP1 und MsP2**

Der Vergleich der cDNA-Sequenzen von MsP1 und MsP2 mit den entsprechenden Sequenzen aus genomischer DNA ergab, dass die Gene jeweils durch 10 Introns unterbrochen sind (Abb. 3.37 und Abb. 3.38). Für die anderen Mitglieder der Familie der DyP-ähnlichen Enzyme sind keine

Sequenzen aus der genomischen DNA verfügbar, sondern lediglich für andere Vertreter der Klasse II der Superfamilie der Pflanzenperoxidasen. So enthält das Gen einer Manganperoxidase aus *Agaricus bisporus* 14 Introns (Lankinen *et al.*, 2005). Die Intron-Exon Struktur dieses Gens gleicht der einer Manganperoxidase (MnP1) aus *P. ostreatus* und einer polyvalenten Peroxidase (VPL2) aus *P. eryngii*, die beide 15 Introns enthalten (Asada *et al.*, 1995, Ruiz-Duenas *et al.*, 1999). Die Gene LPGIII und LPGIV, die für Ligninperoxidasen aus *T. versicolor* codieren, enthalten hingegen nur jeweils 6 Introns, während das Gen einer Manganperoxidase (MPGI) aus demselben Organismus durch 5 Introns unterbrochen wird (Johansson; Nyman, 1993).

Die Intron-Exon Struktur in MsP1 und MsP2 ist sehr ähnlich (Abb. 4.6). Die Lage der Introns 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 10 innerhalb des Gens von MsP2 ist mit der Lage der Introns 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 und 10 innerhalb des Gens von MsP1 nahezu identisch.

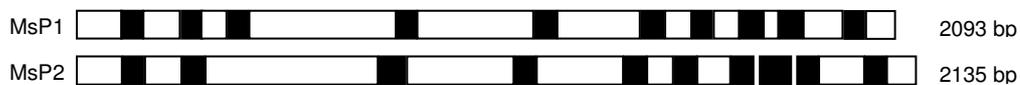


Abb. 4.6: Vergleich der Intron-Exon Struktur von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodonium* (■: Introns; □: Exons)

Die Introns aus MsP1 und MsP2 sind zwischen 50 und 83 Nukleotide lang (3.6.4 und 3.6.5). Der Vergleich der Intronlängen von Wirbeltieren, Insekten, Pflanzen und Pilzen ergab, dass Pilze mit einer durchschnittlichen Länge von 86 Nukleotiden die kürzesten Introns besitzen, von denen mehr als die Hälfte kürzer als 100 Nukleotide ist (Hawkins, 1988). Die Introns des Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* sind im Mittel 69 Nukleotide lang, wobei viele eine Länge zwischen 50 und 70 Nukleotiden besitzen (Kupfer *et al.*, 2004).

Alle Introns aus MsP1 und MsP2 sind an ihrem 5'-Ende durch ein GT-Dinukleotid und an ihrem 3'-Ende durch ein AG-Dinukleotid flankiert (Abb. 3.37 und 3.38). 98-99,9% der Introns aus den Pilzen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa* und

*C. neoformans* sind ebenfalls nach dem 5'GT...AG3'-Prinzip aufgebaut (Kupfer *et al.*, 2004).

Bei der Gensequenz von MsP2 fällt auf, dass zwei der Exons nur aus 4 Nukleotiden bestehen (Abb. 3.37). Das kürzeste Exon aus *C. neoformans* wird mit einer Länge von 7 Nukleotiden angegeben, wobei die durchschnittliche Länge 207 Nukleotide beträgt (Kupfer *et al.*, 2004).

### 4.3.7 Isoenzyme von MsP1 und MsP2

Bei der Amplifizierung der Gesamtsequenzen wurden für MsP1 drei und für MsP2 zwei Sequenzen erhalten, deren übersetzte Aminosäuresequenzen sich von den zusammengesetzten Sequenzen von MsP1 (Scheibner, 2006) und MsP2 (3.6.3) unterscheiden (Abb. 4.7).

```

MsP1      -MKLFSASVFAAIVASHYASATAHIRAPNVKPRRTNSLLITPPQQPPLPSAQQQAASASS 59
MsP1.1    -MKLFSASVFAAIVASHYASATAHIRAPNVKPRRTNSLLITPPQQPPLPSAQQQAASASS 59
MsP1.3    -MKLFSASVFAAIVASHYASATAHIRAPNVKPRRTNSLLITPPQQPPLPSAQQQAASASS 59
MsP1.2    -MKLFSASVFAAIVASHYVSGTTHIRAPNVKPRRTNSLLITPPQQPPLPSAQQQAASASS 59
MsP2.1    SMRLTYLPLFAGIAIQSACAFPNSKSSILKPRRTNSLLINPDAQPDLP TAKQASTAAAS 60
MsP2.4    SMRLTYLPLFAGIAIQSACAFPNSKSSILKPRRTNSLLINPDAQPDLP TAKQASTAAAS 60
MsP2      -MRLTYLPLFAGIAIQSACAFPNSKSSILKPRRTNSLLINPDAQPDLP TAKQASTAAAS 59
          *:* .:*.*. . : . . :. :*****.* ** **:*:*:*:*:*:*

MsP1      AGLNLTDIQGDILIGMKNKELFFFSVTDAAATFKAKLGS DILGLITSTDQLLANDTQPV 119
MsP1.1    AGLNLTDIQGDILIGMKNKELFFFSVTDAAATFKAKLGS DILGLITSTDQLLANDTQPV 119
MsP1.3    AGLNLTDIQGDILIGMKNKELFFFSVTDAAATFKAKLGS DILGLITSTDQLLANDTQPV 119
MsP1.2    AGLNLTDIQGDILIGMKNKELFFFSITDAAATFKAKLGS DILELITSTNQLLAVATQPI 119
MsP2.1    VGLNLTDIQGDILIGMKNKEMFFFSIADAAAFKSHLGSAILPLITSTQQLLAVASQPT 120
MsP2.4    VGLNLTDIQGDILIGMKNKEMFFFSIADAAAFKSHLGSAILPLIASTQQLLAVASQPT 120
MsP2      VGLNLTDIQGDILIGMKNKEMFFFSIADAAAFKSHLGSAILPLITSTQQLLAVASQPT 119
          .*****:*****:***:*:*:* ** **:*:*:*:*:*

MsP1      TAVNVAFSSTGLKALGITDD-LKDPVFEAGMLSNVSDLSDPGTGNWVPGFVGT SVHG VF 178
MsP1.1    TAVNVAFSSTGLKALGITDG-LKDPVFEAGMLSNVSDLSDPGTGNWVPGFVGT SVHG VF 178
MsP1.3    TAVNVTFSSSTGLKALGITDD-LKDPVFEAGMLSNVSDLSDPGTGNWVPGFVGT SVHG VF 178
MsP1.2    TAVNLAFSSTGLKALGVKDD-LNDTVFDAGMLSNVSDLSDPGTGNWVPGFVGT AVHG VF 178
MsP2.1    TAVNLAFSQTGLNALGLAAQGLGDSLFASGQFSGAQS-LGDPGTSNWVQAFAGTGIHG VF 179
MsP2.4    TAVNLAFSQTGLNALGLAAQGLGDSLFASGQFSGAQS-LGDPGTSNWVQAFAGTGIHG VF 179
MsP2      TAVNLAFSQTGLNALGLAAQGLGDSLFASGQFSGAQS-LGDPGTSNWVQAFAGTGIHG VF 178
          ***:*:*.*:*:*:* * *:*:* * :*.* * *.*.*.*.*.*.*.*.*.*:*:*

MsP1      LLASDTIDNVNTELANIQITILNGSITEIHR LQGEARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAVDGF 238
MsP1.1    LLASDTIDNVNTEPANIQTILNGSITEIHR LQGEARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAVDGF 238
MsP1.3    LLASDTIDNVNTELANIQITISNGSITEIHR LQGEARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAVDGF 238
MsP1.2    LLASDTLDNVNAELANIQTILNGSITEIHR LQGEARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAIDGF 238
MsP2.1    LLASDTV DNVNAELS QISILGTSITEAYRLQGEARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAIDGF 239
MsP2.4    LLASDTV DNVNAELS QISILGTSITEAYRLQGEARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAIDGF 239
MsP2      LLASDTV DNVNAELS QISILGTSITEAYRLQGEARPGDQQGHEHFGFMDGISNPAIDGF 238
          *****:*:*:*:* ::*:* * . **** :**** *****:*****:***

```

```

MsP1      TPPAEIRPGQALIPPGIMLLGEANDTFQNDRPPWAKDGSFLVFRMQQRAPEFNKFLQDH 298
MsP1.1    TPPAEIRPGQALIPPGIMLLGEANDTFQNDRPPWAKDGSFLVFRMQQRAPEFNKFLQDH 298
MsP1.3    TPPAEIRPGQALIPPGIMLLGEANDTFQNDRPPWAKDGSFLVFRMQQRAPEFNKFLQDH 298
MsP1.2    S---TRLPQQALLPPGLMFLGEANDTVS--RPPWAKDGSFLVFRMQQRVPEFDKFLQDH 293
MsP2.1    S---TALPGQAVLSPGLFLLGEDGDGSSSSRPSWAKDGSFLAFRQLQQRVPEFNKFLADN 296
MsP2.4    S---TALPGQAVLSPGLFLLGEDGDGSSSSRPSWAKDGSFLAFRQLQQRVPEFNKFLADN 296
MsP2      S---TALPGQAVLSPGLFLLGEDGDGSSSSRPSWAKDGSFLAFRQLQQRVPEFNKFLADN 295
          :      ****::**::***.*.  **.******.***:***.***:*** *:

MsP1      ALNMPNMTSEQGADLLGARIVGRWKS GAP IDLTPLVDDPVLAAQNRRNNNFDFSDA---- 354
MsP1.1    ALNMPNMTSEQGADLLGARIVGRWKS GAP IDLTPLVDDPVLAAQNRRNNNFDFSDA---- 354
MsP1.3    ALNMPNMTSEQGADLLGARIVGRWKS GAP IDLTPLVDDPVLAAQNRRNNNFDFSDA---- 354
MsP1.2    ALNMPNMTSEQGAELLSRVMVGRWKS GAP IDLTPLVDDPELAADPQRNNNFDFSDA---- 349
MsP2.1    AA-----LTQGNADLLGARMGRWKS GAPVDLAP TADDVDLANDPQRNNNFNFTHAGFTE 351
MsP2.4    AA-----LTQGNADLLGARMGRWKS GAPVDLAP TADDVDLANDPQRNNNFNFTHAGFTE 351
MsP2      AA-----LTQGNADLLGARMGRWKS GAPVDLAP TADDVDLANDPQRNNNFNFTHAGFTE 350
          *      ::.*:***:*:*****:***.* ** ** * *****:*: *

MsP1      -TNQTRCPFSAHIRKANPRGDLGGINKFPNQHIIRAGIPYGPEVTDAEKASNSSSTDPSSL 413
MsP1.1    -TNQTRCPFSAHIRKANPRGDLGGINKFPNQHIIRAGIPYGPEVTDAEKASNSSSTDPSSL 413
MsP1.3    -TNQTRCPFSAHIRKANPRGDLGGINKFPNQHIIRAGIPYGPEVTDAEKASNSSSTDPSSL 413
MsP1.2    -TNQTRCPFSAHIRKTNPRADLGGIDNFPTRHIIRAGIPYGPEVTDAEKASNSSSTDPSSL 408
MsP2.1    TTDETHCPFSAHIRKTNPRSDFNPNQ--TNNHIIRAGIPYGPEVTDAEASNTSSTDASL 409
MsP2.4    TTDETHCPFSAHIRKTNPRSDFNPNQ--TNNHIIRAGIPYGPEVTDAEASNTSSTDASL 409
MsP2      TTDETHCPFSAHIRKTNPRSDFNPNQ--TNNHIIRAGIPYGPEVTDAEASNTSSTDASL 408
          *:***:*****:***.*:.. : ..*****:***:***:***.***

MsP1      ERGLAFVAYQSNIQNGFVFLQKNWVDNTNFFR---PGTGVDPLIGTNSRNSGTDAPNTPR 470
MsP1.1    ERGLAFVAYQSNIQNGFVFLQKNWVDNTNFFR---PGTGADPLIGTNSRNSGTDAPNTPR 470
MsP1.3    ERGLAFVAYQSNIQNGFVFLQKNWVDNTNFFR---PGTGVDPLIGTNSRNSGTDAPNTPR 470
MsP1.2    ERGLAFVAYQSNIKNAFVFLQQTWVDNANFFR---TNTGADPIIGTLSNKNG-NLPNTPR 464
MsP2.1    ERGLAFVAYQSNIQNGFAFLQQAQWVDNANFFFGKTTPPGVDPIIGSVAAQNN-FAPNGPR 468
MsP2.4    ERGLAFVAYQSNIQNGFAFLQQAQWVDNANFFFGKTTPPGVDPIIGSVAAQNN-FAPNGPR 468
MsP2      ERGLAFVAYQSNIQNGFAFLQQAQWVDNANFFFGKTTPPGIDPIIGSNAQNN-FAPNSPR 467
          *****.*.*.*:***:***.  .* ***:***: : :.. ** **

MsP1      VVSGLDPNMAT-STIEIDIDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIRTVLSV 513
MsP1.1    VVSGLDPNMAT-STIEIDIDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIRTVLSV 513
MsP1.3    VVSGLDPNMAT-STIEIDIDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIRTVLSV 513
MsP1.2    VVSGLDPNMTGPPTEIDDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIRTVLSV 508
MsP2.1    PVSGLDPTDST-KIVTINTDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIQNTLSV 511
MsP2.4    PVSGLDPTDST-KIVTINTDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIQNTLSV 511
MsP2      PVSGLDPTDST-TIVTLNTDFVVSRRGGEYFFSPSLSAIQNTLSV 510
          *****:.*      : : *** *****:***:***:***

```

Abb. 4.7: Vergleich der Aminosäuresequenzen der Isoenzyme von MsP1 und MsP2 aus *M. scorodonius*

(MsP1 und MsP2: zusammengesetzte Sequenz (Scheibner, 2006 und 3.6.3); MsP1.1, MsP1.2, MsP1.3, MsP2.1 und MsP2.4: Isoenzyme von MsP1 bzw. MsP2)

Die Homologie zwischen den Isoenzymen MsP1, MsP1.1 und MsP1.3 und den Isoenzymen MsP2, MsP2.1 und MsP2.4 ist jeweils größer 98%. Zwischen MsP1.2 und den anderen Isoenzymen von MsP1 besteht hingegen nur eine Homologie von 87%. Es wäre daher möglich, dass es sich bei MsP1.2 nicht um ein Isoenzym von MsP1, sondern um einen weiteren Vertreter der Familie der DyP-ähnlichen Familie handelt.

Die Existenz von Isoenzymen erklärt die von Scheibner (2006) gemachte Beobachtung, dass sich sowohl bei MsP1 als auch bei MsP2 auf dem IEF-Gel

mehrere Banden zeigten, obwohl die Enzyme auf dem SDS-Gel als homogene Bande erschienen. Kim und Shoda (1999) vermuteten, dass auch von DyP aus *T. cucumeris* mehrere Isoenzyme existieren, da bei der Reinigung an Butyl Toyopearl (hydrophobe Interaktionschromatographie) neben den DyP-haltigen Fraktionen noch weitere Fraktionen mit Enzymaktivität erhalten wurden.

#### 4.4 MsP1 (rekombinant) aus *Aspergillus niger*

Das in *A. niger* überexprimierte Enzym MsP1 hat ein mittels SDS-Page ermitteltes Molekulargewicht von 71 kDa (3.7.1). Es ist damit etwas kleiner als das native Enzym MsP1, dessen Molekulargewicht 75 kDa beträgt (Scheibner, 2006). Der Unterschied in den Molekulargewichten ist wahrscheinlich auf einen unterschiedlichen Glykosidierungsgrad der beiden Enzyme zurückzuführen. So wurden auch für die Peroxidase DyP aus *T. cucumeris* und das heterolog in *A. oryzae* exprimierte rDyP leicht unterschiedliche Molekulargewichte von 60 bzw. 58 kDa ermittelt, die sich aus einem unterschiedlichen Glykosidierungsgrad und aus Unterschieden in der Struktur der Zuckerketten zwischen DyP und rDyP ergeben (Sugano *et al.*, 2000).

Das rekombinante MsP1 zeigt ein Absorptionsmaximum bei 406 nm (3.7.3). Die Absorptionsmaxima von nativem MsP1 und nativem MsP2 liegen bei 403 bzw. 405 nm (Hardebusch, 2006, Scheibner, 2006). Das Vorhandensein dieser sogenannten Soret-Bande im rekombinanten MsP1 zeigt, dass das Enzym, wie die nativen Enzyme aus *M. scorodoni*, eine Hämgruppe enthält. Bei der Expression von rDyP in *A. oryzae* wurde die gleiche Beobachtung gemacht (Sugano *et al.*, 2000). Somit kann vermutet werden, dass es neben der bereits bekannten Hämbinderegion der Pflanzenperoxidasesuperfamilie noch eine weitere, neuartige Hämbinderegion gibt (Sugano *et al.*, 2000). Diese scheint nicht nur für die Basidiomyceten *T. cucumeris*, *T. albuminosus*, *Polyporaceae* sp. und *M. scorodoni*, die alle DyP-ähnliche Enzyme produzieren, spezifisch zu sein.

Das Enzym MsP1 aus *M. scorodoni* liegt im nativen Zustand als Dimer mit einem Molekulargewicht von 150 kDa vor (Scheibner, 2006). Für das rekombinante Enzym MsP1 wurde das native Molekulargewicht mittels GFC nicht exakt ermittelt, jedoch eluiert das Enzym von der präparativen Superdex-Säule nach 51 min 38 sec (Abb. 3.44) und damit zwischen MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni*, die nach 49 min 10 sec bzw. 52 min 29 sec von der präparativen Superdex-Säule eluieren (Abb. 3.31). Ausgehend von den Retentionszeiten für MsP1 und MsP2 und ihren nativen Molekulargewichten von 150 bzw. 120 kDa (Scheibner, 2006), lässt sich für das rekombinante MsP1 ein natives Molekulargewicht von 130 kDa abschätzen. Da dies etwa das Doppelte des Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen ist, liegt die Vermutung nahe, dass auch das rekombinante Enzym als Dimer vorliegt. Genauen Aufschluss darüber kann eine Bestimmung des Molekulargewichtes des nativen Enzyms mittels GFC geben.

Die Enzyme MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* vermögen auch in isolierter Form  $\beta,\beta$ -Carotin abzubauen (3.4.7, Scheibner, 2006), wobei die Enzymaktivität durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  gesteigert werden konnte (3.4.6, Scheibner, 2006, Hardebusch, 2006). Das in *A. niger* überexprimierte Enzym MsP1 zeigte ohne Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  keinerlei Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (20 mM) wurde jedoch eine Enzymaktivität von etwa  $400 \text{ mU mL}^{-1}$  ermittelt (3.7.2). Eine Variation der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Zugabe zeigte, dass kein  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau durch das rekombinante MsP1 mehr stattfindet, sobald das zugesetzte  $\text{H}_2\text{O}_2$  verbraucht ist (Abb. 3.43).

Es bleibt zu klären, warum die nativen Enzyme MsP1 und MsP2  $\beta,\beta$ -Carotin auch in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  abbauen können, während es für das rekombinante Enzym essentiell ist. Meerrettichperoxidase ist in der Lage, Epinephrin auch in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff zu oxidieren (Adak *et al.*, 1998). Dabei soll das  $\text{Fe}^{3+}$  des Häms zunächst in einer Oxidasereaktion zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert werden. Das  $\text{Fe}^{2+}$  reagiert mit molekularem Sauerstoff zu Verbindung III (vgl. Abb. 4.2), die ihrerseits unter Bildung von  $\text{O}_2^-$  wieder zum nativen Enzym wird.  $\text{O}_2^-$  reagiert mit dem, während

der Oxidasereaktion erzeugten Substratradikal, zu  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dieses kann von der Meerrettichperoxidase in der üblichen Peroxidase-reaktion umgesetzt werden.

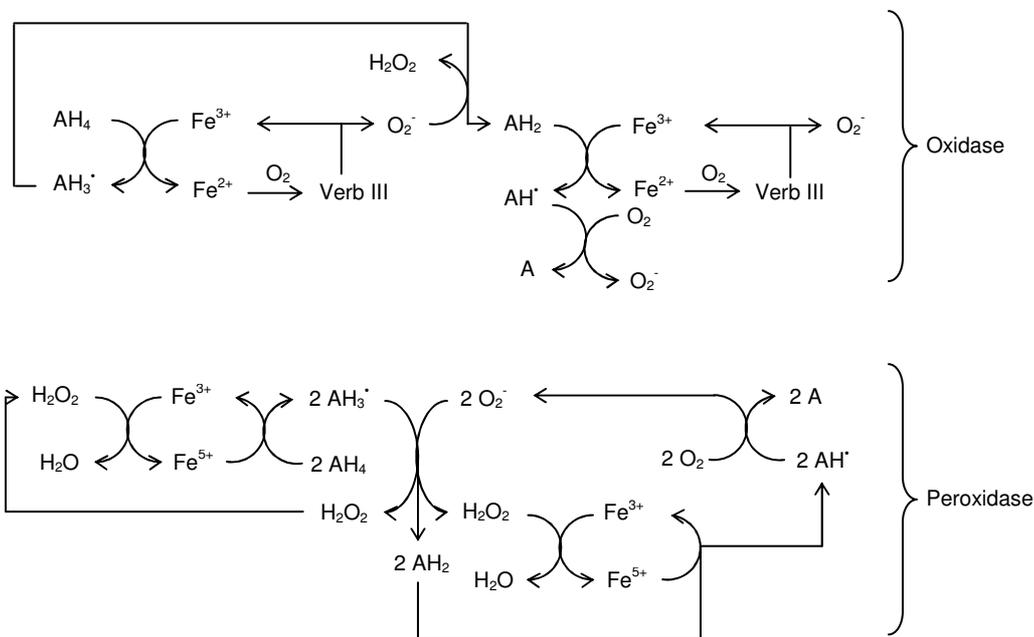


Abb. 4.8: Postulierter Mechanismus der Oxidation von Epinephrin durch Meerrettichperoxidase (Adak *et al.*, 1998, modifiziert)  
 ( $\text{Fe}^{3+}$ : natives Enzym;  $\text{Fe}^{2+}$ :  $\text{Fe}^{2+}$ -Form des Häms;  $\text{Fe}^{5+}$ : Verbindung I und II; Verb III: Verbindung III;  $\text{AH}_4$ : Epinephrin;  $\text{AH}_3\cdot$ : Epinephrin *o*-Semichinon Radikal;  $\text{AH}_2$ : Leucoadrenochrom;  $\text{AH}\cdot$ : Leucoadrenochrom *o*-Semichinon Radikal; A: Adrenochrom)

Die Fähigkeit der Meerrettichperoxidase, Epinephrin durch molekularen Sauerstoff zu oxidieren, wird auf das niedrige Standardpotential von Epinephrin zurückgeführt (Adak *et al.*, 1998). Dieses beträgt nur etwa 150-300 mV (gegen NWE) im Vergleich zu Phenolen (z.B. Guajacol oder *p*-Cresol), deren Standardpotential bei etwa 900 mV (gegen NWE) liegt und die durch Meerrettichperoxidase nur unter Zusatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidiert werden können (Adak *et al.*, 1998, Hauser; Olsen, 1998). Möglicherweise funktioniert der Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin durch die nativen Enzyme MsP1 und MsP2 ähnlich wie für die Oxidation von Epinephrin durch Meerrettichperoxidase beschrieben. Allerdings ist das Standardpotential für eine Ein-Elektronen-Oxidation von  $\beta,\beta$ -Carotin ( $\text{Carotin} \rightarrow \text{Carotin}^{+\cdot} + e^-$  und  $\text{Carotin}^{+\cdot} \rightarrow \text{Carotin}^{2+} + e^-$ ) mit 650-780 mV (gegen NWE) (Martin *et al.*, 1999, Jeevarajan; Kispert, 1996) deutlich höher als das von

Epinephrin. Es ist daher fraglich, ob durch die Reduktion des  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  im Häm von MsP1 und MsP2  $\beta,\beta$ -Carotin oxidiert werden kann. Falls der  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbau durch MsP1 und MsP2 in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch eine Oxidasereaktion stattfindet, bliebe zu klären, warum das rekombinante Enzym nicht zu dieser Reaktion in der Lage ist. Untersuchungen der Reaktionsmechanismen sowohl der nativen Enzyme als auch des rekombinanten Enzyms sind zu Klärung dieser Frage erforderlich. Die Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse der Enzyme könnte Aufschluss darüber geben, ob Unterschiede in der Faltung oder in der Hämbindung für die unterschiedlichen Reaktionsweisen von nativem und rekombinantem Enzym in Betracht kommen.

#### 4.5 Ausblick

Aus *T. suaveolens* wurden  $\beta,\beta$ -Carotin-abbauende Enzyme isoliert und charakterisiert. Für diese Enzyme sollten die cDNA-Sequenzen und die Sequenzen aus genomischer DNA ermittelt werden, um sie in die Klasse II der Superfamilie der Pflanzenperoxidase besser einordnen zu können. Um Informationen über den Reaktionsmechanismus zu erlangen, sollte die Produktbildung während des  $\beta,\beta$ -Carotin-Abbaus untersucht werden. Auch könnte ermittelt werden, ob weitere Carotinoide, wie z.B. Lutein, Capsanthin, Bixin, Lycopin und Zeaxanthin, und andere Substrate (z.B. Veratrylalkohol, ABTS und  $\text{Mn}^{2+}$ ) mit den Enzymen aus *T. suaveolens* umgesetzt werden können.

Durch die Expression in *A. niger* steht MsP1 in ausreichenden Umfang für weitere Untersuchungen zur Verfügung. So kann die Bildung von Aromastoffen durch den enzymatischen Abbau von  $\beta,\beta$ -Carotin optimiert werden. Außerdem kann ermittelt werden, in welchem Umfang MsP1 auch andere Substrate umzusetzen vermag.

Sowohl MsP1 und MsP2 aus *M. scorodoni* als auch das rekombinante MsP1 aus *A. niger* sollten kristallisiert werden. Röntgenstrukturanalysen mit dem

---

nativen und dem rekombinanten MsP1 könnten Aufschluss darüber geben, warum sich die Enzyme in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  unterschiedlich verhalten. Zusätzlich könnten Erkenntnisse über die Bindung des Häms in den Enzymen gewonnen werden.



## 5 Literatur

- Adak, S.; Bandyopadhyay, U.; Bandyopadhyay, D.; Banerjee, R. K.** (1998) Mechanism of Horseradish Peroxidase Catalyzed Epiniphrin Oxidation: Obligatory Role of Endogenous  $O_2^-$  and  $H_2O_2$ . *Biochemistry* **37**, 16922–16933.
- Ainsworth, G. C.; Sparrow, F. K.; Sussman, A. S.** (1973) A Taxonomic Review with Keys: Basidiomycetes and Lower Fungi. In: Ainsworth, G. C.; Sparrow, Frederick K.; Sussman, Alfred S. (Hg.): The Fungi, an advanced treatise. Orlando, Florida, London, Academic Press, Bd. 4B
- Asada, Y.; Watanabe, A.; Irie, T.; Nakayama, T.; Kuwahara, M.** (1995) Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1251**, 205–209.
- Baldrian, P.; in der Wische, C.; Gabriel, J.; Nerud, F.; Zadrazil, F.** (2000) Influence of Cadmium and Mercury on Activities of Ligninolytic Enzymes and Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2471–2478.
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.** (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5., vollständig überarbeitete Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hongkong.
- Ben Aziz, A.; Grossmann, S.; Ascarelli, I.; Budowski, P.** (1971) Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry* **10**, 1445–1452.
- Bendtsen, J. D.; Nielsen, H.; von Heijne, G.; Brunak, S.** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783–795.
- Birkinshaw, J. H.; Bracken, A.; Findlay, W. P. K.** (1944) Biochemistry of the Wood-rotting Fungi. *Biochem. J.* **38**, 131–132.

- Black, A. K.; Reddy, C. A.** (1991) Cloning and characterization of a lignin peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 428–435.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J.** (1987) Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99.
- Bosshard, H. R.; Bänziger, J.; Hasler, T.; Poulos, T. L.** (1984) The Cytochrome c Peroxidase-Cytochrome c Electron Transfer Complex. *J. Biol. Chem.* **259**, 5683–5690.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H.** (1998) Carotenoids. Volume 3: Biosynthesis and metabolism. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Brown, J. A.; Alic, M.; Gold, M. H.** (1991) Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. *J. Bacteriol.* **173**, 4101–4106.
- Collins, P. J.; O'Brien, M. M.; Dobson, A. D. W.** (1999) Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Novel Extracellular Peroxidase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1343–1347.
- Eriksson, K.-E.; Blanchette, R. A.; Ander, P.** (1990) Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hongkong.
- Gélinas, P.; Poitras E; McKinnon, C. M.; Morin, A.** (1998) Oxido-Reductases and Lipases as Dough-Bleaching Agents. *Cereal Chem.* **75**, 810–814.
- Gettemy, J. M.; Li, D.; Alic, M.; Gold, M. H.** (1997) Truncated-gene reporter system for studying the regulation of manganese peroxidase expression. *Curr. Genet.* **31**, 519–524.
- Gettemy, J. M.; Ma, B.; Alic, M.; Gold, M. H.** (1998) Reverse Transcription-PCR Analysis of the Regulation of the Manganese Peroxidase Gene Family. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 569–574.

**Gold, M. H.; Alic, M.** (1993) Molecular Biology of the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* **57**, 605–622.

**Gold, M. H.; Wariishi, H.; Valli, K.** (1989) Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. In: Whitaker, J. R.; Sonnet, P. E. (Hg.): Biocatalysis in Agricultural Biotechnology. ACS symposium series 389, American Chemical Society, Washington DC, 127–140.

**Gold, M. H.; Youngs, H. L.; Sollewijn Gelpke, M. D.** (2000) Manganese Peroxidase. In: Sigel, Astrid; Sigel, Helmut (Hg.): Manganese and its role in biological processes. New York, Basel, Marcel Dekker, Inc. (Metal ions in biological processes) 559–586.

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

**Hardebusch, B.** (2006) Terpenbiotransformation durch Enzyme aus Basidio- und Ascomyceten. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.

**Hauser, M. J. B.; Olsen, L. F.** (1998) The Role of Naturally Occurring Phenols in Inducing Oscillations in the Peroxidase-Oxidase Reaction. *Biochemistry* **37**, 2458–2469.

**Hawkins, J. D.** (1988) A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res.* **16**, 9893–9908.

**Heinfling, A.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T.; Bergbauer, M.; Szewzyk, U.** (1998) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 43–50.

**Higuchi, T.** (1997) Biochemistry and molecular biology of wood. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hongkong.

**Jahn, H.** (1963) Mitteleuropäische Porlinge (*Polyporaceae* s. lato) und ihr Vorkommen in Westfalen. Herausgegeben von der Pilzkundlichen Arbeitsgemeinschaft in Westfalen, Heiligenkirchen/Detmold.

**Jeevarajan, J. A.; Kispert, L. D.** (1996) Electrochemical oxidation of carotenoids containing donor / acceptor substituents. *J. Electroanal. Chem.* **411**, 57–66.

**Jensen Jr, K. A.; Bao, W.; Kawai, S.; Srebotnik, E.; Hammel, K. E.** (1996) Manganese-Dependent Cleavage of Nonphenolic Lignin Structures by *Ceriporiopsis subvermispota* in the Absence of Lignin Peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3679–3686.

**Johansson, M.-B.** (1995) The chemical composition of needle and leaf litter from Scots pine, Norway spruce and white birch in Scandinavian forests. *Forestry* **68**, 49–62.

**Johansson, T.; Nyman, P. O.** (1993) Isozymes of Lignin Peroxidase and Manganese(II) Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Trametes versicolor*: I. Isolation of Enzyme Forms and Characterization of Physical and Catalytic Properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 49–56.

**Johansson, T.; Nyman, P. O.; Cullen, D.** (2002) Differential Regulation of *mnp2*, a New Manganese Peroxidase-Encoding Gene from the Ligninolytic Fungus *Trametes versicolor* PRL 572. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2077–2080.

**Johansson, T.; Welinder, K. G.; Nyman, P. O.** (1993) Isozymes of Lignin Peroxidase and Manganese(II) Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Trametes versicolor*: II. Partial Sequences, Peptide Maps, and Amino Acid and Carbohydrate Composition. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 57–62.

**Johjima, T.; Ohkuma, M.; Kudo, T.** (2003) Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxide-dependent phenol oxidase from the basidiomycete *Termitomyces albuminosus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 220–225.

**Jönsson, L.; Becker, H. G.; Nyman, P. O.** (1994) A novel type of peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 255–259.

**Jönsson, L.; Nyman, P. O.** (1992) Characterization of a lignin-peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Biochimie* **74**, 177–182.

- Julenius, K.; Molgaard, A.; Gupta, R.; Brunak, S.** (2005) Prediction, conservation analysis and structural characterization of mammalian mucin-type-O-glycosylation sites. *Glycobiology* **15**, 153–164.
- Kamitsuji, H.; Honda, Y.; Watanabe, T.; Kuwahara, M.** (2004) Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 287–294.
- Kim, S. J.; Shoda, M.** (1998) Decolorization of molasses by a new isolate of *Geotrichum candidum* in a jar fermenter. *Biotechnol. Tech.* **12**, 497–499.
- Kim, S. J.; Shoda, M.** (1999) Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1029–1035.
- Kim, Y.; Yeo, S.; Kum, J.; Song, H.-G.; Choi, H. T.** (2005) Cloning of a Manganese Peroxidase cDNA Gene Repressed by Manganese in *Trametes versicolor*. *J. Microbiol.* **43**, 569–571.
- Kreil, G.** (1981) Transfer of proteins across membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 317–348.
- Kupfer, D. M.; Drabenstot, S. D.; Buchanan, K. L.; Lai, H.; Zhu, H.; Dyer, D. W.; Roe, B. A.; Murphy, J. W.** (2004) Introns and Splicing Elements of Five Diverse Fungi. *Eukaryot. Cell* **3**, 1088–1100.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Langhoff, S.** (2002) Carotinoid abbauende Enzymaktivitäten aus Mikroorganismen. Dissertation, Universität Hannover.
- Lankinen, P.; Hilden, K.; Aro, N.; Salkinoja-Salonen, M.; Hatakka, A.** (2005) Manganese peroxidase of *Agaricus bisporus*: grain bran-promoted production and gene characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 401–407.
- Levin, L.; Forchiassin, F.; Viale, A.** (2005) Ligninolytic enzyme production and dye decolorization by *Trametes trogii*: application of the Plackett-Burman

experimental design to evaluate nutritional requirements. *Process Biochemistry* **40**, 1381–1387.

**Li, D.; Alic, M.; Brown, J. A.; Gold, M. H.** (1995) Regulation of Manganese Peroxidase Gene Transcription by Hydrogen Peroxide, Chemical Stress, and Molecular Oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 341–345.

**Limongi, P.; Kjalke, M.; Vind, J.; Tams, J. W.; Johansson, T.; Welinder, K. G.** (1995) Disulfide bonds and glycosylation in fungal peroxidases. *Eur. J. Biochem.* **227**, 270–276.

**Lis, H.; Sharon, N.** (1993) Protein glycosylation, Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* **218**, 1–27.

**Lomascolo, A.; Asther, M.; Navarro, D.; Antona, C.; Delattre, M.; Lesage-Meessen, L.** (2001) Shifting the biotransformation pathways of L-phenylalanine into benzaldehyde by *Trametes suaveolens* CBS 334.85 using HP20 resin. *Let. Appl. Microbiol.* **32**, 262–267.

**Lottspeich, F.; Zorbach, H.** (1998) Bioanalytik. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

**Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J.** (1951) Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.

**Martin, H. D.; Ruck, C.; Schmidt, M.; Sell, S.; Beutner, S.; Mayer, B.; Walsh, R.** (1999) Chemistry of carotenoid oxidation and free radical reactions. *Pure Appl. Chem.* **71**, 2253–2262.

**Martinez, A. T.; Speranza, M.; Ruiz-Duenas, F. J.; Ferreira, P.; Camarero, S.; Guillen, F. M. M. J.; Gutierrez, A.; del Rio; Jose C.** (2005) Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int. Microbiol.* **8**, 195–204.

**Martinez, M. J.; Ruiz-Duenas, F. J.; Guillen, F.; Martinez, A. T.** (1996) Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* **237**, 424–432.

- Mester, T.; Field, J. A.** (1998) Characterization of a Novel Manganese Peroxidase-Lignin Peroxidase Hybrid Isozyme Produced by *Bjerkandera* Species Strain BOS55 in the Absence of Manganese. *J. Biol. Chem.* **273**, 15412–15417.
- Müller, E.; Loeffler, W.** (1992) Mykologie. Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner. 5., durchgesehene Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Nie, G.; Reading, S.; Aust, S. D.** (1999) Relative Stability of Recombinant Versus Native Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 328–334.
- Otjen, L.; Blanchette, R. A.** (1986) A discussion of microstructural changes in wood during decomposition by white rot basidiomycetes. *Can. J. Bot.* **64**, 905–911.
- Perie, F. H.; Sheng, D.; Gold, M. H.** (1996) Purification and characterization of two manganese peroxidase isozymes from the white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens*. *Biochim. Biophys. Acta* **1297**, 139–148.
- Poulos, T. L.; Edwards, S. L.; Wariishi, H.; Gold, M. H.** (1993) Crystallographic Refinement of Lignin Peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.* **268**, 4429–4440.
- Poulos, T. L.; Kraut, J.** (1980) The Stereochemistry of Peroxidase Catalysis. *J. Biol. Chem.* **255**, 8199–8205.
- Rehm, H.** (2002) Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics. 4. überarbeitete Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Richter, G.** (1998) Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Physiologie und Biochemie des Primär- und Sekundärstoffwechsels. 6., völlig neu bearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Rösecke, J.; Pietsch, M.; König, W. A.** (2000) Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry* **54**, 747–750.

**Ruiz-Duenas, F. J.; Martinez, M. J.; Martinez, A. T.** (1999) Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Mol. Microbiol.* **31**, 223–235.

**Sambrook, J.; Russell, D. W.** (2001) *Molecular Cloning, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Sato, T.; Hara, S.; Matsui, T.; Sasaki, G.; Sajio, S.; Ganbe, T.; Tanaka, N.; Sugano, Y.; Shoda, M.** (2004) A unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, from *Thanatephorus cucumeris* Dec1: heterologous expression, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Cryst.* **D60**, 149–152.

**Scheibner, M.** (2006) Identifizierung und Charakterisierung carotinoidabbauender Enzyme aus Basidiomyceten. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.

**Schwarze, F. W.; Engels, J.; Mattheck, C.** (2000) *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hongkong.

**Suelter, C. H.** (1990) *Experimentelle Enzymologie. Grundlagen für die Laborpraxis*. Fischer-Verlag, Stuttgart.

**Sugano, Y.; Ishii, Y.; Shoda, M.** (2004) Role of H164 in a unique dye-decolorizing heme peroxidase DyP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 126–132.

**Sugano, Y.; Matsushima Y.; Shoda, M.** (2006) Complete decolorization of anthraquinone dye Reactive blue 5 by the concerted action of two peroxidases from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 862–871.

**Sugano, Y.; Nakano, R.; Sasaki, K.; Shoda, M.** (2000) Efficient Heterologous Expression in *Aspergillus oryzae* of a Unique Dye-Decolorizing Peroxidase, Dyp, of *Geotrichum candidum* Dec 1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1754–1758.

**Sugano, Y.; Sasaki, K.; Shoda, M.** (1999) cDNA Cloning and Genetic Analysis of a Novel Decolorizing Enzyme, Peroxidase Gene *dyp* from *Geotrichum candidum* Dec 1. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 411–417.

**Sundaramoorthy, M.; Kishi K.; Gold, M. H.; Poulos, T. L.** (1994) The Crystal Structure of Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **269**, 32759–32767.

**Trinkaus, P.; Reinhofer, M.** (2005) Parasitische und saprophytische Pilze auf Weiden in Energieholzkulturen. *Joannea Bot.* **4**, 19–33.

Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung – ZZuV) vom 29. Januar 1998 (BGBl. I S. 230), zuletzt geändert durch Art. 2 VO zur Änderung lebensmittelrechtlicher und tabakrechtlicher Bestimmungen vom 22. 02. 2006 (BGBl. I S. 444)

**Wariishi, H.; Akileswaran, L.; Gold, M. H.** (1988) Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: Spectral Characterization of the Oxidized States and the Catalytic Cycle. *Biochemistry* **27**, 5365–5370.

**Wariishi, H.; Dunford, H. B.; MacDonald, I. D.; Gold, M. H.** (1989) Manganese Peroxidase from the Lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **264**, 3335–3340.

**Welinder, K. G.** (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 388–393.

**Welinder, K. G.; Gajhede, M.** (1993) Structure and evolution of peroxidases. In: Welinder, Karen G.; Rasmussen, S. K.; Penel, C.; Greppin H. (Hg.): Plant peroxidases: biochemistry and physiology. Genf, Universität Kopenhagen und Universität Genf, 35–42.

**Winterhalter, P.** (1996) Carotenoid-Derived Aroma Compounds: Biogenetic and Biotechnological aspects. In: Takeoka, G. R.; Teranishi, R.; Williams, P. J.; Kobayashi, A. (Hg.): Biotechnology for improved foods and flavours. ACS symposium series 637, American Chemical Society, Washington DC, 295–308.

**Winterhalter, P.; Rouseff, R.** (2002) Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction. In: Winterhalter, Peter; Rouseff, Russell (Hg.): Carotenoid-Derived Aroma Compounds. ACS symposium series 802, American Chemical Society, Washington DC, 1–17.

**Zabel, R. A.; Morrell, J. J.** (1992) Wood microbiology: Decay and its prevention. Academic Press, San Diego.

**Zorn, H.; Bouws, H.; Takenberg, M.; Nimtz, M.; Getzlaff, R.; Breithaupt, D. E.; Berger, R. G.** (2005) An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyses xanthophyll esters. *Biol. Chem.* **386**, 435–440.

**Zorn, H.; Scheibner, M.; Hülzdau, B.; Berger, R. G.; de Boer, L.; Meima, R. B.** (2006) Novel Enzymes for use in enzymatic bleaching of food products. WO2007006792.

## 6 Anhang

### cDNA-Sequenzen der Isoenzyme von MsP1 und MsP2

#### MsP1.1

ATGAAGCTTTTTTCTGCCTCTGTTTTGCTGCTATCGTCGCTAGTCACTATGCGTCAGCGACTG  
CCCACATCAGGGCTCCCAATGTGAAGCCAAGGAGGACAAGCTCACTTCTGATTACTCCCCCTCA  
ACAGCCTCCGCTTCCATCTGCTCAACAGGCTGCAAGTGCCTCTAGCAGTGCTGGCTTGAATCTC  
ACCGACATTCAGGGTGATATTCTGATCGGCATGAAGAAGAACAAGGAAGTATTCTTCTTCTTCA  
GTGTACCGGACGCGACTACTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCACATC  
CACCGATCAGCTACTTGCTAATGATACTCAGCCTGTCACGGCTGTCAACGTCGCTTTCTCTAGC  
ACTGGCTCAAGGCATTGGGTATCACAGATGGTCTGAAGGATCCTGTCTTCGAGGCCGGAATGC  
TCAGCAACGCAGTGAGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGCAATTGGGTCCCTGGGTTTTGTCGG  
CACCAGTGTTTCATGGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCCG  
GCCAACATCCAACCATTTTGAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTC  
GACCCGGTGACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGT  
TGATGGATTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCCTGGTATCATG  
CTTCTCGGAGAGGCAAACGACACTTTTCAGAATGATCGTCTCCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCT  
TCCTTGCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGCGCCGAGTTCAACAAGTTCTGCAAGATCACGC  
TCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGTGTATCTCCTGGTGCCAGGATTGTAGGA  
CGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGATGACCCAGTGTGGCTGCTG  
ACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTTCTC  
TGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGGGCGATCTGGGGGTATTAATAAAATCCCAAACCAA  
CACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAGAGCGTCAAATA  
GCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCA  
GAACGGATTTCGTATTCTTCAAAGAATTGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACT  
GGTGCAGATCCTCTCATCGGTACAAATTCTCGTAACAGTGGCACCGATGCCCCCAACACGCCTC  
GTGTCGTCAGCGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTCTG  
AGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTCTTCTCGCCCTCACTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTTCA  
GTCTAG

#### MsP1.2

ATGAAGCTTTTTTCTGCCTCCGTTTTTGGCTGCTATCGTCGCTAGTCACTATGTGTCAGGGACTA  
CCCACATCAGGGCTCCCAACGTGAAGCCAAGGAGGACAACTCACTTCTGATTACTCCCCCTCA  
ACAGCCTCCGCTCCCATCTGCTCAACAGGCTGCAAGTGCCTCTAGCAGTGCTGGCTTGAATCTC  
ACCGACATTCAGGGTGATATTCTGATCGGCATGAAGAAGAACAAGGAAGTATTTTTCTTCTTCA  
GCATCACCGACGCCGCTACTTTCAAGGCTAAGCTAGGATCCGACATTCTTGAACATAATCACATC  
GACCAATCAGTTACTCGCCGTCGCCACTCAGCCTATCACGGCTGTCAACCTCGCGTTCTCTAGC  
ACCGGCCCTCAAGGCATTGGGTGTTAAAGATGATTTGAATGACACCGTTTTTCGACGCCGGGATGC  
TTAGCAACGCAGTGAGCGATTTGAGCGATCCCGGAACCGCAATTGGGTACCTGGCTTCGTAGG  
TACCGCTGTTTCATGGCGTTTTCTACTTGCATCGGACACTCTTGACAACGTGAACGCGGAACTG  
GCCAACATTCAAACAATCTTGAATGGCTCGATTACGGAGATTCATCGTCTGCAGGGAGAGGCTC  
GACCCGGTGATCAACAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGGATCAGTAACCCAGCCAT  
CGATGGATTTTCGACCCGGCTTCCCGGACAAGCTTTACTTCCGCCTGGACTTATGTTTTCTCGGA

GAGGCAAACGACACTGTTTCGCGTCCTCCGTGGGCCAAAGATGGATCCTTCCTTGTCTTCCGGC  
 AAATGCAACAGCGTGTACCTGAATTCGACAAATTCCTGCAAGACCACGCTCTTAACATGCCGAA  
 TATGACATCTGAACAAGGTGCTGAGCTCCTAGGCTCCAGGATGGTGGGGCGATGGAAAAGTGGT  
 GCTCCAATCGATCTCACTCCGTTGGTTCGATGACCCGGAGTTGGCTGCTGACCCTCAGCGAAATA  
 ACAACTTCGACTTTTCTGACGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTCTCTGCTCATATCCGTAA  
 GACTAACCCGCGCGCTGATCTTGGGGGTATTGATAACTTCCCGACGCGTCACATAATCCGAGCG  
 GGAATTCCATATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAAGCGTCAAATAGCTCTAGCACAGACC  
 CTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCAAGAACGCATTTCGTATT  
 CCTTCAACAGACTTGGGTTGATAATGCGAACTTCTTTAGGACCAACACTGGGGCAGATCCTATC  
 ATAGGTACCCTGTGCAACAAGAACGGCAATCTCCCAACACGCCTCGTAATGTTAGCGGTCTGG  
 ATCCTAACAAATCCCACCGGCCCCCCCCACCGAAATCGACCTTGACTTTGTTGTTTCTCGTGGTGG  
 AGAATACTTCTTTTCGCCCTCCCTTTCGCGATCAGGACTGTGCTTTCAGTCTAG

### MsP1.3

ATGAAGCTTTTTTCTGCCTCCGTTTTTGTGCTATCGTCGCTAGTCACTATGCGTCAGCGACTG  
 CCCACATCAGGGCTCCCAATGTGAAGCCAAGGAGGACAACTCACTTCTGATTACTCCCCCTCA  
 ACAGCCTCCGCTTCCATCTGCTCAACAGGCTGCAAGTGCCTCTAGCAGTGTGGCTTGAATCTC  
 ACCGACATTCAGGGTGATATTCTGATCGGCATGAAGAAGAACAAGGAACTATTCTTCTTCTTCA  
 GTGTCACCGACGCAGCTACTTTCAAGGCTAAGCTGGGATCCGACATTCTTGGACTAATCACATC  
 CACCGATCAGCTACTTGCTAATGATACTCAGCCTGTACGGCTGTCAACGTCACTTTCTCTAGC  
 ACTGGCCTCAAGGCATTGGGTATCACAGATGATCTGAAGGATCCTGTCTTTCGAGGCCGGAATGC  
 TCAGCAACGCAGTGAGCGACTTGAGCGATCCAGGGACCGGCAATTGGGTCCCTGGGTTTGTGCG  
 CACCAGTGTTTCATGGCGTTTTTCTACTTGCATCGGACACCATTGACAATGTAAACACCGAGCTG  
 GCCAACATCCAAACCATTTGCAATGGCTCGATCACGGAGATTCATCGTTTACAAGGGGAGGCTC  
 GACCCGGTGACCAGCAAGGTCACGAACACTTTGGATTTCATGGATGGAATCAGTAACCCGGCCGT  
 TGATGGATTTACACCTCCAGCGGAAATAAGACCTGGACAAGCTTTAATTCCGCTGGTATCATG  
 CTTCTCGGAGAGGCAAACGACACTTTTTCAGAATGATCGTCCTCCGTGGGCCAAAGATGGTTCCT  
 TCCTTGTCTTCCGTCAAATGCAACAGCGCGTGCCGAGTTCAACAAGTTCTTGAAGATCACGC  
 TCTTAACATGCCGAATATGACATCCGAGCAAGGCGCTGATCTCCTTGGTGCCAGGATTGTAGGA  
 CGATGGAAAAGTGGTGCTCCTATTGACCTCACTCCGTTGGTTCGATGACCCAGTGTGGCTGCTG  
 ACAATCAGCGAAATAACAACCTTCGACTTTTCTGTCGCCACGAATCAGACACGTTGCCCTTCTC  
 TGCTCATATCCGCAAGGCTAACCCGCGCGGCGATCTGGGGGTATTAATAAATTCCAAACCAA  
 CACATAATCCGAGCGGGAATTCCGTATGGACCCGAAGTTACCGACGCTGAAAAAGCGTCAAATA  
 GCTCTAGCACTGACCCTAGTCTGGAGCGTGGTCTGGCGTTTGTGGCCTATCAGTCTAATATCCA  
 GAACGGATTTCGATTCCTTCAAAAAGAAATGGGTTGATAATACGAATTTCTTCCGACCCGGCACT  
 GGTGTAGATCCTCTCATCGGTACAAATTTCTCGTAACAGTGGCACCAGATGCCCCCAACACGCCTC  
 GTGTCGTCAGCGGCTTGGATCCTAATAACGCTACGAGCACCATCGAAATTGATATCGATTTTCGT  
 AGTTTCTCGTGGAGGAGAATACTTCTTCTCGCCCTCACTTTCTGCGATCAGGACTGTGCTTTC  
 GTCTAG

### MsP2.1

AGTATGCGGCTCACTTACCTTCCCTTGTGTTGCGGGCATCGCCATCCAGTCTGCATGTGCCTTTC  
 CAAACTTCTCCAAGTCTTCCATATTAAGCCTCGTAGGACGAACTCCCTACTAATCAATCCCGA  
 TGCTCAGCCAGACCTCCCGACCGCAAAGCAGGCTTCCACTGCGGCTGCTTCTGTGGGTTTGAAC  
 CTTACCGACATCCAAGGAGACATCTTAATCGGTATGAAGAAGAACAAGGAAATGTTCTTCTTCT  
 TCAGTATTGCAGATGCCGCTGCATTCAAATCCCCTTGGGCTCCGCTATTCTCCCTCTTATCAC  
 CTCGACGCAACAGCTGCTTGGCTGTGGCAGCCAGCCTACCACCGCTGTCAACCTTGCCCTTCTCC

CAAACCGGATTGAATGCGCTGGGGCTTGCTGCTCAAGGCTTGGGGGACTCCCTCTTTGCCAGTG  
GTCAGTTCAGCGGTGCACAGAGTCTCGGCGACCCGGAACCTCGAACTGGGTCCAAGCGTTCGC  
TGGTACAGGCATACATGGTGTCTTCTTCTCGCATCGGATACCGTCGACAACGTGAATGCCGAG  
CTGTGCGAAATCCAGTCCATCTTGGGAACCTCCATCACTGAGGCGTACCGCCTTCAGGGTGAGG  
CTCGTCCCGGCGATCAGCAAGGCCACGAACATTTGGGATTCATGGACGGAATCAGCAACCCTGC  
CATCGACGGATTCTCCACTGCGCTGCCTGGTCAAGCCGTTCTCAGTCCCGGACTTTTCTGCTA  
GGAGAGGACGGCGATGGTTCCTCGTCTTCGCGTCCGTCTTGGGCAAAGGACGGCTCTTTCTTG  
CTTTCCGCCAGCTTCAACAGCGTGTCCAGAGTTCAACAAGTTCTCGCTGACAACGCTGCGCT  
AACACAGGGTAACGCTGATCTTCTCGGTGCCCGAATGATGGGACGGTGGAAATCTGGTGCTCCG  
GTCGACCTTGCCCCACCGCGGATGATGTTGATCTCGCTAATGACCCCCAAAGGAACAACAAC  
TCAACTTTACCCACGCCGGTTTTACCGAGACCACTGACGAACTCACTGCCCTTCTCCGCTCA  
CATCCGTAAGACGAACCTTCGATCGGACTTCAACCCCCAGAACACCAACAACCACATCATCCGT  
GCTGGTATTCCTTACGGACCTGAAGTCACTGACGCTGAAGCCTCATCCAACACGTCCAGCACGG  
ACGCTAGCCTCGAGCGTGGCTTGGCTTTCGTTGCATACCAATCGAACATTGGCAACGGCTTCGC  
ATTCTTCAACAGGCTTGGGTTGACAACGCAAACCTTCTTCTTCGGGAAGACCACCCACCTGGT  
GTTGACCCCATCATCGGCTCGGTTGCTGCGCAGAACAACCTTCGCCCCCAACGGTCCCCGTCCTG  
TGTCCGGACTCGACCCACAGATTTCGACCAAGATCGTCACCATAAACACCGACTTCGTCTCTTC  
TCGTGGAGGAGAATACTTCTTCTCCCCCTCGCTCTCTGCGATCCAGAACACGCTTTCTGTTTGA

## MsP2.4

AGTATGCGGCTCACTTACCTTCCCTTGTTTTGCGGGCATCGCCATCCAGTCTGCATGTGCCTTTC  
CAAACCTTCTCTAAGTCTTCCATATTAAGCCTCGTAGGACGAACTCCCTACTAATCAATCCCGA  
TGCTCAGCCAGACCTCCCGACCGCAAAGCAGGCTTCCACTGCGGCTGCTTCTGTGGGTTTGAAC  
CTTACCGACATCCAAGGAGACATCTTAATCGGTATGAAGAAGAACAAGGAAATGTTCTTCTTCT  
TCAGTATTGCAGATGCCGCTGCATTCAAATCCCACTTGGGCTCCGCTATTCTCCCTCTTATCGC  
CTCGACGCAACAGCTGCTTGTGTTGCCAGCCAGCCTACCACCGCTGTCAACCTTGCCTTCTCC  
CAAACCGGATTGAATGCGCTGGGGCTTGCTGCTCAAGGCTTGGGGGACTCCCTCTTTGCCAGTG  
GTCAGTTCAGCGGTGCACAGAGTCTCGGCGACCCGGAACCTCGAACTGGGTCCAAGCGTTCGC  
TGGTACAGGCATACATGGTGTCTTCTTCTCGCATCGGATACCGTCGACAACGTGAATGCCGAG  
CTGTGCGAAATCCAGTCCATCTTGGGAACCTCCATCACTGAGGCGTACCGCCTTCAGGGTGAGG  
CTCGTCCCGGCGATCAGCAAGGCCACGAACATTTGGGATTCATGGACGGAATCAGCAACCCTGC  
CATCGACGGATTCTCCACTGCGCTGCCTGGTCAAGCCGTTCTCAGTCCCGGACTTTTCTGCTA  
GGAGAGGACGGCGATGGTTCCTCGTCTTCGCGTCCGTCTTGGGCAAAGGACGGCTCTTTCTTG  
CTTTCCGCCAGCTTCAACAGCGTGTCCAGAGTTCAACAAGTTCTCGCTGACAACGCTGCGCT  
AACACAGGGTAACGCTGATCTTCTCGGTGCCCGAATGATGGGACGGTGGAAATCTGGTGCTCCG  
GTCGACCTTGCCCCACCGCGGATGATGTTGATCTCGCTAATGACCCCCAAAGGAACAACAAC  
TCAACTTTACCCACGCCGGTTTTACCGAGACCACTGACGAACTCACTGCCCTTCTCCGCTCA  
CATCCGTAAGACGAACCTTCGATCGGACTTCAACCCCCAGAACACCAACAACCACATCATCCGT  
GCTGGTATTCCTTACGGACCTGAAGTCACTGACGCTGAAGCCTCATCCAACACGTCCAGCACGG  
ACGCTAGCCTCGAGCGTGGCTTGGCTTTCGTTGCATACCAATCGAACATTGGCAACGGCTTCGC  
ATTCTTCAACAGGCTTGGGTTGACAACGCAAACCTTCTTCTTCGGAAAGACCACCCACCTGGT  
GTTGACCCCATCATCGGCTCGGTTGCTGCGCAGAACAACCTTCGCCCCCAACGGTCCCCGTCCTG  
TGTCCGGACTTGACCCACAGATTTCGACCAAGATCGTCACCATAAACACCGACTTCGTCTCTTC  
TCGTGGAGGAGAATACTTCTTCTCCCCCTCGCTCTCTGCGATCCAGAACACGCTTTCTGTTTGA



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Hülsdau  
Vorname: Bärbel  
Geburtsdatum: 27.10.1978  
Geburtsort: Wesel

## Schulbildung

08/1985 – 07/1989 Grundschule an der Bochumer Strasse,  
Recklinghausen  
08/1989 – 06/1998 Theodor-Heuss-Gymnasium, Recklinghausen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium und Ausbildung

10/1998 – 10/2002 Studium der Lebensmittelchemie, Universität  
Münster  
Abschluss: Erste staatliche Prüfung für  
Lebensmittelchemiker  
11/2002 – 10/2003 Berufsqualifizierendes Jahr, Chemisches Landes-  
und staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster,  
mit folgenden Tätigkeiten:  
Eismann Family GmbH & Co. KG, Mettmann  
(3 Monate)  
Lebensmittelüberwachungsamt Duisburg (2 Monate)  
Chemisches und Geowissenschaftliches Institut der  
Städte Essen und Oberhausen (7 Monate)  
Abschluss: Zweite staatliche Prüfung für  
Lebensmittelchemiker  
02/2004 – 08/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für  
Lebensmittelchemie der Leibniz Universität  
Hannover und Beginn der vorliegenden Arbeit unter  
Leitung von Prof. Dr. Dr. R.G. Berger  
09/2004 – 02/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am obigen Institut  
Seit 03/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Fachbereich Bio-  
und Chemieingenieurwesen, AG Technische  
Biochemie der Universität Dortmund unter Leitung  
von Prof. Dr. H. Zorn