

# Charakterisierung lebensmitteltechnologisch relevanter Amidasen aus *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität  
Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Nadine Eisele

geboren am 09.10.1981 in Basel/Schweiz

**2011**

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

Korreferent: Prof. Dr. T. Debener

Tag der Promotion: 19.08.2011

---

---

# Danksagung

---

---

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger, meinem Doktorvater, herzlich danken für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank geht außerdem an Dr. Diana Linke für die Betreuung, die stetige Gesprächsbereitschaft und die Überstellung von Kunstwerken zum Freundschaftspreis.

Herrn Prof. Dr. Thomas Debener (Abteilung Angewandte Genetik, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau PD Dr. Ursula Rinas (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Dr. Manfred Nimtz (Helmholtzzentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) möchte ich danken für die Sequenzierung von Peptiden mittels ESI-MS/MS.

Den Firmen Nestlé und X-Zyme danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an meine Kollegen und Kolleginnen für das hervorragende Arbeitsklima, die stetige Hilfsbereitschaft und eine unvergessliche Zeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter, Ingrid Eisele, meinem Vater Hans-Joachim Eisele und seiner Frau Anna Rehm-Eisele. Ohne ihre fortwährende Unterstützung wäre mir das Studium der Biochemie und die anschließende Promotion nicht möglich gewesen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Tobias für seine motivierenden Worte und seine Hilfsbereitschaft bedanken, die mir eine große Stütze waren.

---

---

# Vorbemerkungen

---

---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2007 bis März 2011 im Institut für Lebensmittelchemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger angefertigt. Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen folgender Forschungsvorhaben durchgeführt:

1. Production of gluten-specific peptidases from basidiomycetes and their use in hydrolysis of proteins for food industry applications. Nestlé S.A., Vevey, Suisse.
2. Asparaginase from Basidiomycetes. Nestlé S.A., Vevey, Suisse

Teile dieser Arbeit wurden patentiert, in international anerkannten Zeitschriften publiziert, sowie in Form von Posterpräsentationen veröffentlicht.

---

---

## Veröffentlichungen

---

---

Grimrath A, Eisele N, Berends P, Rabe S, Berger RG. Potent Peptidases from Basidiomycete Fungi and Their Characterization Upon Heterologous Expression in *E. coli*. International Congress on Biocatalysis Hamburg. Book of Abstracts 2010: 58

Eisele N, Linke D, Bitzer K, Na'amnieh S, Nimtz M, Berger RG. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresour Technol* 2011;102:3316-3321

Eisele N, Linke D, Nimtz M, Berger RG. Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochem.* 2011;46:1840-1846.

Berends P, Rabe S, Berger RG, Linke D, Eisele N. Asparaginase from basidiomycetes. WO Pat. Appl. 10983-WO-PCT

---

---

# Inhaltsverzeichnis

---

---

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Zusammenfassung .....	IV
Abstract.....	V
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hydrolasen in der Lebensmitteltechnologie .....	1
1.2 Hydrolasen aus Basidiomyceten .....	3
1.3 Erschließung neuer Enzyme aus Basidiomyceten .....	5
1.4 Strategien zur erfolgreichen Enzymproduktion in <i>E. coli</i> .....	7
1.4.1 Regulation der Expressionsrate.....	8
1.4.2 Bildung von Disulfidbrücken .....	10
1.4.3 Expression von Fusionsproteinen.....	11
1.4.4 Coexpression von Chaperonen .....	11
1.4.5 Renaturierung von Einschlusskörpern .....	12
1.4.6 Heterologe Expression in anderen mikrobiellen Wirten .....	14
1.5 Heterologe Expression von Enzymen aus Basidiomyceten.....	14
1.5.1 Expression in <i>E. coli</i> .....	14
1.5.2 Expression in anderen Wirten.....	16
1.6 Zielsetzung.....	17
<b>2 The first characterized asparaginase from a basidiomycete, <i>Flammulina velutipes</i>.....</b>	<b>18</b>
2.1 Abstract.....	18
2.2 Introduction.....	18
2.3 Materials and Methods .....	19
2.3.1 Cultivation of <i>F. velutipes</i> .....	19
2.3.2 Enzyme preparation from <i>F. velutipes</i> .....	20
2.3.3 cDNA-synthesis .....	20
2.3.4 Sequence fishing.....	21
2.3.5 Analysis of DNA and amino acid sequence.....	22
2.3.6 Heterologous expression in <i>E. coli</i> .....	22
2.3.7 Activity test .....	23
2.3.8 Temperature and pH optima.....	23
2.3.9 Temperature and pH stability .....	23
2.3.10 ESI-Tandem MS analysis of tryptic peptides .....	24
2.3.11 Native and denaturing SDS-PAGE .....	24
2.3.12 Isoelectric focusing .....	24
2.4 Results and Discussion.....	25
2.4.1 Effect of nitrogen source on FvNase production.....	25

2.4.2	Purification of FvNase .....	25
2.4.3	Sequence and heterologous expression of FvNase .....	26
2.4.4	Determination of enzyme class.....	27
2.4.5	Effect of pH and temperature .....	28
2.4.6	Effect of NaCl .....	29
2.5	Conclusion.....	29
<b>3</b>	<b>Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from <i>Pleurotus ostreatus</i> .....</b>	<b>30</b>
3.1	Abstract.....	30
3.2	Introduction.....	30
3.3	Materials and Methods .....	31
3.3.1	Cultivation of <i>P. ostreatus</i> var. florida .....	31
3.3.2	SDS-PAGE and Decoupled 2D-PAGE .....	32
3.3.3	Detection of peptidolytic activity.....	32
3.3.4	ESI Tandem MS Analysis of Tryptic Peptides .....	33
3.3.5	cDNA-Synthesis and Sequence Fishing.....	33
3.3.6	Construction of Expression Plasmids.....	34
3.3.7	Heterologous Expression of POP1 .....	34
3.3.8	Purification of POP1 inclusion bodies .....	34
3.3.9	Renaturation of POP1 .....	35
3.3.10	Additives.....	35
3.3.11	Temperature and pH-Optima.....	35
3.4	Results and Discussion.....	36
3.4.1	Analysis of Culture Supernatant.....	36
3.4.2	Sequence of POP1 .....	37
3.4.3	Heterologous Expression and Renaturation.....	39
3.4.4	Characterization .....	40
3.5	Acknowledgements .....	42
<b>4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>57</b>
6.1	Ergänzende Daten FvNase .....	57
6.2	Ergänzende Daten POP1 .....	59

---

---

# Abkürzungsverzeichnis

---

---

$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
$\mu$	mikro
3-MCPD	3-Monochlor-1,2-propandiol
A	Ampere
aa	Aminosäure
aktPOP1	prozessierte <i>Pleurotus ostreatus</i> Peptidase 1
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CODEHOP	<i>consensus degenerate hybrid oligonucleotide primer</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CV	<i>column volume</i>
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie
<i>F. velutipes</i>	<i>Flammulina velutipes</i>
FvNase	<i>Flammulina velutipes</i> Asparaginase
gDNA	genomische DNA
Glu	Glutaminsäure
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophob Interaktionschromatografie
His	Histidin



---

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>ion exchange chromatography</i>
IMAC	Immobilisierte-Metall-Affinitätschromatografie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lys	Lysin
M	molar
m	milli
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
n	nano
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NEM	N-Ethylmaleinimid
N-Suc-AAPF-pNA	N-Succinyl-Alanin-Alanin-Prolin-Phenylalanin-para-nitroanilid
ORF	<i>open reading frame</i>
p	pico
<i>P. ostreatus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POP1	<i>Pleurotus ostreatus</i> Peptidase 1
PoSI	<i>Pleurotus ostreatus</i> Subtilase I
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
Ser	Serin
SNL	Standardnährlösung
ss	<i>single stranded</i>

---

TB	<i>terrific broth</i>
TCA	Trichloressigsäure
T <sub>m</sub>	<i>melting temperature</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
V	Volt
v/v	<i>volume by volume</i>
W	Watt
w/v	<i>weight by volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
ZymPOP1	<i>Pleurotus ostreatus</i> Peptidase 1 Zymogen

---

---

# Zusammenfassung

---

---

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Erforschung von Amidasen aus den Speisepilzen *Flammulina velutipes* und *Pleurotus ostreatus* und ihrer Anwendbarkeit in der Lebensmitteltechnologie.

*F. velutipes* ist ein populärer Speisepilz in der asiatischen Küche. Bei der Untersuchung des Sekretoms von *F. velutipes* in Gluten-angereichertem Medium wurde ein Enzym entdeckt, welches die Deamidierung von L-Asparagin und L-Glutamin katalysierte. Das Enzym wurde durch Schäumung und SEC bis zur elektrophoretischen Homogenität aufgereinigt. Die Analyse mittels Polyacrylamidgelelektrophorese zeigte ein Protein von 85 kDa, welches nach Denaturierung Untereinheiten von 13 kDa aufwies, die ein Hexamer vermuten lassen. Durch ESI-MS/MS gewonnene Peptidsequenzen ermöglichten die Ableitung von degenerierten Primern, mit denen die vollständige kodierende Sequenz von 372 bp ermittelt werden konnte. *F. velutipes* Asparaginase (FvNase) wurde in *E. coli* exprimiert. Der Rohextrakt der *E. coli*-Zellen erreichte eine L-Asparagin-hydrolysierende Aktivität von 16 U/mL, welche fünfmal höher als die L-Glutamin-hydrolysierende Aktivität war. FvNase zeigte sowohl in der nativen, als auch in der rekombinanten Form ein pH-Optimum bei pH 7, außergewöhnliche Toleranz gegenüber höheren Temperaturen und Natriumchlorid und keine signifikante Homologie zu bereits bekannten Asparaginasen oder Glutaminasen.

Die submerse Kultivierung von *P. ostreatus* var. *florida* auf Weizengluten führte zu einer erhöhten Löslichkeit des Substrats. Die kodierende Sequenz einer der extrazellulären Peptidasen wurde durch PCR mit degenerierten Primern und RACE ermittelt. Die Sequenz hat eine Länge von 1161 bp, welche sich in 386 aa mit einer Molekularmasse von 38,7 kDa übersetzt. Durch Vergleich mit homologen Proteinen wurde das neue Enzym als eine Subtilase der Proteinase K Unterfamilie klassifiziert. *P. ostreatus* Peptidase 1 (POP1) wurde als Präproenzym exprimiert, deren 19 aa Signalsequenz durch den Exports abgespalten wurde. Die Prosequenz fungierte als ein intramolekulares Chaperon und temporärer Inhibitor und wurde in einem autokatalytischen Prozess abgebaut. Die heterologe Expression in *E. coli* führte zur Bildung von Einschlusskörpern, aus denen die Peptidase mit Hilfe von  $\beta$ -Cyclodextrin und CTAB renaturiert wurde. POP1 zeigte Optima bei pH 7,5 und 37 ° C und die höchste Stabilität bei pH 8 und 30 ° C. Die Peptidase wurde durch PMSF, Antipain und  $\text{Cu}^{2+}$  vollständig gehemmt, während  $\text{Ca}^{2+}$  die Aktivität deutlich steigerte. Die Hydrolyse von *N*-Suc-AAPF-*p*NA wurde in Gegenwart von 5 M NaCl nahezu verdreifacht.

**Schlagerworte:** Hydrolasen, Basidiomyceten, heterologe Expression

---

---

## Abstract

---

---

This work deals with the exploration of amidases from the mushrooms *Flammulina velutipes* and *Pleurotus ostreatus* and their applicability in food technology.

*F. velutipes* enjoys high popularity as an edible mushroom in Asian cuisines. Investigating the secretion of peptidases in nutrient media enriched with gluten, an enzyme was noticed that catalyzed the deamidation of L-asparagine and L-glutamine. The enzyme was purified to electrophoretic homogeneity by foaming and SEC. PAGE analysis revealed a protein of about 85 kDa with 13 kDa subunits indicating a hexameric protein. Degenerated primers were deduced from peptide fragments and the complete coding sequence of 372 bp was determined. The gene of *Flammulina velutipes* asparaginase (FvNase) expressed in *E. coli* achieved an L-asparagine - hydrolyzing activity of 16 U/mL in crude extract, which was 5 times higher than its L-glutamine-hydrolyzing ability. The enzyme showed a pH-optimum at pH 7, remarkable tolerance towards elevated temperature and sodium chloride concentration in both the native and recombinant form, and no significant homology to any conserved domains of published asparaginases or glutaminases.

The submerged cultivation of *P. ostreatus* var. *florida* on wheat gluten led to an increased solubility of the substrate. The coding sequence of one of the extracellular peptidases was obtained by PCR with degenerated primers and RACE. The sequence amounted to 1161 bp, translating into 386 aa with a molecular mass of 38.7 kDa. By comparison with homologous proteins the new enzyme was classified as a subtilisin-like peptidase of the proteinase K subfamily. *P. ostreatus* peptidase 1 (POP1) was expressed as a preproenzyme, whose 19 aa signal sequence was cleaved off during export into the extracellular space. The prosequence acted as an intramolecular chaperone and temporary inhibitor and was degraded in an autocatalytic process. The heterologous expression in *E. coli* resulted in the formation of inclusion bodies, from which the peptidase was refolded by using  $\beta$ -cyclodextrin and CTAB. POP1 showed optima at pH 7.5 and 37 °C. It was most stable at pH 8 and 30 °C. The peptidase was completely inhibited by PMSF, antipain and  $\text{Cu}^{2+}$ , while  $\text{Ca}^{2+}$  significantly enhanced its performance. The hydrolysis of N-Suc-AAPF-pNA was almost tripled in presence of 5 M NaCl.

**Keywords:** hydrolases, basidiomycete, heterologous expression

---

---

# 1 Einleitung

---

---

## 1.1 Hydrolasen in der Lebensmitteltechnologie

Die Herstellung von Proteinhydrolysaten für die Verwendung als Lebensmittel hat eine Jahrtausendealte Tradition. Die ersten Nachweise der Käseherstellung wurden bereits für das fünfte Jahrtausend vor Christi gefunden. Auch die Sojasoße blickt auf eine etwa 2500-jährige Geschichte zurück. Moderne Applikationen beinhalten die Herstellung von hypoallergener Babynahrung, Nahrungsergänzungsmitteln für Sportlerernährung und Gewichtsreduktion oder bioaktiven Peptiden für die Blutdruckregulation [1].

Die Proteinquellen sind sowohl tierischen und pflanzlichen Ursprungs und in der Regel in großen Mengen verfügbar. So fällt zum Beispiel Molke in großen Mengen bei der Käseherstellung an, während Weizengluten einen Nebenstrom der Stärkeherstellung darstellt. Leguminosen, darunter vor allem Soja, Lupine und Erbse, sind in vielen Klimazonen kultivierbar und liefern hohe Erträge bei geringen Bodenansprüchen.

Eine auch heute noch übliche Methode, pflanzliches Protein für die Würzmittelherstellung zu spalten, ist die salzsaure Hydrolyse unter starker Erhitzung mit anschließender Neutralisierung durch Natronlauge oder Hydrogencarbonat [2-5]. Dabei kommt es neben der Freisetzung von Glutamat zur Bildung von Glykokonjugaten aus den freien Aminosäuren und Zuckern. Zusammen verursachen diese einen intensiven, würzig-herzhaften Geschmack [6, 7]. Während dieses Prozesses bilden sich jedoch kanzerogene Chlorpropanole, zum Beispiel 3-Monochlorpropan-1,2-diol. 3-MCPD konnte zwar erfolgreich durch Erhitzung im alkalischen pH-Bereich degradiert werden, jedoch führte diese Strategie auch zu einer unerwünschten Veränderung des gewohnten Geschmacksprofils [8-10]. Insgesamt wird durch Säure hydrolysiertes pflanzliches Protein heute als minderwertig betrachtet, da es viele unbekannte Nebenprodukte enthält und das Problem der Chlorpropanolbildung nur reduziert, aber nicht gelöst werden konnte [6].

Das Beispiel der Sojasoße zeigt, dass durch Fermentation mit verschiedenen *Aspergillus* Spezies Hydrolysegrade von etwa 70 % und der angestrebte *umami* Geschmack erreicht werden können. Allerdings nimmt der gesamte Prozess Monate in Anspruch [1, 11]. Daher ist das Interesse an der Verbesserung der bereits in Anwendung befindlichen, rein enzymatischen Prozesse deutlich gestiegen. Ein Beispielverfahren beinhaltet eine kurze

Hitzebehandlung des Rohmaterials, gefolgt von der Einstellung eines, je nach eingesetzten Enzymen, schwach sauren bis neutralen pH-Werts und einer Temperatur von 50-55 °C über 10-24 h [12].

Die Nachteile der enzymatischen Behandlung sind nachwievor ungenügende Hydrolysegrade und die Bildung von Bitterpeptiden. Ein Sojaproteinhydrolysat muss zum Beispiel einen Hydrolysegrad von mindestens 30 % aufweisen und die Erfahrung zeigt, dass eine Mischung aus Endo- und Exopeptidasen zu einem deutlich weniger bitteren Endprodukt führt. Dieses liegt darin begründet, dass terminal verknüpfte hydrophobe Aminosäuren zwar intensive Bitterkeit induzieren, in ihrer freien Form jedoch nicht oder nur wenig zu dieser Geschmacksrichtung beitragen [1, 6]. Ein weiterer Nachteil geringer Hydrolysegrade ist die unvollständige Umsetzung des Rohmaterials, denn der verbleibende Rest muss abgetrennt und entsorgt werden.

Die Auswahl der Hydrolasen für die Würzmittelherstellung beschränkt sich nicht nur auf Peptidasen. Hervorzuheben ist die Glutaminase, die durch die Deaminierung von Glutamin den Anteil am intensiv würzig-herzhaft schmeckenden Salz der Glutaminsäure deutlich erhöht [13]. Zwar ist es möglich, die Aminosäureseitenketten etwa in Weizengluten durch leichtes Erhitzen in schwachen Säuren zu deaminieren, jedoch erzielt eine Umsetzung mit einer Glutaminase einen prägnanteren *umami*-Geschmack [14, 15]. Ein Beispiel für ein auf dem Markt erhältliches Enzym ist die Glutaminase SD-C100S des japanischen Anbieters Amano Enzymes.

Aufgrund ihrer ähnlichen Seitenketten können einige Glutaminasen auch Asparagin deaminieren und umgekehrt. Die Benennung erfolgt gemäß der dominanteren Aktivität. Werden Glutamin und Asparagin mit derselben Effizienz hydrolysiert, wird das Enzym Glutaminase-Asparaginase genannt [16]. Die Deaminierung von Asparagin hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erhalten. Nach der Entdeckung, dass Acrylamid, welches in frittierten oder gebackenen, stärkehaltigen Lebensmitteln gebildet wird, kanzerogen ist, wurden vermehrt Anstrengungen unternommen, den Acrylamidgehalt zu senken. Mehrere Gruppen konnten Asparagin und die Bildung der korrespondierenden Glykokonjugate im Rahmen der Maillardreaktion als Ursache für die Acrylamidentstehung identifizieren [17-19]. Dabei wurde deutlich, dass verschiedene Zwischenprodukte entstehen, die in unterschiedlichem Maße in Acrylamid resultieren [17, 20]. Eine hypothetischer Syntheseweg ist in Abb. 1 dargestellt: Asparagin bildet mit reduzierenden Zuckern die

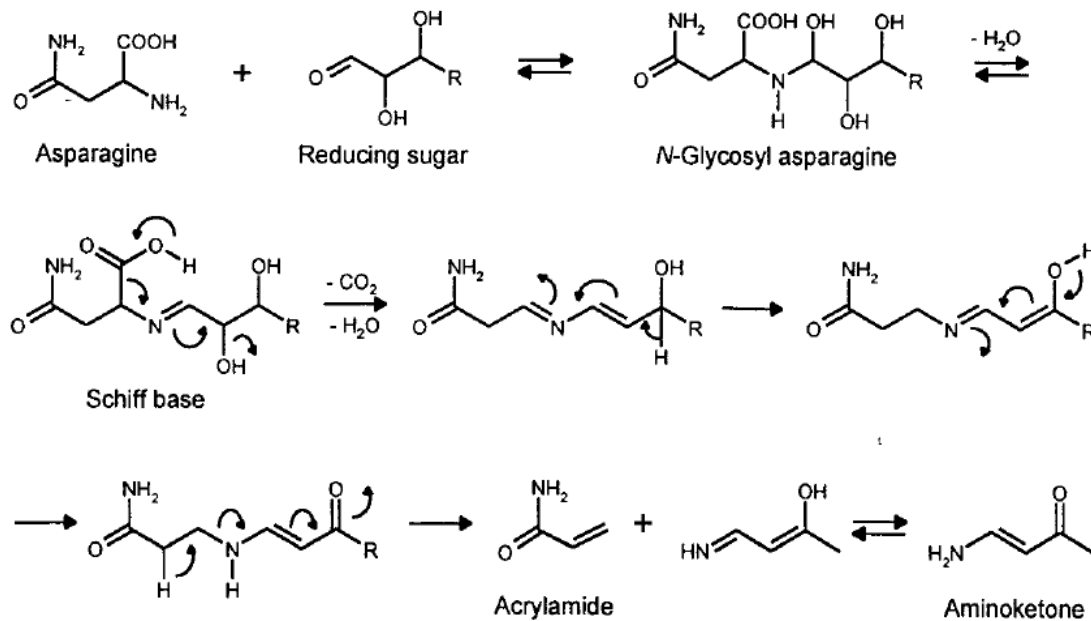


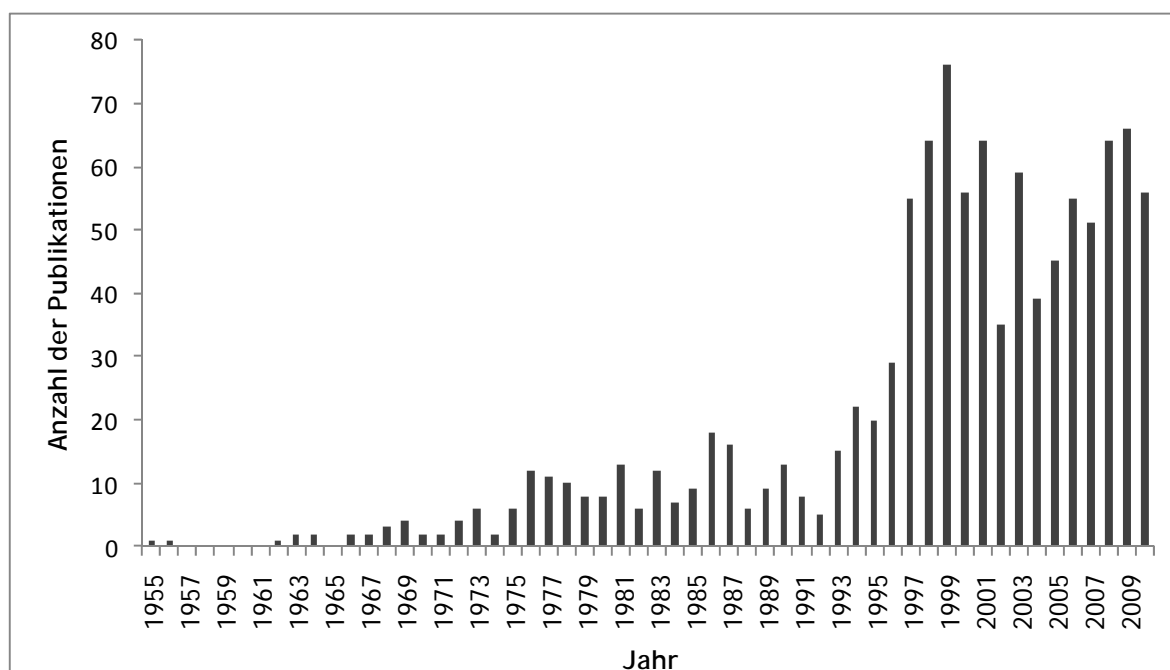
Abb. 1: Hypothetischer Reaktionsweg der Acrylamidbildung aus Asparagin und reduzierenden Zuckern [17].

korrespondierende Schiff'sche Base, die in einer *Strecker*-artigen Reaktion unter Decarboxylierung ein intermediäres Imin bildet, welches zu einem sekundären Amin umlagert. Aus der anschließenden β-Eliminierung geht das Acrylamid hervor. Nach der Entdeckung, dass Acrylamid im Tierversuch kanzerogen ist, wurden vermehrt Anstrengungen unternommen, den Acrylamidgehalt zu senken. Dabei zeigte sich, dass die Deaminierung des Acrylamid-Precursors Asparagin durch Asparaginasen zu einer nahezu quantitativen Verhinderung der Acrylamidbildung führte [21-23]. Beispiele für kommerzielle Asparaginasen sind Acrylaway® von Novozymes oder PreventASE™ von DSM.

## 1.2 Hydrolasen aus Basidiomyceten

Aufgrund ihrer leichten Kultivier- und Verfügbarkeit werden mikrobielle Quellen für die Erschließung neuer technologisch interessanter Enzyme gegenüber den tierischen oder pflanzlichen Quellen bevorzugt. Dabei liegt der Fokus jedoch auf Bakterien und Schimmelpilzen. In den letzten 15 Jahren sind die verfügbaren Daten zur Anwendung von Basidiomyceten in der Biotechnologie deutlich angestiegen (s. Abb. 2), ein klarer Hinweis für das Interesse daran, den Pool der in der weißen Biotechnologie angewandten Mikroorganismen zu erweitern.

Aufgrund ihrer Lebensweise auf Hölzern oder dem Waldboden, die gemeinhin schwer aufzuschließende Substrate darstellen, sekretieren Basidiomyceten eine große Anzahl von Enzymen, darunter Laccasen, Peroxidasen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-produzierende Enzyme und Hydrolasen



**Abb. 2: Entwicklung der Anzahl von Publikationen, die sich mit der biotechnologischen Anwendung von Basidiomyceten beschäftigen. (Quelle: SciFinder®)**

[24]. Viele dieser Enzyme konnten bereits näher charakterisiert werden. Dabei ergaben sich auch interessante biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten. Zum Beispiel beschreiben Krügener et al. eine Dioxygenase aus *Pleurotus sapidus*, welche das Sesquiterpen (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton oxidiert, dem Schlüsselaroma der Grapefruit [25, 26].

Basidiomyceten haben den Vorteil, dass viele Daten über die Pathogenität der verschiedenen Stämme verfügbar sind, so dass gezielt ungiftige ausgewählt werden können. Die bewusste Auswahl von Speisepilzen hätte zudem den Vorteil, dass diese dem Verbraucher als vertraute und geschätzte Lebensmittel gut bekannt sind [27].

In den letzten Jahren wurden diverse Peptidasen aus Basidiomyceten identifiziert und zum Teil auch charakterisiert [28-40]. Der Schwerpunkt wurde dabei jedoch auf die Regulation des Sekretoms gelegt. Sowohl bei *Pleurotus ostreatus*, als auch *Trametes versicolor* konnte ein Zusammenhang zwischen der Sekretion von Peptidasen und der Aktivität von Laccasen beobachtet werden [39, 40]. Neben ihrer Aufgabe, Stickstoffquellen aus dem Substrat zu mobilisieren, regulieren einige Peptidasen offenbar auch die Aktivität anderer extrazellulärer Enzyme, indem sie diese bedarfsgerecht abbauen oder durch Spaltung eines Zymogens aktivieren.

Im Gegensatz zu Peptidasen gibt es kaum beziehungsweise keine charakterisierten Asparaginasen und Glutaminasen aus Basidiomyceten. Diese Hydrolasen wurden bisher aus Bakterien, Hefen, Pilzen und Säugetieren isoliert und beschrieben [41-45]. Im Bereich der



Pilze sind jedoch nur Vertreter aus Schimmelpilzen wie *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus niger* [46, 47] näher charakterisiert worden. Lediglich Kohlmunzer et al. haben 1980 L-Asparaginase-Aktivität in verschiedenen höheren Pilzen beobachtet [48]. Dabei handelte es sich jedoch um Mykorrhizabildner, also Pilze, die mit Pflanzen Symbiosen eingehen und deshalb nur schwer kultivierbar sind. Somit haben diese Enzyme keine weitere Beachtung erfahren.

### 1.3 Erschließung neuer Enzyme aus Basidiomyceten

Es gibt verschiedene Strategien, neue Enzyme aufzufinden. Die gängige Vorgehensweise ist die Anwendung aktivitätsbasierter Screeningverfahren. Ausgewählte Basidiomyceten werden submers in einem induzierenden Medium kultiviert und mit entsprechenden Aktivitätstests untersucht, um eine Selektion von Stämmen zu erhalten, die die Zielaktivität aufweisen. Als Induktor wird üblicherweise ein Substrat verwendet, welches durch die Zielenzyme abgebaut wird. Im Fall von Peptidasen handelt es sich also folglich um proteinreiche Substanzen wie Gluten, Wolle oder Soja [49]. Dabei verursacht jedes Substrat eine individuelle Zusammensetzung des Sekretoms (s. Abb. 3). Die Intention ist, eine ausreichende Expression des Zielenzym zu erreichen, um dieses zu isolieren und charakterisieren. Die Bestimmung von Peptidsequenzen aus ESI-MS/MS- und Edmann-Verfahren erlaubt darüber hinaus eine weitergehende Kategorisierung, sofern homologe Proteine bereits charakterisiert wurden und ihre Primärstruktur bekannt ist.

Eine weitere Möglichkeit, neue Enzyme zu erschließen, umgeht den Weg über das Screening



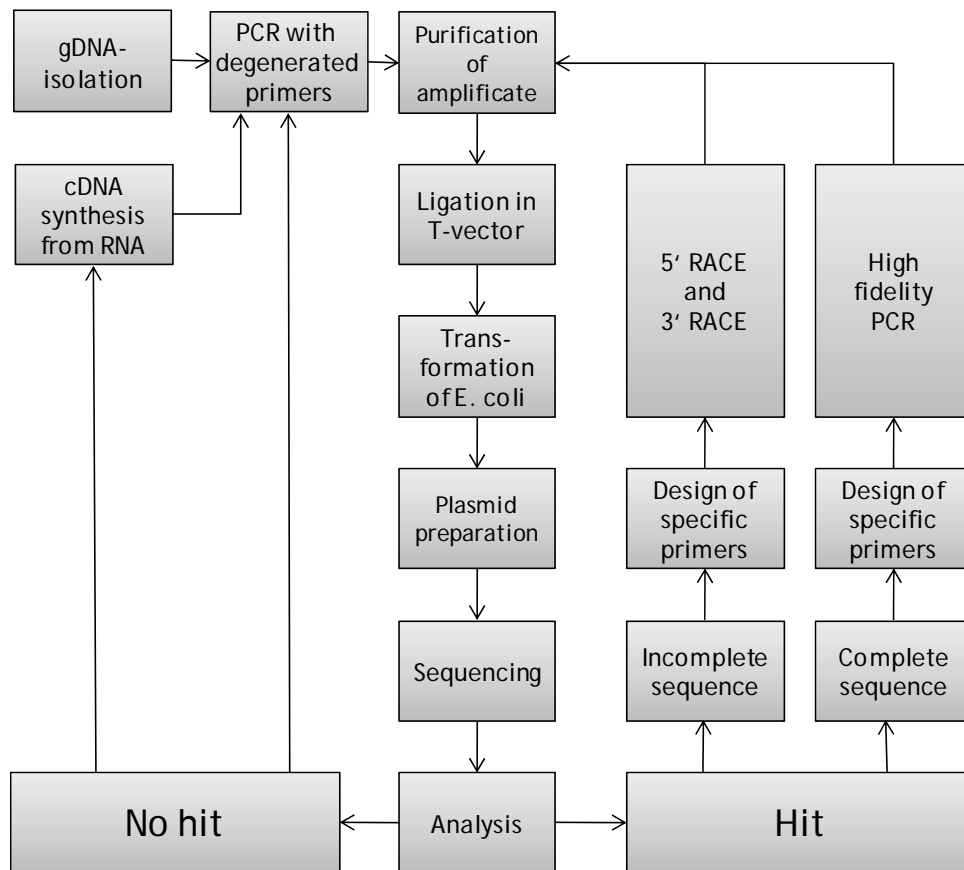
Abb. 3: Sezernierte Peptidasen von *Flammulina velutipes* während der Kultivierung mit verschiedenen Substraten. Die Visualisierung erfolgte über Gelatine Zymografie [49].

von Basidiomyceten-Kulturen. Durch die immer preiswerter werdende Sequenzierung ganzer Eukaryotengenome stehen auch immer mehr Genome von Basidiomyceten zur Verfügung (s. Tab. 1). Die Sequenzen von Enzymen, die die gewünschte Reaktion katalysieren, können über konservierte Domänen bereits bekannter Primärstrukturen identifiziert werden. Die Charakterisierung erfolgt dann nach heterologer Expression des Zielenzyms.

**Tab. 1: Status der Genom-Sequenzierung verschiedener Ständerpilze**

Stamm	Status	Stamm	Status
<i>Agaricus bisporus</i> var <i>bisporus</i> (H97) v2.0	Beendet	<i>Laccaria bicolor</i> v2.0	Beendet
<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>burnettii</i> JB137-S8	Beendet	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> v2.0	Beendet
<i>Auricularia delicata</i> SS-5 v1.0	Beendet	<i>Phlebia brevispora</i> HHB-7030 SS6 v1.0	Aufbau
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i> B	Aufbau	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC15 v2.0	Beendet
<i>Coniophora puteana</i> v1.0	Beendet	<i>Pleurotus ostreatus</i> PC9 v1.0	Beendet
<i>Coprinopsis cinerea</i>	Beendet	<i>Postia placenta</i> MAD-698	Beendet
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99	Beendet	<i>Punctularia strigosozonata</i> v1.0	Aufbau
<i>Dacryopinax</i> sp. DJM 731 SSP-1 v1.0	Beendet	<i>Schizophyllum commune</i> v1.0	Beendet
<i>Dichomitus squalens</i> v1.0	Beendet	<i>Serpula lacrymans</i> S7.3 v2.0	Aufbau
<i>Fomitiporia mediterranea</i> v1.0	Beendet	<i>Serpula lacrymans</i> S7.9 v1.0	Beendet
<i>Fomitopsis pinicola</i> SS1 v1.0	Beendet	<i>Stereum hirsutum</i> FP-91666 SS1 v1.0	Aufbau
<i>Ganoderma</i> sp. 10597 SS1 v1.0	Beendet	<i>Trametes versicolor</i> v1.0	Beendet
<i>Gloeophyllum trabeum</i> v1.0	Beendet	<i>Tremella mesenterica</i> Fries v1.0	Beendet
<i>Heterobasidion annosum</i> v2.0	Beendet	<i>Wolfiporia cocos</i> MD-104 SS10 v1.0	Beendet

Auch wenn das Genom noch nicht bekannt ist, können kodierende Sequenzen ermittelt werden. Peptide, deren Aminosäureabfolge durch ESI-MS/MS- und Edmann-Verfahren bestimmt wurde, werden in ihre DNA-Konsensussequenz rückübersetzt, um daraus Primer für PCR-basierte Screeningmethoden abzuleiten. Nachdem auf diese Weise eine Partialsequenz des gesuchten Gens ermittelt wurde, muss die kodierende Sequenz durch 5'-RACE beziehungsweise 3'-RACE vervollständigt werden. Dieses erfolgt über Adaptersequenzen, die mit spezifischen Primern aus der Zielsequenz in einer PCR kombiniert werden können, um die fehlenden Partialsequenzen zu amplifizieren (s. Abb. 4). Die Anfügung der Adapter erfolgt zum einen durch eine Adaptersequenz an einem Oligo-dT-Primer, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet und den Startpunkt der reversen Transkription bildet. Für die Anfügung des Adapters am 3'-Ende des ersten cDNA-Strangs



**Abb. 4: Vorgehensweise bei der PCR basierten Sequenzbestimmung**

wird zum anderen der *template-switch* Mechanismus der M-MLV Reversen Transkriptase genutzt [50]. Diese Eigenschaft sorgt für die Anknüpfung von 2-4 dCTP-Molekülen an das 3'-Ende des cDNA-Erststrangs, sobald die Reverse Transkriptase die 5'-Cap-Struktur der mRNA erreicht. Der Adapter trägt an seinem 3'-Ende eine korrespondierende Anzahl an Guanosinbasen, wodurch er mit dem 3'-Ende des Erststrangs hybridisieren kann. Die Transkription wird daraufhin von der Reversen Transkriptase fortgesetzt und die revers komplementäre Sequenz des Adapters an den Erststrang angehängt [50-52]. Auf diese Art können kodierende Sequenzen ermittelt, kloniert und für die heterologe Expression genutzt werden.

#### 1.4 Strategien zur erfolgreichen Enzymproduktion in *E. coli*

Einige technisch wichtige Enzyme aus Basidiomyceten lassen sich nur mit zeit- und kostenaufwändigen Verfahren isolieren, wobei die niedrigen Konzentrationen an Zielprotein einen wirtschaftlichen Einsatz dieser Biokatalysatoren in der Industrie erschweren. Größere Enzymmengen sind über heterologe Expression in prokaryotischen Systemen zugänglich, welche ihre spezifischen Vor- und Nachteile haben. Als optimal kann ein Expressionssystem nur dann bezeichnet werden, wenn die Produktivität, Bioaktivität

und biochemische Eigenschaften des Zielproteins beachtet werden, sowie die Prozesskosten, allgemeine Anwendbarkeit und Gefahrlosigkeit des Systems selbst [53]. Die Vorteile der Expressionssysteme auf der Basis des gram-negativen Bakteriums *Escherichia coli* liegen vor allem in einem schnellen Wachstum in relativ günstigen Substraten mit hohen Kulturdichten [54]. Die biotechnologische Herstellung von rekombinantem Humaninsulin beziehungsweise Insulinanaloga dürfte wohl das bekannteste Anwendungsbeispiel sein. Die Nachteile liegen in fehlenden post-translationalen Modifikationen, wie der Glykosylierung und Disulfidbrückenknüpfung im Cytoplasma, und der Bildung von unlöslichen Einschlusskörpern, die oft den maßgeblichen Anteil des produzierten rekombinanten Proteins ausmachen. Die Einschlusskörper vereinfachen jedoch umgekehrt die Aufreinigung des Zielproteins. Zahlreiche verfügbare Renaturierungsprotokolle zeugen davon, dass die heterologe Expression in *E. coli* nachwievor Aktualität besitzt [55, 56].

#### 1.4.1 Regulation der Expressionsrate

Eine häufige Ursache für das Scheitern der heterologen Expression liegt in der zu schnellen beziehungsweise zu effektiven Produktion des Fremdproteins. Insbesondere bei für *E. coli* toxischen Proteinen kann schon die Basalexpression zu einer Einstellung des Wachstums oder zum Zelltod führen [57]. Aber auch bei nicht-toxischen Proteinen führt eine zu hohe Expressionsrate häufig zur Akkumulation in Einschlusskörpern. Es ist daher wichtig, die Produktion in *E. coli* regulieren zu können. Die einfachste Maßnahme ist hierbei die Veränderung der Temperatur, bei der die Kultur geführt wird. Eine Verringerung von 37 °C auf 20 °C bedeutet zwar eine Verlangsamung des Wachstums um das ca. Vierfache [57], kann aber die Ausbeute an aktivem Zielprotein deutlich steigern beziehungsweise überhaupt erst ermöglichen [58, 59].

Weitere Maßnahmen zur Regulation der Expressionrate erfolgen direkt über den Expressionsvektor, welcher sämtliche genetischen Elemente trägt, die für die Transkription nötig sind. Ausschlaggebend für die Häufigkeit eines Vektors innerhalb der Zelle ist der auf dem Vektor liegende *origin of replication* (ORI), der bestimmt, ob 25-50 (*low copy* Vektoren) oder bis zu 200 Kopien (*high copy* Vektoren) vorliegen. Mit steigender Kopienzahl steigt auch die Expressionsrate [60].

Die Auswahl des Promotors hat entscheidenden Einfluss auf die Expressionsrate. Er ist dem Start-Codon der Zielsequenz vorgeschaltet und die Erkennungssequenz für die RNA-Polymerase, welche die Zielsequenz transkribiert. Ein geeigneter Promotor für die

heterologe Expression sollte eine geringe Basalexpression aufweisen, die Induktion sollte einfach und kostengünstig sein und der Anteil des Zielproteins am Ende der Kultivierung mindestens 10-30 % des Gesamtzellproteins ausmachen. Die überwiegende Zahl der auf dem Markt erhältlichen Expressionsvektoren sind inzwischen für eine niedrige Kopienzahl ausgelegt, da die verwendeten Promotoren stark genug sind, um hohe Syntheseraten zu erreichen [57].

Zwei der am häufigsten eingesetzten Promotoren in der heterologen Expression sind das T7lac System und der *araBAD* Promotor (pBAD). Ersteres basiert auf der IPTG-induzierten Expression der RNA Polymerase des T7-Phagen, deren Gen im Chromosom von *E. coli* BL21(DE3) integriert wurde. Die T7 RNA Polymerase bindet wiederum den auf dem Expressionsplasmid liegenden T7-Promotor und transkribiert das Gen des Zielproteins mit deutlich höherer Prozessionsrate als die *E. coli* eigene RNA Polymerase. Dieses System erlaubt sehr hohe Expressionsraten des rekombinanten Proteins, die einen Anteil von 50 % des Gesamtzellproteins überschreiten können [61]. Der Nachteil ist, dass schon eine niedrige Expressionsrate von T7 RNA Polymerase die Produktion einer letalen Menge eines toxischen Proteins nach sich ziehen kann. Die Transkription des T7 RNA Polymerasegens steht unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors, der schon durch geringe Mengen Lactose (0,03 mM) im Kulturmedium induziert werden kann [62]. Durch den Zusatz von 0,5 % - 1 % Glucose ins Kulturmedium kann die Induktion kurzzeitig unterdrückt werden. BL21(DE3)-Stämme, die ein pLys-Plasmid tragen, exprimieren T7 Lysozym, einen Inhibitor der T7 RNA Polymerase. Damit kann die Basalaktivität um den Faktor 10 gesenkt werden [57]. Zusätzlich erleichtert die Expression des Lysozyms den Zellaufschluss bei der Aufarbeitung [63].

Im Gegensatz zum T7lac System ermöglichen pBAD-basierte Vektoren eine bessere Expressionskontrolle über die eingesetzte Konzentration des Induktors L-Arabinose. Außerdem ist die ohnehin geringe Basalexpression durch den Zusatz von Glucose zum Kulturmedium auf ein sehr niedriges Niveau senkbar [64]. Die Regulation des Promotors erfolgt über ein Dimer des AraC-Proteins, welches in Abwesenheit von L-Arabinose zwei voneinander separierte DNA-Erkennungssequenzen bindet, die pBAD vorgeschaltet sind. Dadurch wird der DNA-Strang zu einer Schlaufe geformt, welche die Transkription unterdrückt. In Anwesenheit von L-Arabinose erfährt AraC eine Konformationsänderung, bindet zwei benachbarte DNA-Erkennungssequenzen und löst damit die Blockierung des Promotors auf [65].

Eine Anpassung der Expressionsrate kann auch über die Berücksichtigung der *codon usage* von *E. coli* im Vergleich zu der Sequenz des Zielproteins erfolgen, wobei in diesem Fall von einer Hochregulierung zu sprechen ist. Das Vorhandensein von Triplets, die in *E. coli* nur selten vorkommen und sich somit auch in der Population der korrespondierenden tRNAs niederschlägt, kann zum vorzeitigen Abbruch der Translation, zu Verschiebungen im Leseraster und zu Mutationen in der Primärstruktur des Zielproteins führen [66]. Solche seltenen Triplets sind unter anderem AGG und AGA (Arginin), CUA (Leucin) oder CCC (Prolin). Lösungsansätze sind die *de novo* Gensynthese mit angepasster *codon usage* oder die Verwendung von gentechnisch veränderten *E. coli*-Stämmen, die die seltenen tRNAs exprimieren. Beispiele hierfür sind *E. coli* BL21 CodonPlus-RIL (Stratagene) oder BL21 Rosetta-gami (Merck).

Ein ähnlicher Fall liegt vor, wenn eine bestimmte Aminosäure besonders häufig in der Primärstruktur des rekombinanten Proteins vorgesehen ist, aber relativ betrachtet in deutlich geringerem Maße in *E. coli* vorkommt. Eine Ergänzung der limitierenden Aminosäure im Kulturmedium kann den Mangel auszugleichen [66].

#### 1.4.2 Bildung von Disulfidbrücken

Eine große Anzahl von Enzymen beinhaltet Disulfidbrücken, die maßgeblich an der Bildung der korrekten Tertiärstruktur und damit ihrer Funktion beteiligt sind. Deswegen ist die Ausbildung dieser Verknüpfungen häufig das Nadelöhr in der Produktion von rekombinantem Protein in *E. coli*, da in dessen Cytoplasma reduzierende Bedingungen vorliegen [57]. Der Ansatz, funktionales rekombinantes Protein durch die Vereinfachung der Disulfidbrückenbildung zu erreichen, schlägt sich in diversen Expressionsstrategien nieder.

Die gängige Taktik ist die Ausschleusung des Zielenzym in das Periplasma. Die dort vorherrschenden oxidierenden Bedingungen begünstigen die Bildung von Cystinbrücken. Dafür ist es nötig, das Zielenzym mit einem N-terminalen Exportsignal zu fusionieren. Durch die gute Kenntnis der Molekularbiologie von *E. coli* gibt es zahlreiche Möglichkeiten hierfür, wobei zusätzlich gewählt werden kann, ob das Protein ungefaltet oder gefaltet transloziert wird [67, 68]. Ein weiterer Vorteil des Exports liegt in der Möglichkeit, die Proteine des Periplasmas durch einen osmotischen Schock in das umgebene Medium ausschleusen zu können. Damit wird der Zellaufschluss umgangen und die Proteinaufreinigung durch die Vermeidung der Kontamination mit cytoplasmatischen Proteinen und genomischer DNA erleichtert [69]. Nachteile können die unvollständige

Translokation und die Überlastung der Transportmechanismen sein, wodurch wiederum die Bildung von Einschlusskörpern gesteigert wird [68, 70].

Bestrebungen, die Bildung von Disulfidbrücken auch im Cytoplasma zu forcieren haben zur Entdeckung verschiedener mutierter *E. coli*-Stämme geführt, die keine Glutathion- oder Thioreduktaseaktivität besitzen [71, 72]. Diese weisen jedoch häufig auch sehr langsame Wachstumsraten auf, womit ein großer Vorteil der heterologen Expression in *E. coli* entfällt. Alternativ ist es möglich, eine Sulphydryloxidase und Disulfidisomerase zusammen mit dem Zielprotein zu exprimieren. Nguyen et al. berichteten 2011, dass die Effektivität der *de novo* Synthese von Disulfidbrücken durch die Oxidase deutlich gesteigert wird. Kombiniert mit der Aktivität der Isomerase, die im Verlauf der Faltung vorhandene Cystinreste reduziert, um neue Disulfidbrücken in geänderter Konfiguration zu knüpfen, soll die Ausbeute an korrekt gefaltetem und verknüpftem rekombinanten Protein deutlich gesteigert werden [73].

### 1.4.3 Expression von Fusionsproteinen

Die Fusion des rekombinanten Zielproteins mit einem Protein, welches sich durch hohe Löslichkeit auszeichnet, ist eine weitere Methode, die Bildung von Einschlusskörpern zu vermeiden. Populäre Fusionspartner sind die Glutathion-S-Transferase, Thioredoxin oder das Maltose-bindende Protein. Aber auch die Fusion einer Hexahistidinsequenz an N- oder C-Terminus des Zielproteins kann Auswirkungen auf die Löslichkeit haben [74, 75]. Weitere Vorteile von Fusionsproteinen sind ein erhöhter Schutz vor proteolytischem Abbau und die mögliche Anwendung von affinitätsbasierten Aufreinigungsmethoden [60]. Die vergleichende Expression von 27 verschiedenen Humanproteinen, jeweils kombiniert mit einem von sieben Fusionsproteinen, zeigte, dass der passende Fusionspartner von Protein zu Protein unterschiedlich sein kann [74]. Zusätzlich garantiert die Löslichkeit des rekombinanten Proteins nicht seine Funktionalität: So wurde zum Beispiel eine humane Aspartatpeptidase mit dem Maltose-bindenden Protein als Fusionspartner löslich exprimiert, zeigte jedoch keine proteolytische Aktivität [76].

### 1.4.4 Coexpression von Chaperonen

Chaperone gehören zu den Hitzeschockproteinen und katalysieren die Faltung von Proteinen zu ihrer korrekten Konformation. Somit können sie bei der Produktion von löslichem rekombinanten Protein unterstützend mitwirken. Teilweise führte die Coexpression verschiedener Kombinationen von GroEL, GroES, DnaK, DnaJ und dem Trigger Faktor auch zum Erfolg, wie unter anderem bei einer Protoporphyrinogen Oxidase aus Mais

[77]. Insgesamt hat sich dieser Ansatz jedoch ebenfalls nicht als Universallösung herausgestellt [60]. Aktuellere Forschungsarbeiten enthüllen zudem zunehmend nachteilige Effekte der Chaperon-Coexpression. Diese äußern sich durch verringertes Wachstum, vermehrte Bildung löslicher Aggregate, geringerer Ausbeute oder reduzierter spezifischer Aktivität [78].

#### 1.4.5 Renaturierung von Einschlusskörpern

Trotz der zahlreichen verfügbaren Expressionssysteme, die die Produktion von aktivem rekombinantem Enzym in *E. coli* versprechen, enden viele Expressionsversuche mit der Bildung von Einschlusskörpern. Die Individualität jedes Zielenzyms, das rekombinant exprimiert werden soll, erfordert entsprechend auch eine individuelle Optimierung der Expression. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass ein Zielenzym mit irgendeinem der erhältlichen Expressionssysteme oder einer Veränderung von anderen Parametern löslich exprimiert wird. Dieses erfordert jedoch zum einen Zeit und zum anderen Ressourcen, sowohl in personeller, als auch materieller Hinsicht und verhindert somit die Ausschöpfung aller Optionen.

Die Bildung von Einschlusskörpern hat nicht nur Nachteile. Häufig machen sie einen hohen Anteil des Gesamtzellproteins aus, sind durch ihre Größe und Dichte leicht von anderen Zellbestandteilen abzutrennen, neigen zu geringerer Degradierung, auch in Bezug auf proteolytischen Abbau und sind in sich relativ homogen, so dass weniger kontaminierende Fremdproteine abgetrennt werden müssen [79]. Nachwievor ist aber die Wiederherstellung der biologischen Aktivität das Nadelöhr für die Anwendung. Nichtsdestotrotz gibt es auch Beispiele für die industrielle Anwendung von rekombinanten Proteinen, welche aus Einschlusskörpern reaktiviert wurde, wie zum Beispiel Retavase® Reteplase, ein rekombinanter Gewebefibrinolyseaktivator, welcher in der akuten Myokardinfarkttherapie angewandt wird [80].

Für die Gewinnung der Einschlusskörper müssen zunächst die Zellen aufgeschlossen werden. Dieses kann mechanisch oder enzymatisch mittels Lysozym/EDTA erfolgen. Der Zusatz von Detergenzien unterstützt die Abtrennung von Membranproteinen und Zelltrümmern [80]. Die anschließende Solubilisierung erfolgt üblicherweise in 6-8 M eines chaotropen Salzes in Gegenwart eines Reduktionsmittels, wie Guanidinium-Hydrochlorid oder Harnstoff und DTT [81]. Alternativ kann die Solubilisierung auch im stark alkalischen Milieu, durch Detergenzien oder bei hohem Druck erfolgen [54, 82].



Während der anschließenden Renaturierung steht die Ausbildung der nativen Konformation in Konkurrenz zu Fehlfaltung und Aggregation. Letztere steigt mit

**Tab. 2: Gängige Methoden in der Renaturierung von rekombinanten Proteinen**

Methode	Durchführung	Vorteile	Nachteile
Verdünnung [83-87]	Schnelle Verdünnung des Solubilisats mit Renaturierungspuffer. Alternativ langsame Zugabe des Solubilisats zum Renaturierungspuffer.	- einfach - gleichzeitige Verdünnung von Protein und denaturierendem Reagenz	- Aufkonzentrierung aufwändig und kostenintensiv - im großen Maßstab sehr ressourcenintensiv
Dialyse Diafiltration [88-90]	Denaturierendes Reagenz diffundiert durch Membran, während das Protein zurückgehalten wird.	- einfach - langsame Entfernung des denaturierenden Reagenz kann erfolgreicher sein	- Langsamkeit des Prozesses kann Aggregation begünstigen - Membranadsorption
Chromatografische Methoden [86, 91-94]	Umpufferung während SEC, IEX, HIC oder Affinitäts-Chromatografie	- Aufreinigung und renaturierung in einem Schritt - konzentrierter Einsatz von Protein - kontinuierliche Anpassung der Konditionen (z.B. pH, Zusatz von künstlichen Chaperonen) - Abtrennung und Wiederverwertung von Aggregaten	- kleine Probengrößen - lange Laufzeit

wachsender Proteinkonzentration, weshalb Werte im Mikrogrammbereich pro Milliliter Renaturierungsansatz eingestellt werden, um intermolekulare Wechselwirkungen auf einem niedrigen Niveau zu halten [80]. Eine vorhergehende Aufreinigung des solubilisierten Proteins kann sich aus diesem Grund auch als vorteilhaft erweisen [95]. Dabei ermöglichen N- oder C-terminale Affinitäts-tags eine selektive Trennung [75, 96]. Es bietet sich auch an, die Aufreinigung und Renaturierung in einem Schritt durchzuführen [95]. Gängige Methoden der Renaturierung sind in Tab. 2 aufgeführt. Diese können durch die Veränderung der Temperatur [97], die Applikation von hohen Drücken (3-5 kbar) [82] oder den Zusatz von „Renaturierungshelfern“ variiert werden. Zu letzteren gehören zum Beispiel L-Arginin und Glycerol oder Detergenzien, die die Aggregation durch Micellbildung verhindern [80, 98]. Der Zusatz von Cyclodextrinen im hohen Überschuss zu einem solchen Micellsystem kann das solubilierte Protein sukzessive vom Detergenz befreien und so die

Faltung initiieren, weshalb sie künstliche Chaperone genannt werden [99]. Unlängst wurde dieses Prinzip mit der Nickel-Affinitätschromatografie kombiniert [94]. Auch der Einsatz von natürlichen Chaperonen ist möglich, jedoch limitiert durch die stöchiometrischen Mengen, die benötigt werden [100]. Zur Einstellung eines Redox-Systems für die Auflösung und Knüpfung von Disulfidbrücken wird unter anderem das Redoxpaar GSH/GSSG verwendet, welches im alkalischen Milieu schnell zwischen seinen Oxidationsstufen wechselt. Für Proteine, die in diesem pH-Bereich nicht stabil sind, stellen aromatische Thiole mit niedrigeren pKs-Werten eine Alternative dar [101, 102].

#### 1.4.6 Heterologe Expression in anderen mikrobiellen Wirten

Neben *E. coli* sind unter den Prokaryoten die *Bacillus*-Stämme die beliebtesten Expressionswirte. Sie haben den Vorteil, das Zielprotein mit hoher Effizienz ins Kulturmedium ausschleusen zu können. Außerdem fehlt ihnen als gram-positive Bakterien die äußere Lipopolysaccharid-haltige Membran, womit eine Entfernung dieser pyrogenen Substanzen entfällt [57].

Eukaryotische Expressionssysteme haben den entscheidenden Vorteil, das rekombinante Enzym nicht nur produzieren, sondern auch glykosylieren zu können. Diese posttranslationale Modifikation erweist sich zwar in vielen Fällen als nicht essentiell für die Funktionalität, kann aber entscheidend sein für die korrekte Faltung und Stabilität [103, 104].

Unter den eukaryotischen Expressionssystemen finden Hefen und Schimmelpilze die breiteste Anwendung. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus oryzae* oder *niger* werden auch im industriellen Maßstab für die heterologe Produktion eingesetzt [53, 105].

Auch Basidiomyceten, wie zum Beispiel *Coprinus cinereus*, wurden inzwischen als Wirt für die rekombinante Produktion von Enzymen verwendet [106-111]. Die Etablierung steht jedoch noch am Anfang und stellt bisher noch keine echte Alternative zu den anderen Systemen dar.

### 1.5 Heterologe Expression von Enzymen aus Basidiomyceten

#### 1.5.1 Expression in *E. coli*

Es gibt bisher nur wenige publizierte Beispiele für die erfolgreiche heterologe Expression von Enzymen aus Basidiomyceten in *E. coli*, darunter hauptsächlich Oxidoreduktasen [59,

112-115], aber auch Hydrolasen, wie beispielsweise eine Subtilase aus *Grifola frondosa* [36], ein Vertreter aus der Familie der Glykosidhydrolasen [58] und eine Endocellulase [116].

Der Umfang der zur Verfügung stehenden Expressionsvektoren und -stämme macht es immer häufiger möglich, die Bildung von Einschlusskörpern zu umgehen und lösliches, aktives Protein zu exprimieren, so auch bei basidiomycetischen Enzymen. Teilweise war eine Optimierung der Kulturbedingungen nötig, wie im Fall einer Pyranose 2-Oxidase, bei der die Senkung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 25 °C nach der Induktion mit Lactose zum Erfolg führte [59]. Bei Nakamura et al. und Ichinose et al. gab jeweils die Verwendung des BL21(DE3)pLysS-Stamms den Ausschlag [112, 114]. In anderen Fällen zeigte der Austausch des Expressionsvektors Wirkung: Während die Lipase aus *Pleurotus sapidus* mit einem pET-Vektorsystem (Invitrogen) in Form von Einschlusskörpern akkumulierte [117], wurde sie unter Kontrolle des *araBAD*-Promotors produziert und durch das im pBAD-System (Invitrogen) enthaltene GenIII-Exportsignal des fd-Phagen in das Periplasma transportiert [118]. Die dort vorliegenden oxidierenden Bedingungen ermöglichten die Ausbildung der in der Lipase vorkommenden Disulfidbrücken.

Es gelang jedoch auch, die Lipase *in vitro* aus den Einschlusskörpern zu renaturieren. Nach der Solubilisierung mit 8 M Harnstoff und 10 mM DTT wurde das Solubilisat 1:10 verdünnt und 10 Tage bei 4 °C, pH 8 und in der Anwesenheit von 10 mM CaCl<sub>2</sub> inkubiert. Die so renaturierte Lipase zeigte Aktivität gegenüber Xantophyllestern und *para*-Nitrophenylpalmitat [117].

Zwei Peroxidasen aus *Trametes cervina* [113] beziehungsweise *Marasmius scorodonium* [115] wurden ebenfalls erfolgreich renaturiert. Der in beiden Enzymen enthaltene Cofaktor Häm wurde durch den Zusatz von Hämin zum Renaturierungsprozess supplementiert, außerdem wurde ein GSSG/GSH-Redoxsystem verwendet. In beiden Fällen wirkte sich Harnstoff in Konzentrationen von 0,4 M beziehungsweise 2 M als „Renaturierungshelfer“ positiv aus; offensichtlich verhinderte der Zusatz Aggregation während des Renaturierungsprozesses.

Auch wenn es noch vergleichsweise wenig Beispiele für die Produktion von basidiomycetischen Enzymen in *E. coli* gibt, zeigen die veröffentlichten Beispiele, dass es möglich ist, rekombinantes aktives Protein direkt zu exprimieren, oder aber dieses aus Einschlusskörpern zu renaturieren.

### 1.5.2 Expression in anderen Wirten

Das zunehmende Interesse an der biotechnologischen Nutzung von Enzymen aus Basidiomyceten hat auch zur heterologen Expression der technisch interessanten Enzyme in anderen Wirten als *E. coli* geführt. Hierzu werden die eukaryotischen Systeme häufiger angewandt als die prokaryotischen Alternativen zu *E. coli*. So ist das immunmodulierende Protein LZ-8 aus *Ganoderma lucidium*, welches nach Anpassung der *codon usage* erfolgreich in *Bacillus subtilis* exprimiert wurde, eines der wenigen Beispiele für die Anwendung des *Bacillus* Expressionssystems [119].

Angesichts der engen verwandschaftlichen Beziehungen zwischen Basidiomyceten, Ascomyceten und Hefen ist es jedoch wenig verwunderlich, warum diese Systeme ausgewählt werden, wenn die Expression nicht in *E. coli* durchgeführt werden soll. Ein Beispiel für die industrielle Produktion ist Maxi Bright™, eine *versatile* Peroxidase des Anbieters DSM, die mit *Aspergillus oryzae* produziert wird. Dieses Carotinoid-degradierende Enzym aus dem Basidiomyceten *Marasmius scorodonius*, welches für die Bleichung von Molke eingesetzt wird, wurde im Institut für Lebensmittelchemie isoliert und charakterisiert [120]. Auch andere Peroxidasen aus den Basidiomyceten *Phanerochaete chrysosporium*, *Dichomitus squalens*, *Pleurotus eryngii*, *Phlebia radiata* und *Coprinus cinereus* konnten erfolgreich in *Aspergillus* produziert werden [121].

Laccasen gilt durch ihre Fähigkeit, phenolische Verbindungen zu oxidieren ebenfalls großes Interesse aus biotechnologischer Sicht, da sich Anwendungen in der biologischen Sanierung von Abfällen und in der Papier- und Textilindustrie ergeben [122]. Folglich wurden schon verschiedene Laccasen, unter anderem aus verschiedenen *Trametes* Spezies, *Coprinus cinereus*, *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus eryngii* heterolog in *Penicillium canescens*, diversen *Aspergillus* Spezies und Hefen wie *Kluyveromyces lactis* und *Pichia pastoris* exprimiert [123-129].

Eine weitere biotechnologisch interessante Gruppe von Enzymen stellen die Cellulasen dar, die zum Beispiel in Waschmitteln eingesetzt werden, um Cellulosefasern zu glätten, wodurch Anschmutzungen leichter entfernt und Farbtrübungen vermindert werden [130]. Wie bereits beschrieben, ist es gelungen, eine aktive Endocellulase aus *Polyporus arcularius* in *E. coli* zu produzieren [116]. Ein Beispiel für die Expression in einem anderen Wirt ist die Cellobiohydrolase aus *Corticium rolfsii*, welche in *Aspergillus oryzae* produziert wurde [131].

Im Zusammenhang mit Cellulasen sind Expansine eine weitere interessante Proteingruppe. Expansine beziehungsweise Expansin-artige Proteine sind am Streckungswachstum von

Pflanzen und Pilzen beteiligt, indem sie Wasserstoffbrücken aufbrechen. Dadurch werden Cellulosemikrofibrillen aufgelockert und somit für Cellulasen zugänglicher. Ein in *Saccharomyces cerevisiae* produziertes Expansin-artiges Protein aus *Bjerkandera adusta* verbesserte den Abbau von Baumwoll- oder *Agave tequilana*-Fasern durch Cellulasen deutlich. Dieser Effekt soll in der Gewinnung von fermentierbaren Zuckern aus Lignocellulose Anwendung finden [132].

## 1.6 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit sollten Hydrolasen aus *Pleurotus ostreatus* und *Flammulina velutipes* isoliert, molekularbiologisch charakterisiert und heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Die Enzyme aus *Flammulina velutipes* sind insbesondere zur Hydrolyse von Weizengluten für die Herstellung von Würzmitteln geeignet. Dabei sollte geklärt werden, ob sich die identifizierten Hydrolasen für den großtechnischen Einsatz eignen. Von besonderer Wichtigkeit ist hierbei ein breiter Wirkungsbereich, sowohl in Bezug auf pH und Temperatur, als auch bei hohen Salzkonzentrationen, wie sie in der Würzmittelherstellung vorkommen können. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob es möglich ist, die Enzyme rekombinant und löslich in *E. coli* zu exprimieren. Alternativ sollte ein Renaturierungsprotokoll entwickelt werden.

---

## 2 The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*

---

Reprinted from Bioresource Technology 2011; 102: 3316-3321 with permission of Elsevier

### 2.1 Abstract

*Flammulina velutipes* enjoys high popularity as an edible mushroom in Asian cuisines. Investigating the secretion of peptidases in nutrient media enriched with gluten, an enzyme was noticed that catalyzed the deamidation of L-asparagine and L-glutamine. The enzyme was purified to electrophoretic homogeneity by foaming and SEC. PAGE analysis revealed a protein of about 85 kDa with 13 kDa subunits indicating a hexameric protein. Degenerated primers were deduced from peptide fragments and the complete coding sequence of 372 bp was determined. The gene of *Flammulina velutipes* asparaginase (FvNase) over expressed in *E. coli* achieved an L-asparagine -hydrolyzing activity of 16 U/mL in crude extract, which was 5 times higher than its L-glutamine-hydrolyzing ability. The enzyme showed a pH-optimum at pH 7, remarkable tolerance towards elevated temperature and sodium chloride concentration in both the native and recombinant form, and no significant homology to any conserved domains of published asparaginases or glutaminases.

**Keywords:** Asparaginase; basidiomycete; *Flammulina velutipes*; heterologous expression; *E. coli*

### 2.2 Introduction

Asparaginases and glutaminases occur abundantly in nature from prokaryotic microorganisms to vertebrates [16, 41, 44, 45, 133, 134]. *Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi* asparaginases have been used successfully in the treatment of leukemia for the last 40 years [135, 136]. Fungal asparaginases were reported from molds like *Aspergillus niger* or *Aspergillus oryzae* and patented for industrial use [137, 138]. Microbial glutaminases have been identified in *Stenotrophomas maltophilia* [139], *Pseudomonas aeruginosa* [140] and

*Micrococcus luteus* [141]. None of these enzymes has been described from a basidiomycete fungus so far.

Because of the similarity of the catalyzed reactions, the deamidation of free L-asparagine or L-glutamine, the differentiation between asparaginases (EC 3.5.1.1) and glutaminases (EC 3.5.1.2) becomes blurred. So called glutaminase-asparaginases (EC 3.5.1.38) hydrolyze L-glutamine and L-asparagine with similar efficiency. It is not possible to distinguish between the three classes other than by determining their hydrolytic specificity [16].

L-Glutamate is well known as a prominent flavor enhancing amino acid and imparts a savory taste (“umami”). Therefore it does not come as a surprise that glutaminases are researched as a catalyst for the production of fermented condiments such as Japanese soy sauce [46, 139].

Asparaginases were introduced in food technology after Swedish studies revealed the ubiquitous occurrence of acrylamide in commonly consumed starch-based foods that were baked, roasted or fried [142]. Free asparagine was found to be the main source for acrylamide into which it is converted in the presence of reducing carbohydrates at temperatures above 120 °C [18, 19].

The ability of asparaginases to selectively hydrolyze asparagine to aspartate and ammonia promises to be a potential way to reduce the amount of free asparagine in the starting materials of food production, thus reducing the imminent risk of generating this potentially carcinogenic and neurotoxic compound [143]. In fact, treatment of raw products with asparaginase before thermal treatment resulted in a 96-99% drop of acrylamide formation [23, 144, 145]. The objectives of the present study were to biochemically characterize the novel asparaginase and to gather data for the assessment of its potential as a technical enzyme in food processing.

## 2.3 Materials and Methods

### 2.3.1 Cultivation of *F. velutipes*

All media and equipment were autoclaved prior to use and standard sterile techniques were applied throughout the procedure. *F. velutipes* was maintained on standard agar plates (30.0 g/L glucose-monohydrate; 4.5 g/L asparagine-monohydrate; 1.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4$ ; 3.0 g/L yeast extract; 15.0 g/L agar agar; 1.0 mL/L trace metal solution containing 0.005 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , 0.08 g/L  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0.09 g/L  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.03 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  and 0.4 g/L EDTA). The pH of the medium was adjusted to pH 6 with 1 M NaOH prior to sterilisation.

Pre-cultures were prepared by homogenisation of a 10x10 mm agar plug with mycelium of *F. velutipes* in 100 mL of sterile standard nutrition solution using an Ultra Turrax (Micra D-9, Art, Müllheim, Germany). Submerged cultures were maintained at 24 °C and 150 rpm. After cultivation for 5 days, 50 mL pre-culture were transferred into 250 mL main culture medium consisting of minimal medium (1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.5 g/L MgSO<sub>4</sub>; 1.0 mL/L trace metal solution) and 40 g/L gluten or 10 mM glutamine, respectively.

### 2.3.2 Enzyme preparation from *F. velutipes*

After 18 days of cultivation, the culture was filtrated and the extracellular enzyme-containing supernatant (200 mL) was foamed in a 100 cm glass column with a diameter of 3.4 cm after adjusting the pH to 8.0 with NaOH and adding 2 mM CTAB. The N<sub>2</sub> velocity was adjusted to 40 mL/min [146]. The retentate was concentrated using ultra-filtration with a MWCO of 10,000 kDa (Millipore, Bedford, MA) and separated via size exclusion chromatography on a Superose 6 column with 200 mM Tris/HCl pH 7.5.

### 2.3.3 cDNA-synthesis

RNA was prepared from 500 mg mycelium stored in RNALater® (Invitrogen) using the NucleoSpin® RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). 5 µg total RNA were mixed with 25 pmol 3'PCR (ATTCTAGAGCCGAGGCGGCCGACATG 30\*T VN) and filled up to 11 µL with DEPC-treated H<sub>2</sub>O. The mixture was incubated at 70 °C for 5 min and then chilled on ice for 2 min. 4 µL 5x reaction buffer, 2 µL dNTP mix (10 mM ea.), 0.5 µL RiboLock™ and 20 pmol SMART IIA (AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG) were added, mixed and incubated at 37 °C for 5 min. After the addition of 200 U RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase the mixture was incubated at 42 °C for 60 min. Termination was carried out by heating at 70 °C for 5 min.

Second strand synthesis was carried out by mixing 2.5 µL 10x Long PCR buffer, 2 µL dNTP mix (2.5 mM ea.), 25 pmol 5'PCR (AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT), 25 pmol 3'PCR, 1 µL DMSO, 1 U Long PCR Enzyme Mix, 3 µL ss cDNA and ddH<sub>2</sub>O to 25 µL.

The reaction mixture was incubated at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 20 s and 68 °C for 6 min, final elongation was carried out at 68 °C for 20 min.

Enzymes and reagents were purchased from Fermentas, St. Leon-Rot, Germany; oligonucleotides were synthesized by Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany.



### 2.3.4 Sequence fishing

Degenerated primers FvNaseP3\_fw (GGYAA YTTCTGCGCBGAYCC) and FvNaseP2\_rev (CCRGGGCAVGCVACCCAVGC) were deduced from peptide sequences identified by ESI-MS/MS. Wobbled bases were translated as follows: B=G,T,C; R=A,G; V=G,A,C; Y=C,T. PCRs were performed by mixing 2.5  $\mu$ L 10x TrueStart™ Taq-buffer, 2  $\mu$ L dNTP mix (2.5 mM ea.), 2  $\mu$ L 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 pmol forward primer, 25 pmol reverse primer, 0,8  $\mu$ L DMSO, 0,625 U TrueStart™ Taq DNA Polymerase, 1  $\mu$ L ds cDNA and ddH<sub>2</sub>O to 25  $\mu$ L.

Touchdown PCR [147] was performed by incubating the reaction mixture at 95 °C for 5 min, then for 12 cycles at 95 °C for 30 s, (72 °C - 1 °C/cycle) for 60 s and 72 °C for 90 s. Another 25 cycles were carried out at 60 °C annealing temperature. Final elongation was performed at 72 °C for 20 min.

PCRs were analyzed by agarose gel electrophoresis (1% agarose (Serva, Heidelberg, Germany) cooked in TAE-buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA pH 8). For detection of DNA 0.05 % SYBRSafe™ (Invitrogen) was added to the solution after it cooled down to about 50 °C.

DNA extraction from agarose gels was carried out with the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel).

DNA fragments were ligated into the pCR2.1® TA-Vector (Invitrogen) by mixing 1  $\mu$ L vector, 1  $\mu$ L 10x T4 DNA Ligase-buffer, 5 U T4 DNA Ligase, 0.5  $\mu$ L 5 mM ATP and 6.5  $\mu$ L Insert-DNA. The reaction mixture was incubated at 25 °C for two hours.

For transformation 5  $\mu$ L ligation reaction were added to 50  $\mu$ L chemically competent *E. coli* TOP10 (Invitrogen), incubated on ice for 20 min, heat shocked at 42 °C for 45 s and transferred back on ice. 500  $\mu$ L of SOC medium (Invitrogen) were added immediately. The cells were shaken at 200 rpm and 37 °C for 60 min and then plated on LB-agar containing 50  $\mu$ g/mL ampicillin and 20  $\mu$ g/mL X-Gal (Roth). Inoculated plates were incubated at 37 °C overnight.

Selection of positive clones was performed by colony PCR. The reaction mixture was composed as stated above but primers M13 uni (-21) (TGTA AACGACGGCCAGT) and M13 rev (-29) (CAGGAAACAGCTATGACC) were used. Template was added by resuspending white colony material in the reaction mixture. The reaction mixture was incubated at 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 1 min and 72 °C for 1 min/kb. Final elongation was performed at 72 °C for 20 min.

Plasmid DNA was isolated with the NucleoSpin Plasmid DNA Kit (Macherey-Nagel). Sequencing was performed by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

In order to complete the sequence, specific primers FvNaseP7\_rev (GCAATTTCTGCGCTGACC) and FvNaseP8\_fw (GAACCAAGGCGCTACCAAG) were derived from identified FvNase DNA fragments and paired with primers 5'PCR or 3'PCR, respectively. PCRs were carried out as stated above with an annealing temperature of 55 °C and an elongation step of 1 min at 72 °C.

Amplification of the complete FvNase sequence was achieved with primers FvNase\_5' (ATGAAATCTTTTGGCCCTCTTCG) and FvNase\_3' (TCAAGCAAAGTGATGAAGG) at an annealing temperature of 55 °C and an elongation step of 1 min at 72 °C.

To verify the sequence, genomic DNA was prepared from mycelium by using the Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). The complete FvNase sequence was amplified, cloned and sequenced.

### 2.3.5 Analysis of DNA and amino acid sequence

Identification of an N-terminal signal sequence was carried out by analysis with Signal P 3.0 [148]. Sequence homology was investigated through a GenBank data base search using BLAST [149].

### 2.3.6 Heterologous expression in *E. coli*

For cloning of FvNase, the 0.4 kb gene fragment was amplified from the plasmid DNA by PCR with flanking restriction sites EcoRI and BamHI using TITANIUM *Taq*-polymerase (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) and the primers FvNase\_Eco47III (ATAAGCGCTATGAAATCTTTTGGCCCTC) and FvNase\_AatII (ATAGACGTCTCAAGCAAAGTCGATGAA) (Metabion International AG, Germany). The gene cassette was temporarily ligated into cloning vector pGEM-T (Promega, Germany), digested and subcloned into X-Zyme's pCTP2 expression vector to yield the expression construct pCTP2-FvNase. In order to confirm the fidelity of the nucleotide sequence of asparaginase gene inserted in pCTP2 expression plasmid sequencing was performed by Sequiserve (Vaterstetten, Germany). For intracellular enzyme production *E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI, USA) transformed with pCTP2-FvNase was grown in LB- medium + 50µg/mL kanamycin at 30°C to an OD<sub>580 nm</sub> of 0.7, induced with 0.5 mM IPTG and further cultured overnight. For the production of a negative control, *E. coli* BL 21(DE3) was transformed with pCTP2-vector and grown as described above. The biomass was harvested by centrifugation and resuspended in 0.1 M

potassium phosphate buffer pH 7.5. By means of sonication (3x 3 min) the cells were disrupted and separated from cell debris by centrifugation. Extract concentrations were equalized by adjusting to the same OD<sub>280 nm</sub>.

### 2.3.7 Activity test

10 mM L-glutamine or L-asparagine, respectively, in 0.1 M potassium phosphate pH 7.0 were preheated to 37 °C. The assay was started by addition of 50 µL native or 10 µL recombinant enzyme in a total reaction volume of 150 µL and stopped after 10-20 min by addition of 20 µL 3% TCA or by heating at 95 °C for 20 min. Blinds were carried out without amino acids and the raw extract of the negative control. Formation of product was followed using HPLC. One unit of enzyme activity was calculated as the amount of enzyme required to produce 1 µM glutamic acid or aspartic acid, respectively, at 37 °C per minute. The protein concentration in the hydrolysis supernatant was estimated according to the Lowry-method using bovine serum albumin as a standard.

HPLC was performed using a C18 Nucleodur Pyramid, 5 µm, 4 mm ID column, methanol as eluent A, 0.1 M sodium acetate plus 0.044% triethylamine (pH adjusted to 6.5 with HCl) as the eluent B, o-phthaldialdehyde as the derivatisation reagent, and a fluorescence detector.

### 2.3.8 Temperature and pH optima

The determination of the temperature and pH optima of FvNase was performed with enzyme solutions harvested during the cultivation, or raw extract of the heterologous expression. The pH optimum was examined in the range of 4 to 9 (0.1 M sodium acetate pH 4, 5; 0.1 M potassium phosphate pH 6, 7, 8; 0.1 M sodium carbonate pH 9) at 37 °C, the optimal temperature determination ranged from 20 to 70 °C at optimal pH.

### 2.3.9 Temperature and pH stability

To determine the pH stability 10 µL of the recombinant enzyme were incubated for 16 h at 37 °C in 40 µL of the respective buffer as in 2.3.8. 100 µL of 10 mM glutamine in 0.1 M potassium phosphate (pH 7) were added and the reaction was incubated for 20 min at 37 °C. Blanks were prepared without substrate. The reaction was stopped at 95 °C for 10 min. The generated glutamic acid was calculated after HPLC analysis as described in 2.3.7. For analysis of temperature stability 10 µL of the recombinant enzyme were incubated for 1 h at the respective cent degrees in 40 µL of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7). Afterwards, 100 µL of 10 mM glutamine in 0.1 M potassium phosphate (pH 7) were added and the assay mixture was incubated for 20 min at 37 °C. Blanks were prepared without

substrate. The reaction was stopped at 95 °C for 10 min. The generated glutamic acid was calculated after HPLC analysis as described in 2.3.7.

### 2.3.10 ESI-Tandem MS analysis of tryptic peptides

The peptidase bands were excised from SDS polyacrylamide gels, dried, and digested with trypsin. The resulting peptides were extracted and purified according to standard protocols. A Qtof II mass spectrometer (Micromass, U.K) equipped with a nanospray ion source and gold-coated capillaries was used for electrospray ionisation (ESI) MS of peptides. For collision-induced dissociation experiments, multiple charged parent ions were selectively transmitted from the quadrupole mass analyser into the collision cell (25-30 eV). The resulting daughter ions were separated by an orthogonal time-of-flight mass analyser. Peptide mass fingerprints obtained from ESI-Tandem MS analysis were used for cross-species protein identification in public protein primary sequence databases.

### 2.3.11 Native and denaturing SDS-PAGE

SDS-PAGE analyses were performed on a 12% polyacrylamide separation gel [150]. Samples were prepared by mixing 20 µL of enzyme solution and 20 µL of loading buffer [0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.2 M DTT, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue] and boiling for 15 min. After electrophoresis at 20 mA per gel, the gels were stained with silver or Coomassie Brilliant Blue. For molecular determinations, marker proteins from 250 to 10 kDa (BioRad, Germany) were used.

Native PAGE was performed under non-denaturing conditions. Samples were prepared by mixing 1:1 (v/v) with loading buffer [0.05 M Tris/HCL (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue]. After electrophoresis at 10 mA per gel and at 8 °C, gels were washed twice in 2.5% Triton X-100 for 20 min each. The glutaminase-staining solution contained 15 mM L-glutamine, 0.5 g/mL bovine liver glutamate dehydrogenase, 0.1 M potassium phosphate pH 7, 2 mg/mL NAD, 0.04 mg/mL phenazine methosulfate, and 2 mg/mL nitroblue tetrazolium. Enzyme activity appeared after incubation at 37 °C as violet bands.

Glycosylated proteins were detected with thymol and sulfuric acid according to [151].

### 2.3.12 Isoelectric focusing

IEF polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a Multiphor II system (Pharmacia LKB, Sweden) using Servalyt™ Precotes™ precast gels with an immobilised pH gradient from 3 to 10 (Serva, Germany) for 3500 V h (2000 V, 6 mA, 12 W). The determination of isoelectric

points was based on a protein test mixture from pI 3.5 to 10.7 (Serva, Germany). Gels were Coomassie or activity stained as described in 2.3.11.

## 2.4 Results and Discussion

### 2.4.1 Effect of nitrogen source on FvNase production

L-Glutamine and gluten, a glutamine rich substrate, were used in submerged cultivation of *F. velutipes* (DSMZ 1658) to induce FvNase production. A pronounced rise in extracellular FvNase-activity compared to not inducing SNL-medium was detected from day 11 on in gluten cultures and from day 12 in glutamine cultures, respectively (Abb. 5). Therefore, gluten as well as glutamine induced the expression of FvNase in submerged culture and

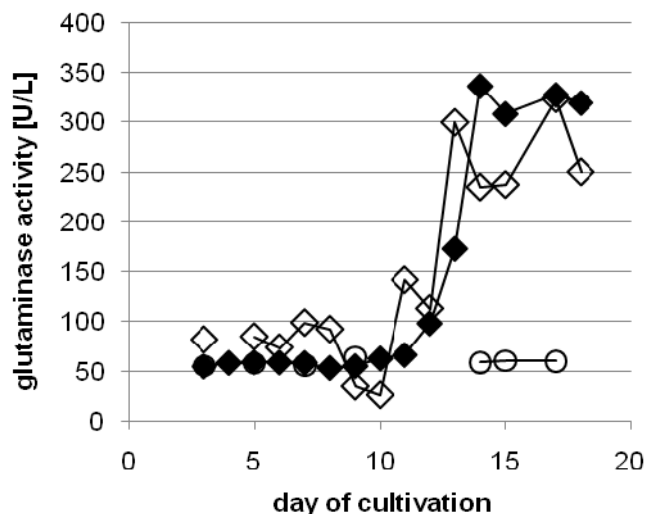


Abb. 5: Development of extracellular activity in submerged cultures grown on gluten (open squares) or glutamine (filled squares) compared to not inducing SNL-medium (open circles).

resulted in a similar pattern of secreted glutaminase activity. The fairly low cost and wide availability of gluten, a side product of starch processing, renders it an attractive resource for the cultivation of *F. velutipes* and production of FvNase. The more rugged course of the activity curve may have resulted from the protein bound state of glutamine in the gluten induced cultures. The glutamine induced cultures showed stable FvNase-activity after 14 days.

### 2.4.2 Purification of FvNase

FvNase proved to be a protein that was purified easily in a simple two step process. During the first step, foaming with CTAB removed essentially all proteins below 75 kDa with a 30% loss of activity. The remnants were separated by SEC resulting in electrophoretic purity of FvNase and a recovery rate of 90%. PAGE analysis and activity staining revealed a protein of about 85 kDa with 13 kDa subunits indicating that FvNase is a hexameric protein (Abb. 6). The isoelectric point was 5.3 (result not shown).

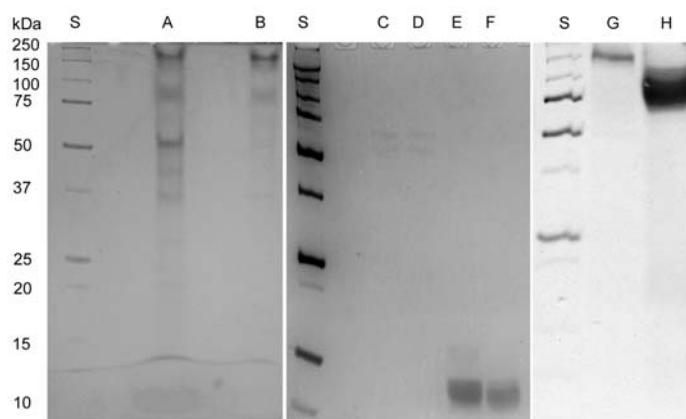


Abb. 6: Purification of FvNase by foaming and SEC of the retentate. S: Molecular weight marker. A: Supernatant of L-glutamine-induced culture. B: Retentate after foaming of culture supernatant. C-F: Denatured samples of SEC-fractions. Lanes E and F show subunits of FvNase. G-H: Not denatured samples of pooled and concentrated SEC-fractions. Lane H shows FvNase at 85 kDa.

### 2.4.3 Sequence and heterologous expression of FvNase

Degenerated primers FvNaseP3\_fw and FvNaseP2\_rev successfully amplified a 191 bp product whose deduced amino acid sequence contained the partial sequences of peptides P3 and P2 and the full sequence of peptide P4. The combination of primers 5'PCR with FvNaseP8\_rev and FvNaseP7\_fw with 3'PCR, respectively, resulted in the amplification of the missing sequence fragments. The length of the complete coding sequence of FvNase was 372 bp and was confirmed by amplification of the genomic sequence which contained two introns from position 146 to 198 and 366 to 417 at a total sequence length of 477 bp. The complete sequence can be found under the accession number FR696374. A hypothetical 19 aa signal sequence was identified at the N-terminus of the deduced 123 aa amino acid sequence (Abb. 7). The molecular weight of the primary sequence without the signal sequence amounts to 10.9 kDa, suggesting that FvNase is glycosylated. This assumption could be confirmed by detection with thymol and sulfuric acid [151].

```

atgaaatcttttgcacctcttcgctccctctcatcgttgctgctgctcgtaacagcgccgtg      60
M K S F A L F V P L I V A A V V N S A V      20

gtcaccttttccaccggccttggtgcaactctgtctcgcagacctaccgtggcaactgc      120
V T F S T G L G C N S V S Q T Y R G N C      40

aacttctgcgctgaccacccggcgactggagctcagtcggcttttctgagatcggaggc      180
N F C A D P P G D W S S V G F S E I G G      60

gacaaccgctcaccgttcataaccagaacagctgcacccccgcttcgcaggtcggccaa      240
D N R V T V H N Q N S C T P A S Q V G Q      80

ggctttggaccggcctgctggaaccaaggcgctaccaagcttcggttctgcttggttgcg      300
G F G P A C W N Q G A T K L R S A W V A      100

tgccttgacagagactcgctgagaacggtaccatcgctcgcagcagcggcgcttcctc      360
C P G Q R L A E N G T I V D D D G A F I      120

gactttgcttga      372
D F A -      123

```

Abb. 7: The complete nucleotide sequence (top) and deduced amino acid sequence (bottom) of FvNase. The hypothetical 19 aa signal sequence is boxed. Peptide sequences identified by ESI-MS/MS-analysis are underlined and appear in the order FvNaseP1, FvNaseP3, FvNaseP4, FvNaseP2.

Comparison of the FvNase to published asparaginases or glutaminases revealed no significant homology to any conserved domains of these enzyme classes (results not shown). The lack of significant homology to other amidases indicates that FvNase is a novel enzyme in this class. BLAST searches never resulted in a maximum score higher than 40 and E-values below 0.5. Usually, a maximum score in the three digit range and E-values below  $10^{-5}$  are required to consider a BLAST search result as reliable. Additionally, unlike other asparaginases, FvNase does not carry typical sequence motives such as NCSGKH which is highly conserved in the asparaginase II super-family [152]. The subunits are of an unusually small size as well. While microbial glutaminase-asparaginase monomers typically have a molecular weight between 25 and 65 kDa [16], FvNase showed 13 kDa only. The size of native FvNase suggested the presence of a hexameric protein which again is unusual for asparaginases which typically form dimers or tetramers [152]. Since neither SDS nor CTAB but only heating in the presence of DTT caused a separation into the subunits, the existence of disulfide bridges between the monomers can be assumed.

Recombinant FvNase was successfully over expressed in *E.coli*. By application of optimized fermentation parameters (LB medium; 190 rpm agitation; 0.5 mM IPTG at  $OD_{580nm} = 0.7$ ; 30°C expression temperature) L-glutamine-hydrolyzing activities of up to 3 U/mL  $\pm$  0.01 in crude extract could be achieved. Additional  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Na^+$  and  $Co^{2+}$  ions exhibited no positive influence.

Even though wild type FvNase had a size of 85 kDa, the hydrolytic activity was still present in the recombinant protein which yielded 39 kDa thus indicating a trimer. This suggests that the active site is either formed by one trimer or lies in each monomer. Due to the lack of homology to other hydrolases it is not possible to predict the active site without further experiments. So even in this post-genome age, it would not have been possible to deduce the function of this enzyme based on similarity alone.

#### 2.4.4 Determination of enzyme class

At first, FvNase was believed to be a glutaminase. Adding L-asparagine to the experimental procedures revealed that this substrate was processed 3.2 times faster than L-glutamine. This was confirmed by the recombinant enzyme which yielded a factor of 5.3 in favor of L-asparagine. Based on the definition of [16], this allowed the classification of FvNase as an asparaginase.

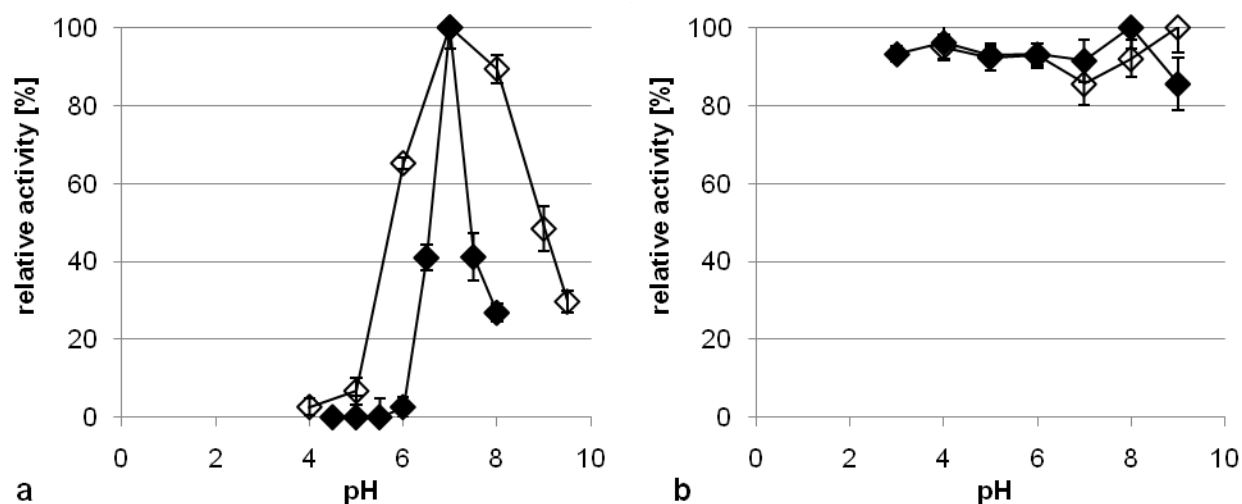


Abb. 8: Effect of pH on a) activity and b) stability of native (filled squares) and recombinant (open squares) FvNase. Relative activity is expressed as a percentage of the respective highest activity.

#### 2.4.5 Effect of pH and temperature

Like other asparaginases and glutaminases, FvNase shows a remarkable pH- and temperature-stability. The pH-Optimum of FvNase for hydrolyzing L-glutamine was determined at pH 7 in both the native and recombinant enzyme. Both showed high stability over the broad range of pH 3 to 9 where they retained at least 85% of their maximum activity after 16 hours at the respective pH-value (Abb. 8). Despite the narrow pH-optimium at 7-8, this makes FvNase more stable than a glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 [139]. Native FvNase showed a temperature optimum at 40 °C. Recombinant FvNase hydrolyzed L-glutamine and L-asparagine with optima at 30 °C and 40 °C, respectively. Both wild type and recombinant enzyme were able to hydrolyze their substrates at temperatures up to 70 °C (Abb. 9). After one hour at 60 °C, native and recombinant FvNase displayed 39% and 45% residual activity, compared to their respective values at 37 °C (results not shown), which proves not only the remarkable stability of FvNase but also turns it into an interesting enzyme for

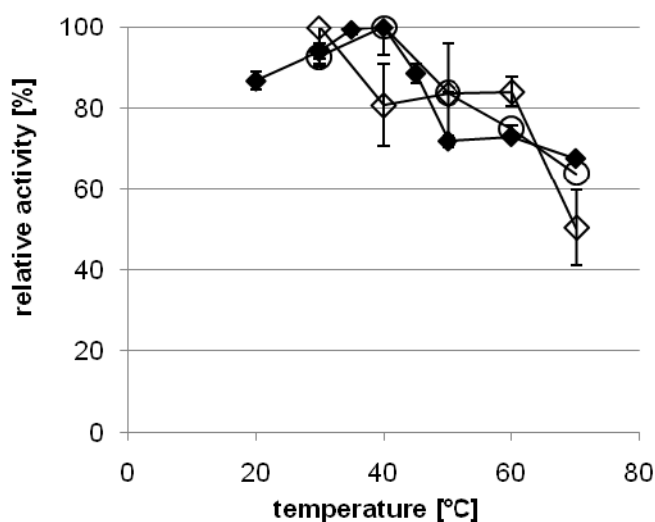


Abb. 9: Effect of temperature on L-glutamine-hydrolyzing activity of native (filled squares) and recombinant (open squares) FvNase. L-asparagine-hydrolyzing activity of recombinant FvNase is displayed by open circles. Relative activity is expressed as a percentage of the respective highest activity.



fermentation processes at elevated temperatures.

#### 2.4.6 Effect of NaCl

Recombinant FvNase was stable at NaCl concentrations of up to 25%. As with glutaminase I from *Micrococcus luteus* K-3, the L-glutamine hydrolysis by FvNase is activated in the presence of NaCl [141]. A rise of 25% in L-glutamine hydrolyzing activity was observed at 15% NaCl and at least 95% of the original activity was found at higher concentrations. The hydrolysis of L-asparagine was most effective at 0 M NaCl and did not fall below 80% of

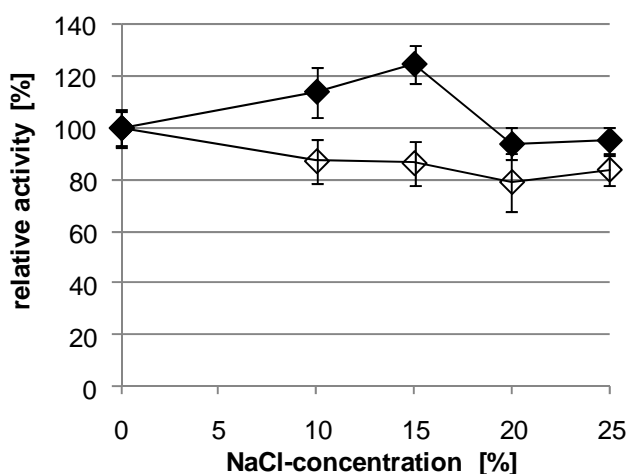


Abb. 10: NaCl tolerance of recombinant FvNase regarding the hydrolysis of L-glutamine (filled squares) and L-asparagine (open squares). Relative activity is expressed as a percentage of the activity at 0% NaCl.

the original activity at higher concentrations (Abb. 10). The different behavior of FvNase towards L-asparagine and L-glutamine under high salt conditions was confirmed by analyzing multiple samples. It can only be assumed that the conformation of the enzyme changes with increasing NaCl concentrations and develops a higher affinity towards L-glutamine. The NaCl tolerance of FvNase makes it a suitable candidate for its application in NaCl-rich production processes of the food industry such as soy sauce production which usually employs about 14-18% NaCl.

## 2.5 Conclusion

The asparaginase produced by the edible basidiomycete *Flammulina velutipes* showed a remarkable pH- and temperature-stability and was not inhibited by high NaCl-concentrations. It hydrolyzed both L-asparagine and L-glutamine. These properties render FvNase as an attractive enzyme for the food industry. Heterologous expression of active, soluble FvNase was readily available by coexpression of a fusion protein which was cleaved *in situ*. Further studies will aim at the heterologous expression in a food-grade *Bacillus*.

---

## 3 Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*

---

Reprinted from Process Biochemistry 2011;46:1840-1846 with permission of Elsevier

### 3.1 Abstract

The submerged cultivation of *Pleurotus ostreatus* var. florida on wheat gluten led to an increased solubility of the substrate. The coding sequence of one of the extracellular peptidases was obtained by PCR with degenerated primers and RACE. The sequence amounted to 1161 bp, translating into 386 aa with a molecular mass of 38.7 kDa. By comparison with homologous proteins the new enzyme was classified as a subtilisin-like peptidase of the proteinase K subfamily. *P. ostreatus* peptidase 1 (POP1) was expressed as a preproenzyme, whose 19 aa signal sequence was cleaved off during export into the extracellular space. The prosequence acted as an intramolecular chaperone and temporary inhibitor and was degraded in an autocatalytic process. The heterologous expression in *E. coli* resulted in the formation of inclusion bodies, from which the peptidase was refolded by using  $\beta$ -cyclodextrin and CTAB. POP1 showed optima at pH 7.5 and 37 °C. It was most stable at pH 8 and 30 °C. The peptidase was completely inhibited by PMSF, antipain and  $\text{Cu}^{2+}$ , while  $\text{Ca}^{2+}$  significantly enhanced its performance. The hydrolysis of *N*-Suc-AAPF-pNA was almost tripled in the presence of 5 M NaCl.

**Keywords:** *Pleurotus ostreatus*, basidiomycete, subtilase, salt activation, refolding,  $\beta$ -cyclodextrin

### 3.2 Introduction

Subtilases present the biggest family among the peptidases and have been identified in eukaryotes and prokaryotes [153]. Especially the subtilases of *Bacillus* sp. were characterized in detail, leading to a thorough understanding of their structure-function relationship [154].

They are usually synthesized as preproenzymes with a signal peptide for translocation and a propeptide acting as intramolecular chaperone and temporary inhibitor [155, 156].

*Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) belongs to the white-rot basidiomycota which secrete ligninolytic enzymes causing the typical white appearance of infested wood. The secretome of *P. ostreatus* contains peptidases which not only mobilize nitrogen sources but also play a role in the regulation of other extracellular enzymes [28, 40].

Condiments on the basis of fermented soy and wheat protein have a long tradition in the Asian cuisines. European equivalents were introduced in the 19<sup>th</sup> century. However, the use of hydrochloric acid for protein hydrolysis inevitably resulted in the formation of chloropropanols which proved to be toxic in animal tests [9]. Therefore, the use and optimization of enzyme cocktails have gained much interest. In order to achieve the sought-after umami taste, the efficient generation of glutamic acid and low molecular mass peptides is necessary [157]. On the other hand the formation of a bitter taste, usually associated with hydrophobic low molecular mass peptides, must be avoided [158, 159].

Submerged cultivation of *P. ostreatus* with wheat gluten resulted in the expression of a distinct peptidase pattern. The secreted enzyme cocktail was not only able to hydrolyze the soluble portion of wheat gluten but also greatly increased the overall solubility. In order to gain a more thorough understanding of the *P. ostreatus* peptidases, their individual characteristics have to be determined. Heterologous expression is a suitable way to characterize enzymes, bypassing the tedious process of purification from the native host and making the enzyme available in higher quantities within a short time. Furthermore, analysis of the primary sequence allows for provisional characterization and paves the way for protein engineering. In this report, the sequence of a 28 kDa extracellular peptidase from the mycelium of *P. ostreatus* was determined and the enzyme heterologously expressed, refolded and characterized.

### 3.3 Materials and Methods

#### 3.3.1 Cultivation of *P. ostreatus* var. *florida*

Maintenance and submerged cultivation of *P. ostreatus* var. *florida* (Institute for Forest Botany, Georg-August-University Göttingen) in SNL medium was performed as described in Zorn et al. [160]. Cultures for the induction of peptidase secretion were produced by inoculating minimal medium (1.5 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.5 g/L  $\text{MgSO}_4$ ; 1.0 mL/L trace metal solution

[160]) plus 4 % sterilized (8 h, 135 °C dry air) wheat gluten with the mycelium of 25 ml preculture grown in SNL medium.

### 3.3.2 SDS-PAGE and Decoupled 2D-PAGE

Semi-native and denaturing SDS-PAGE were performed with single gels [150]. For semi-native SDS-PAGE DTT in the twofold sample buffer (0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.2 M DTT, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and denaturing at 95 °C were omitted. Electrophoresis was performed in the Minigel-Twin System (Biometra) at 10-15 mA per gel and 4 °C or room temperature, respectively. Staining was performed with silver [161] or colloidal Coomassie Brilliant Blue [162]. Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad) were used for molecular mass determination. IEF polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a Multiphor II system (Pharmacia LKB, Schweden) using Servalyt™ Precotes™ precast gels with an immobilised pH gradient from 3 to 10 (Serva) for 3500 V h (2000 V, 6 mA, 12 W). The isoelectric point was determined by using a protein test mixture from pI 3.5 to 10.7 (Serva). The IEF gel was cut in the expected pI-area, placed on a polyacrylamide-gel and secured by polymerising it into a 6 % polyacrylamide-gel. Electrophoresis was carried out as described above.

### 3.3.3 Detection of peptidolytic activity

Detection of peptidolytic activity was performed in 96-well microtiter plates in 50 mM Tris/HCl pH 7, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, 0.2 mM *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe *p*-nitroanilide (Sigma) and 5 to 50 µL enzyme preparation in a total volume of 150 µL. The molar extinction coefficient of *p*-nitroaniline was determined at  $\epsilon^* = 5393 \mu\text{L}/\mu\text{mol}$  at 405 nm in a BioTek Synergy 2™ microtiter plate reader. One unit of peptidolytic activity was calculated as the amount of enzyme required to produce 1 µmol *p*-nitroaniline per minute. Azocasein (Sigma) was hydrolyzed by mixing 95 µL azocasein-solution (0.5 % azocasein, 50 mM Tris/HCl pH 7, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0-5 M NaCl) with 5 µL enzyme preparation and incubating the mixture at 37 °C over night. Protein was precipitated with 100 µL 6 % TCA and pelleted by centrifugation. The OD of the supernatant was measured at 366 nm in a BioTek Synergy 2™ microtiter plate reader. The protein concentration was estimated according to the Bradford method using bovine serum albumin as a standard [163]. Bradford reagent was purchased from Sigma. For visualization of peptidolytic activity zymography with 0.3 % gelatine in a polyacrylamide gel was performed. After electrophoresis the gel was washed twice in 2.5 % Triton X-100 for 20 min each and incubated in 50 mM Tris/HCl pH 7 for 1 h at 37 °C. Staining was performed with Coomassie Brilliant Blue. Inhibition studies were carried

out by incubating culture supernatant with 1 mM PMSF, 20 mM EDTA, 1 mM Pepstatin A or 1 mM NEM for 30 min at room temperature and subsequent zymography.

### 3.3.4 ESI Tandem MS Analysis of Tryptic Peptides

The peptidase bands were excised from SDS polyacrylamide gels, dried, and digested with trypsin. Analysis of the tryptic peptides was carried out as described [164].

### 3.3.5 cDNA-Synthesis and Sequence Fishing

RNA was prepared from 500 mg mycelium harvested on the fifth culture day stored in RNALater® (Invitrogen) using the NucleoSpin® RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, Düren). Synthesis of cDNA was performed as described in [164]. Consensus sequence based degenerate PCR Primers were designed with the CODEHOP algorithm [165]. PCRs were carried out in 2.5 µL 10x True Start® *Taq* buffer, 2 µL dNTP mix (2.5 mM ea.), 2 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 25 pmol forward primer, 25 pmol reverse primer, 0.8 µL DMSO, 0.625 U True Start® *Taq*, 1 µL ds cDNA and ddH<sub>2</sub>O to 25 µL. When proof-reading polymerase *Pfu* was used, 10x buffer, MgCl<sub>2</sub> and *Taq* were replaced by the respective reagents. Tab. 3 lists the primers used for sequence fishing.

Touchdown PCR [147] was performed by incubating the reaction mixture at 95 °C for 5 min, then for 12 cycles at 95 °C for 30 s, ( $T_m + 5 \text{ °C} - 1 \text{ °C/cycle}$ ) for 60 s and 72 °C for 1 min per expected kb. Another 28 cycles were carried out at  $T_m - 7 \text{ °C}$  annealing temperature. Final elongation was performed at 72 °C for 20 min. Standard PCR and cloning of PCR products

**Tab. 3: Primers used in PCR experiments**

Primer	$T_m$ [°C]	Sequence 5'→3'
ZymPOP1pBAD_fw	71	GCGGCCGCTCCTGCTTTGAAGACGG
aktPOP1pBAD_fw	66	GTCACCCAGACCAACGCTCCTTG
POP1pBAD_rev	61	AGCGTGGTGAGCCAAGTCG
pBAD_fw	58	TCTCTACTGTTTCTCCATACCC
pBAD_rev	58	GAAAATCTTCTCTCATCCGCC
POP1-Ba fw	72	CCCCGACGTCGAGTACATCdsngargaygg
POP1-Hc rev	72	CGAGGCCAGCGATGtgngngngtngc
POP1-3' fw	62	CGTTGATGTCTTCGCTCCTGG
POP1-5' rev	64	GAGACAGTCCCCAAGGAGCG
POP1-Start fw	61	ATGCGTCTCTTCTCTGCTG
POP1-Stop rev	61	TTAAGCGTGGTGAGCCAAG

**Tab. 4: Construction of expression vectors.**

Expression plasmid	Expression vector	Primer	Ligation strategy
ZymPOP1pBAD	pBAD/gIII C	ZymPOP1pBAD_fw POP1pBAD_rev	vector cut with XbaI, overhang blunted vector and insert cut with NotI
aktPOP1pBAD	pBAD/gIII A	aktPOP1pBAD_fw POP1pBAD_rev	vector cut with NcoI and XbaI, overhangs blunted

were performed as described in [164]. Sequence homology was investigated through a GenBank data base search using BLAST [149]. Alignments were produced by CLUSTALW [166] and edited with BioEdit [167]. Prediction of a N-terminal signal sequence was carried out by analysis with Signal P 3.0 [148].

### 3.3.6 Construction of Expression Plasmids

Digestion, blunting and ligation of pBAD/gIII vectors (Invitrogen) and inserts were performed with FastDigest® restriction enzymes, T4 DNA polymerase and T4 DNA ligase (Fermentas) according to the recommendations of the manufacturer (Tab. 4). The ligation product was cloned and sequenced as described above. Freezer stocks were prepared by adding 0.1 mL of 80 % glycerol (w/v) to 1 mL saturated culture and stored at -70 °C.

### 3.3.7 Heterologous Expression of POP1

Small scale cultures were prepared by inoculating 10 mL TB (12 g/L trypton, 24 g/L yeast extract, 4 mL/L glycerol; 0.1 volumes of 1 M KHPO<sub>4</sub> pH 7.5 are added after sterilization) containing 50 µg/mL carbenicillin with overnight culture to an OD<sub>600 nm</sub> = 0.1 and cultivation at 37 °C and 225 rpm. At an OD<sub>600 nm</sub> = 1 recombinant protein production was induced with 0.05 % L-arabinose (Roth). Cultures were grown for 4 h and the cells harvested by centrifugation. Large scale cultures were carried out accordingly in 1 L baffled flasks with 500 mL culture volume at 37 °C and 150 rpm.

### 3.3.8 Purification of POP1 inclusion bodies

Harvested cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA; 1/10 of culture volume) with 0.1 % Triton X-100. 0.5 mg/mL lysozyme (Sigma) was added and the mixture incubated for 5 min at 37 °C in a shaking water bath. 500 U Benzonase® (Merck) and 4 mM MgCl<sub>2</sub> were added and the cells lysed for another 30 min. After centrifugation (10,000 g, 10 min) the pellet was washed twice with lysis buffer and solubilized in binding buffer (20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM imidazole, 6 M guanidinium HCl, 0.1 % CTAB (w/v), 5 % glycerol (w/v) pH 7.5; 1/10 of culture volume) for

2 h at room temperature. Remaining cell debris was removed by centrifugation at 20,000 g for 30 min and filtering the supernatant through a 0.45  $\mu\text{m}$  PES-membrane (Roth).

Purification was performed at 4 °C by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) with BioScale™ Mini Profinity™ IMAC cartridges on a BioLogic DuoFlow System (Bio-Rad). FPLC buffers were composed as binding buffer with 10 mM and 100 mM imidazole for the washing buffer and elution buffer, respectively. Flow rates were kept at 1 mL/min. The column was equilibrated with five column volumes (CV) of binding buffer, loaded with the solubilizate, washed with 6 CV binding buffer, followed by 6 CV washing buffer and 10 CV elution buffer. The purification process was monitored at 280 nm and collected fractions were analyzed by SDS-PAGE after precipitation with 0.46 volumes of 0.55 % TCA, neutralizing the pellet by washing with acetone and subsequent dissolving of the pellet in loading buffer.

### 3.3.9 Renaturation of POP1

Concentration of purified POP1 was determined at 280 nm. The molar extinction coefficient of his-tagged POP1 zymogen was calculated to be  $\epsilon=28020$  L/mol\*cm, that of his-tagged mature POP1  $\epsilon=22520$  L/mol\*cm. Renaturation of POP1 was carried out in a total volume of 30 mL consisting of 0.3 mL purified POP1, 0.4 mM detergent, 50 mM Tris/HCl pH 7, a 10000 times molar excess of  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and ddH<sub>2</sub>O to the final volume. Triton X-100, Brij 35 or CTAB were used as detergents. The renaturation mixture was incubated at 4 °C and gentle agitation for 24, 44 and 68 h. It was then processed by filtering through a 0.22  $\mu\text{m}$  PES-membrane, followed by concentrating and washing twice with 50 mM Tris/HCl pH 7 in a 15 ml Vivaspin centrifugal concentrator with a 10,000 MWCO (Sartorius).

### 3.3.10 Additives

The reaction mixture was complemented with either one of the following salts: NaCl, KCl, LiCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> at 10 mM or MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> or Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> at 1 mM, respectively.

### 3.3.11 Temperature and pH-Optima

Determination of the pH-optimum was carried out in 50 mM acetate (pH 4.5, 5.0, 5.5), MES (pH 6.0, 6.5), HEPES (7.0, 7.5, 8.0) and borate (pH 8.5, 9.0, 9.5, 10.0), respectively. The buffers were complemented with 500 mM NaCl and 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Temperature optimum was determined in 10 °C intervals between 10 °C and 50 °C. Temperature stability was examined

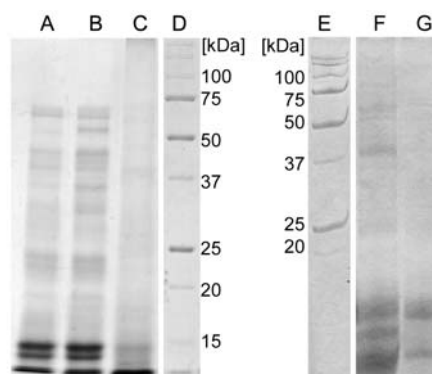
by incubating the enzyme preparation at 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C or 55 °C for 30 min and subsequently measuring the activity at 37 °C.

### 3.4 Results and Discussion

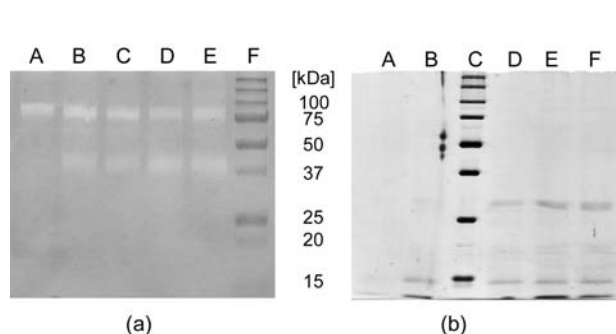
#### 3.4.1 Analysis of Culture Supernatant

Submerged cultivation of *P. ostreatus* in minimal medium with 4 % wheat gluten resulted in a visible increase of the solubility of gluten. This was confirmed by SDS-PAGE analysis of the hydrolysis of a 2 % gluten suspension with concentrated *P. ostreatus* culture supernatant for 18 h at 40 °C, which resulted in complete degradation of the distinct protein pattern of gluten (Abb. 11). Zymography of the supernatant of *P. ostreatus* cultivated in minimal medium with 4 % gluten showed peptidase bands from the first culture day on with a stable reappearance of two peptidase bands at about 75 kDa and 40 kDa (Abb. 12a).

Incubating samples with PMSF, EDTA, Pepstatin A, NEM or Aprotinin prior to zymography showed a decrease in the activity of the 75 kDa band for PMSF only, indicating a serine peptidase. The observation that there was no inhibition by aprotinin excluded trypsin- and



**Abb. 11:** Effect of *P. ostreatus* peptidase cocktail and recombinant POP1 on gluten. A 2 % gluten suspension was incubated with concentrated culture supernatant, refolded recombinant POP1 or the respective chemical and biological blanks for 18 h at 40 °C and then subjected to denaturing SDS-PAGE. A: 2 % gluten suspension; B: 2 % gluten suspension with heat inactivated culture supernatant; C: 2 % gluten suspension with culture supernatant; D, E: standard; F: 2 % gluten suspension; G: 2 % gluten suspension with refolded recombinant POP1.



**Abb. 12:** Secretome of *P. ostreatus* cultivated in minimal medium with 4 % gluten. The culture was inoculated with mycelium from a preculture in SNL medium. (a) Zymography with culture supernatant samples. A-E: culture days 1-5; F: standard. (b) Denaturing SDS-PAGE with culture supernatant samples. C: standard; A-B/D-E: culture days 1-5.

chymotrypsin-like peptidases. Denaturing SDS-PAGE analysis of the culture supernatant showed the successive development of prominent bands at 28 kDa, 17-20 kDa and 13 kDa (Abb. 12b). Further analysis of concentrated culture supernatant by decoupled 2D-PAGE revealed that the 75 kDa peptidase band contained two peptidases with isoelectric points of approximately 4.5 and 4.6 (Abb.



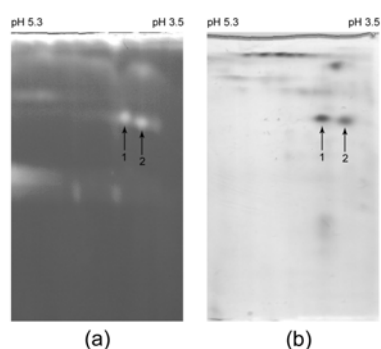


Abb. 13: Decoupled 2D-PAGE of *P. ostreatus* culture supernatant. Spots 1 and 2 indicate POP1 and PoSI, respectively. (a) Diluted culture supernatant (1:100) was subjected to decoupled 2D-zymography and incubated overnight at room temperature. (b) Coomassie stained 2D-PAGE of undiluted culture supernatant.

13). The peptidase with the pI of 4.6 showed a molecular mass of 28 kDa after denaturing SDS-PAGE, thus corresponding to the 28 kDa band in Abb. 12b, while the other did not show a change in electrophoretic mobility after denaturation. Both were analyzed by ESI-MS/MS after tryptic digestion. The 75 kDa band was identified as PoSI, a subtilase characterized by Faraco et al. [28]. From the 28 kDa band two peptide sequences were obtained, and database research confirmed a new subtilisin-like peptidase which was then named *Pleurotus ostreatus* peptidase 1 (POP1) and patented [168].

### 3.4.2 Sequence of POP1

Subtilase sequences of *Hypsizygus marmoreus* (ABL98208) and *Coprinopsis cinerea* (EAU82190, EAU82213) were used to design degenerated primers with the CODEHOP algorithm. The combination of primers POP1-Ba fw and POP1-Hc rev amplified a 774 bp sequence whose translation included the two known peptide sequences and showed distinct homology to other fungal subtilases. The missing 5'- and 3'-fragments were obtained by the combination of the respective adapter primers with specific primers POP1-5' rev and POP1-3' fw, respectively. For confirmation, the entire sequence of *pop1* was amplified with *Pfu*-polymerase, which had an ORF of 1161 bp and translated into 386 aa with a molecular mass of 38.7 kDa.

While subtilases can differ dramatically considering amino acid sequence and size or number of  $\text{Ca}^{2+}$  binding loops, the catalytic triad Asp, His and Ser as well as the oxyanion-hole residue Asn and their immediate surroundings are highly conserved [153]. This allowed for the classification of POP1 as a member of the proteinase K subfamily and the identification of Asp147, His178, Ser333 and Asn268 as the residues which catalyze the cleavage of peptide bonds (Abb. 14a). Signal P 3.0 predicted a hypothetical 19 aa signal sequence at the N-terminus which is cleaved off after the export into extracellular space. Furthermore, an inhibitor I9 domain was identified after the signal sequence (aa 36-100), followed by the catalytic domain (Abb. 14b). Thus, POP1 is a preproenzyme, which is exported as a zymogen and activated in the extracellular space by cleaving the

prosequence. With 25 % charged amino acid residues (Asp, Glu, Arg, Lys, His), the prosequence is noticeably biased compared to the remaining mature sequence which contains 11.5 % only. This phenomenon has been observed with other zymogens, too [169, 170]. X-Ray crystallography of other subtilases showed that the area of the substrate binding region tends to be hydrophobic. It is assumed that this site is covered by the prosequence until it is processed [171].

## (a)

POP1	MRLFSAVLALSLAILLAP--AFAAP-----ALKTVESEFAQRNDGSFIVKLSGASRSGLLKTLC-----VNATHEWDAA--LNGFAG	72
<i>Cci</i>	MKFFSVLAAAGLAVIMAVPTLAAPAPAPAPPGRRLKSIERFOGATT--GKYIVKFKKGASRRNYLNKLNK-----LKASADWDI--LNGFAA	81
<i>Abi1</i>	--MHFSLSPATLALLVAS--AVGAPA-----AIHSIETFDEGETT--GKHIIIMLKEGVKKEDELFANFKA----KVAVSHQWEL--INGFAG	73
<i>Abi2</i>	--MRPLPSFALALLVAS--ALGAPT-----AIHSIETFDEGETS--GKHIIITLKGQVKKEDLFKNLKA----KVSVSHHEWEV--INGFAA	73
<i>Hma</i>	MRFETAVLTAIALAAP--VFAFPT-----PLRTVEKYQQT--GKYIVKLDGASKSAIFSKLKN-----STVTHDWKL--INGFAG	72
<i>Gfr</i>	-----MASEPD-----NLELERTACDKKSSYIVRLKPGVDKSVHLTWLRRERLSRNSIEITHDYTSGLNLAFAAG	63
*		
POP1	KFSKALNALRASPDVESISEDGMHTFVTQTNAPWGLSRLLTSATRLTNNVAALTFITYTYDASAGSGVDVVFVDTGIFTSHSQFGGRAR	162
<i>Cci</i>	DLDEAALDELASDDVHYVAEDGIMHAFVTQTNAPWGLQRITOPGRLASQSTSANYNFTYDASAGAGVDIYVVDTGVTSHSDDFGGRAR	171
<i>Abi1</i>	EFDEETLNELRANPNVESISEDGMHTMTTQTNAPWGLARLSSTRLSNQNAALTFEYTFDASAGSGVDIFIVDTGILLTSHSQFGGRAA	163
<i>Abi2</i>	EFDEETLNELRANPNVESIETDGLMHTMSQTNAPWGLARLSSTRLSNQNPSSLETFEYTFDDASAGAGVDIYVVDTGIFIEHTEFGGRAT	163
<i>Hma</i>	DLDSATVNLRASPDVBYIAEDGIVHTFVTQTNAPWGLARLSQDARLSNODTSALTFITYTYDASAGAGVDIYIMDTGVFTTSHSQFGGRAR	162
<i>Gfr</i>	KFDEETLNLFRASPDVENISEDSIVQGFRTQDNAPWGLNRIISQGPLANONPFATNFVYTYNNNPQYGVDIYVVDTGVLTSHTFEGGRAT	153
*		
POP1	WGATFGPYADADGNHGHTCAGTIGSSQFGVARSVNLIVAVKVLSDGGSGSVADIVSGLNLFVLSRARSSGRPSIVMSLGGGGASTALDNAV	252
<i>Cci</i>	WGVSY-VSESTDGNGHGHTCAGTAAGTRFGVARRANLHAVQVNLNRSGGGATSGHVSGLQWLNQARASGRPSVVSMSLGGGGASTATDNAV	260
<i>Abi1</i>	WGETFGPYADRDGNHGHTHVAAGTAAGSQFGVARSANVFAVKVLSDEGGSGITDIVSGLNLFVQORASSGRPTIASMSLGGGGASSSLDSAV	253
<i>Abi2</i>	WGETFGPYADADGNHGHTHISGTAAGRQFGVARSANLIVAVKVLSDGGSGTISDIIISGLNFVAQRAASTGRPAVITLLALGGGASTVLDNAV	253
<i>Hma</i>	WGATFGGYASADGNHGHTVSGTAAGSQFGVARSANLIVAVKVLSDGGSGSLAVVSGTINWVATAAAAASGRPSVAVSLSLGGGVSTPLDNAV	252
<i>Gfr</i>	WGYTAPGLPAQDDNGHGTGVAVAACCTYYGVARSGMSLIVAVKVLNFANTEITTSNLLSGMEYVWNTARASGRPSVNVNVSFCESANTSIDNGV	243
*		
POP1	ASLTAGGVHVVVAAGNSNVDAAGTTPARAPSAITVGASTITDTRASFNSFGSVVDVFPAGQDVISSWIGSTTATNRIISGTSMATPHVAGL	342
<i>Cci</i>	AQLTAAGLHVVAAGNSNVDAANTSPARAPSAITVAASTIADAKASYSNYCAVITDVWAPGSNLLSAWIGSNTATNRIISGTSMATPHVAGV	350
<i>Abi1</i>	ASLTNSGVHVTVAAGNDNANANANTSPARAPSAITVGASTITGDARAFSFGSVVDVFPAGQSVISSWIGSNTDINCLISGTSMATPHVAGL	343
<i>Abi2</i>	ASLTSSGIHVVAAGNSNADASNTPARAPSAITVGASTITSDSRISFGSVVDVFPAGQNVISAWIDSPSTINTLISGTSMAAAHVAGV	343
<i>Hma</i>	TALIVAGIHVTVAAGNSNADASTTPARAPAVLTVGASTIADARAFSFGSVVDVFPAGQNVISWIGSTTATNRIISGTSMATPHVAGL	342
<i>Gfr</i>	LSLTQAGIHVVAAGNINIDASGITSPARSQHCTIVGATITGDARWANSNYGFVLDVFPAGVDILTASKDSITATQWATGTSFAAPFVTCI	333
*		
POP1	AAYLIALNGNSSPAALSTTIKSLSLKGVLSGIPSGTLNDLAHHA--	386
<i>Cci</i>	VAYLIGRDGNISPAAMATKIKNLAVKNVLSGVPSGTINALLQI---	393
<i>Abi1</i>	VAYLISLQGNVSPAAMSTKIKSLSLKGVLSGIP-----	376
<i>Abi2</i>	VAYFTGLEGNVSPASMSAKIHARSLKSALLGVRE-----	377
<i>Hma</i>	VAYLIAKNNSPASTAATHQSLSVKNALSGIPSGTVNFLANNA--	386
<i>Gfr</i>	IASFTSQLGNKLPAEMLLFVRETAQRDITDIDFCTVNLNNGHQ	379

## (b)

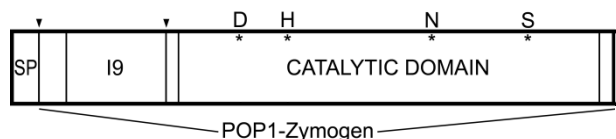
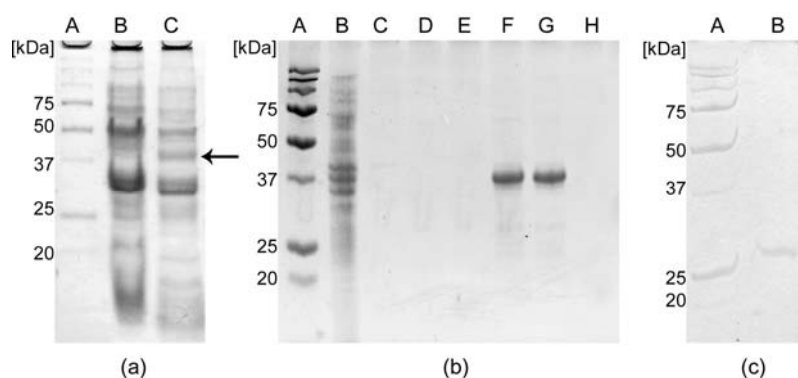


Abb. 14: (a): Sequence alignment of the amino acid sequence of POP1 (acc. no. ACR25273.1) with related serine peptidases from *C. cinerea* (*Cci*, acc. no. XP\_001839622.1), *A. bisporus* (*Abi1* and *Abi2*, acc. no. CAA74137.1 and CAC83024.1), *H. marmoreus* (*Hma*, acc. no. ABL98208.2) and *G. frondosa* (*Gfr*, acc. no. BAC57455.1). Asterisks denote the amino acids that form the catalytic triad (D147, H178, S333) and the oxyanion (N268). Peptide sequences determined by ESI-MS/MS are boxed. (b): Schematic representation of POP1 and its domains. SP: signal peptide; I9: Inhibitor I9; D, H, S: active site residues of the catalytic domain; N: oxyanion residue. The arrows indicate the sites where signal peptide and prosequence are cleaved off.

### 3.4.3 Heterologous Expression and Renaturation

Heterologous expression of his-tagged POP1 zymogen or its mature sequence resulted in the formation of inclusion bodies (Abb. 15a). Common optimization principles to promote soluble expression (lowering cultivation temperature and inductor concentration, using different expression vectors or *E. coli* strains) did not yield active peptidase. Thus, inclusion bodies were solubilized with 6 M guanidine HCl and purified by IMAC (Abb. 15b). Different renaturation protocols used with other subtilases, such as rapid dilution or step-wise dialysis, were not successful in the case of POP1 [36, 172-175]. In contrast, it was possible to obtain active POP1 from the zymogen inclusion bodies in the presence of CTAB and  $\beta$ -cyclodextrin. Activity was doubled by the addition of 10 mM  $\text{CaCl}_2$  to the renaturation mixture.  $\text{Ca}^{2+}$  is known to stabilize the majority of subtilases which explains the enhancement of the activity [176]. Attempts to refold POP1-Zymogen without  $\beta$ -cyclodextrin or in the presence of Brij 35 or Triton X-100 instead of CTAB failed (results not shown). The mechanism of the renaturation of proteins by  $\beta$ -cyclodextrin is not fully resolved. It is proposed that the detergent solubilizes the protein which prevents it from misfolding and aggregating. The addition of  $\beta$ -cyclodextrin strips the protein from the detergent and therefore initiates folding, whilst maintaining a system which prevents aggregation [99]. Using this method, peptidolytic activity of up to 3 U/mg was achieved.

The dependency of subtilases on their prosequence has been extensively studied. The role



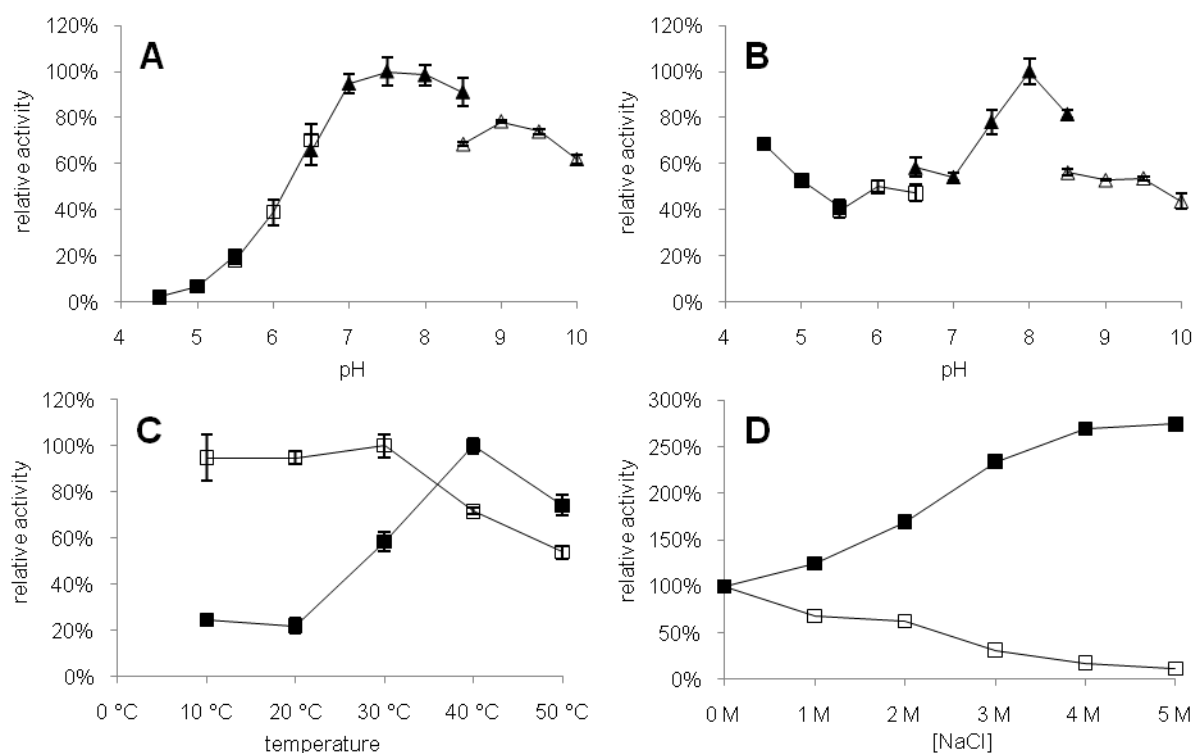
**Abb. 15: Heterologous expression, purification and autoprocessing of POP1-Zymogen.** (a) Comparison of the insoluble fractions of lysed TOP10 cells four hours after induction with 0.05 % l-arabinose. A: standard; B: negative control with pBAD/gIII expression vector; C: expression of ZymPOP1 as inclusion bodies. (b) Purification of ZymPOP1 by denaturing  $\text{Ni}^{2+}$ -IMAC in the presence of 6 M Gdn-HCl. All samples were precipitated with TCA prior to electrophoresis. A: standard; B: solubilized; C-E, H: pooled wash (5-10 mM imidazole) and elution fractions (100 mM imidazole); F-G: elution fractions containing ZymPOP1. (c) After refolding the prosequence is cleaved off and leaves catalytically active POP1 with a molecular mass of 28 kDa. A: standard; B: mature POP1.

as an intramolecular chaperone and temporary inhibitor which mediates folding and prevents autolysis made it possible to renature different subtilisins after denaturation [36, 174]. The folding of POP1 was dependent on its prosequence as well. Renaturation of only the recombinant catalytic domain of POP1 was not

successful. However, after renaturation POP1-zymogen processed into the 28 kDa peptidase by cleaving off the prosequence (Abb. 15c). When kept at 4 °C a slow rise of catalytic activity was observed, another indication that the prosequence is necessary for folding (results not shown).

### 3.4.4 Characterization

Recombinant POP1 showed a pH-optimum at pH 7.5 but retained at least 60 % activity from pH 6.5 to 10 (Abb. 16A). The peptidase was most stable at pH 8.0. Incubating POP1 in borate buffer led to a significant loss of activity at pH 8.5 compared to HEPES buffer at the same pH but the residual activity remained rather stable from pH 8.5-10. Overall, POP1 retained at least 40 % of its original activity in a broad range from pH 4.5-10 (Abb. 16B). The optimal temperature was 40 °C and POP1 retained its activity up to 30 °C when subjected to higher temperatures for extended periods of time (Abb. 16C). Subtilases from *H. marmoreus* [177]



**Abb. 16: Optima and stability of recombinant POP1 at different pH-values or temperatures and the influence of NaCl.** Each measurement was performed in triplicates. All buffers were supplemented with 500 mM NaCl and 10 mM CaCl<sub>2</sub> unless stated otherwise. A: Determination of pH-optimum was performed in 50 mM acetate pH 4.5-5.5 (filled squares), MES pH 5.5-6.5 (open squares), HEPES pH 6.5-8.5 (filled triangles) or borate pH 8.5-10.0 (open triangles). B: Determination of pH-stability was performed by incubation of recombinant POP1 in 50 mM acetate pH 4.5-5.5 (filled squares), MES pH 5.5-6.5 (open squares), HEPES pH 6.5-8.5 (filled triangles) or borate pH 8.5-10.0 (open triangles) for 2 h at room temperature. Activity assay was performed in 50 mM Tris/HCl pH 7. C: Temperature optimum (filled squares) was determined at the respective temperatures. Temperature stability assays (open squares) were performed by measuring the residual activity at 37 °C after incubation for 30 min at the respective temperature. D: Effect of 0-5 M NaCl on the hydrolyzing activity of *N*-Suc-AAPF-pNA (filled squares) and azocasein (open squares). Standard deviation values did not exceed 5 %.

and *G. frondosa* [36] showed temperature optima at 50 °C, and the latter retained at least 80 % of its activity when incubated at temperatures up to 50 °C for 15 min, compared to 54 % residual activity of POP1 after being subjected to 50 °C for 30 min. POP1 was prone to autolysis, hence its activity dropped by 30 % within 30 min when exposed to temperatures higher than 35 °C due to the accelerated hydrolysis velocity. Besides this, the thermolability can also be explained by the missing glycosylation.

Complete inhibition was achieved with 1 mM PMSF or antipain, respectively. EDTA caused a decrease of activity by 57 %, which illustrates the dependence of POP1 on  $\text{Ca}^{2+}$ . Accordingly,  $\text{Ca}^{2+}$  had the most enhancing effect among the tested cations, while  $\text{Cu}^{2+}$  inhibited POP1 almost quantitatively (Tab. 5). This effect of  $\text{Cu}^{2+}$  on subtilases has been reported in several cases [177-179], but there is no explanation for this observation so far.

When NaCl was added to the *N*-Suc-AAPF-*p*-NA assay, a considerable increase of activity was noted. With azocasein as the substrate under the same conditions, the hydrolyzing ability dropped significantly (Abb. 16D). This showed that the activation was caused by a change in the substrate conformation rather than an alteration of the reaction medium or a change of the conformation of the enzyme. As a matter of fact the coagulation of azocasein was observed when added to a solution of >4 M NaCl and hydrolysis stopped.

An activation of peptide hydrolysis by NaCl was not reported for a basidiomycetous peptidase so far. However, halotolerant subtilisin-like peptidases from different prokaryotes, e.g. *Halobacterium*

**Tab. 5: Activity of recombinant POP1 after incubation with different inhibitors for 30 min at room temperature or after supplementation of the reaction mixture with different cations, respectively. The relative activities were normalized to a sample without any additives.**

additive	concentration	relative activity
EDTA	20 mM	43%
PMSF	1 mM	0%
Antipain	1 mM	0%
$\text{Na}^+$	10 mM	88%
$\text{K}^+$	10 mM	103%
$\text{Li}^+$	10 mM	95%
$\text{Mg}^{2+}$	10 mM	96%
$\text{Ca}^{2+}$	10 mM	132%
$\text{Mn}^{2+}$	1 mM	107%
$\text{Zn}^{2+}$	1 mM	45%
$\text{Co}^{2+}$	1 mM	113%
$\text{Cu}^{2+}$	1 mM	2%
$\text{Ni}^{2+}$	1 mM	76%
$\text{Mo}^{2+}$	1 mM	94%
$\text{Se}^{2+}$	1 mM	113%

*halobium*, *Virgibacillus* sp. SK33 and *Bacillus thermoproteolyticus* share this property.

When refolded POP1 was incubated with a 2 % gluten suspension, a gradual change of the genuine protein pattern of gluten was detected (Abb. 11). The degradation of high and low molecular mass fractions was obvious, but less pronounced compared with the culture supernatant. This is explained by a synergistic effect of the cocktail of peptidases present in the supernatant which results in a faster hydrolysis.

With its tolerance towards NaCl, the broad pH-stability and the specificity of subtilases for hydrophobic residues, POP1 might be a valuable contributor to an enzyme cocktail for the hydrolysis of plant protein, where high concentrations of NaCl are applied and the formation of bitter peptides needs to be avoided.

### 3.5 Acknowledgements

This work was supported by Nestlé S.A., Vevey, Suisse.

---

## 4 Ausblick

---

Basidiomyceten besitzen ein annähernd unerschöpfliches Potenzial an Enzymen, welches bisher wenig genutzt wird. Durch ihre Lebensweise auf schwer abbaubaren lignin- und terpenreichen Substraten sind diese Organismen darauf spezialisiert, die vorhandenen Ressourcen optimal auszunutzen. Die Erschließung und Etablierung von Enzymen, die den Ansprüchen an Verfügbarkeit und Prozessstabilität für industrielle Anwendungen genügen, ist eine der Herausforderungen an Forschung und Technik in den kommenden Jahren.

Das Potenzial der Basidiomyceten schlägt sich auch in der Vielfalt der exprimierten Hydrolasen nieder: So wurden aus *F. velutipes* neun verschiedene Peptidasen identifiziert, die durch die Kultivierung mit Weizengluten induziert wurden [49]. Die kodierenden Sequenzen von fünf dieser Peptidasen sind inzwischen bestimmt worden (unveröffentlichte Daten). Aus anderen Basidiomyceten, wie *Wolfiporia cocos*, wurden erfolgreich Aspartat-Peptidasen isoliert und charakterisiert, die sich für die Käseherstellung eignen [180-182]. Die in dieser Arbeit beschriebene Subtilase aus *P. ostreatus* verursachte eine sichtbare Veränderung des elektrophoretischen Proteinmusters von Weizengluten. Daraus ergibt sich nicht nur eine Applikation für die Herstellung von Würzmitteln aus hydrolysiertem Pflanzenprotein. Subtilasen allein können als Endopeptidasen nicht die extensiven Hydrolysegrade eines Cocktails aus Endo- und Exopeptidasen erreichen. Bei der Herstellung von funktionellen Proteinhydrolysaten ist dieses aber auch nicht erwünscht. Eine Anwendung in der Herstellung von emulgierenden oder schäumenden Hydrolysaten ist demnach ebenso vorstellbar [183].

Ebenso konnte in weiteren Basidiomyceten, wie zum Beispiel *Laetiporus sulphureus*, Asparaginase-Aktivität nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Aktuell gibt es Bestrebungen, die Asparaginase aus *F. velutipes* in *Bacillus* heterolog zu exprimieren. Durch die Acrylamid-Problematik ist das Interesse an neuen Asparaginasen sprunghaft angestiegen und Basidiomyceten sind offensichtlich eine geeignete Quelle für deren Erschließung.

Die zunehmende Anzahl an sequenzierten und annotierten Basidiomyceten-Genomen wird die Erschließung neuer Enzyme deutlich vereinfachen. Die molekularbiologische Charakterisierung dieser Enzyme eröffnet darüber hinaus die Möglichkeit, durch Mutation

der Primärsequenz die Eigenschaften des Proteins gezielt zu verändern, um sie an den jeweiligen industriellen Prozess anzupassen. Sowohl für Subtilasen, als auch Asparaginasen gibt es bereits Daten zu den Auswirkungen von gezielten Mutationen [138, 154, 175]. Da die Asparaginase aus *F. velutipes* keine Homologien zu anderen Asparaginasen zeigt, wird es nur eingeschränkt möglich sein, auf diese Daten zurückzugreifen. Für die potentielle Modifikation der Subtilase kann sich das vorhandene Wissen jedoch als vorteilhaft erweisen.

Die stetig zunehmende Datenlage in Bezug auf die biotechnologische Anwendung von Enzymen aus Basidiomyceten, gleichgültig ob als Wildtyp oder in rekombinanter Form, zeigt, dass das Interesse an Basidiomyceten deutlich gestiegen ist. Es wird weiterhin viel Forschungsbedarf bestehen, um das Potenzial der Basidiomyceten voll auszuschöpfen.



---

---

## 5 Literatur

---

---

- [1] Nielsen PM. Enzymes in protein modification. In: Whitehurst RJ, van Oort M (Editors). *Enzymes Food Technology* 2nd. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2010. p. 292-319.
- [2] Gayte-Sorbier A. Protein hydrolysate aromas and aroma enhancers in the food industry. *Industries Alimentaires et Agricoles* 1977;94:291-298.
- [3] Manley CH, McCann JS, Swaine RL, Jr. The chemical bases of the taste and flavor enhancing properties of hydrolyzed protein. *Qual Foods Beverages: Chem Technol*, [Proc Symp Int Flavor Conf], 2nd 1981;1:61-82.
- [4] Nagodawithana TW. Savory flavors. *Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients* 1994:135-168.
- [5] Swaine RL, Jr. Hydrolyzed vegetable protein as a flavoring agent. *Perfum Flavor* 1993;18:35-38.
- [6] West S. Production of flavors, flavor enhancers and other protein-based specialty products. In: R. A. Rastall (Editors). *Novel Enzyme Technology for Food Applications*. Cambridge, UK: Woodhead; 2007. p. 183-204.
- [7] Schlichtherle-cerny H, Affolter M, Cerny C. Taste-active glycoconjugates of glutamate: New umami compounds. *ACS Symp Ser* 2004;867:210-222.
- [8] Sim CW, Muhammad K, Yusof S, Bakar J, Hashim DM. The optimization of conditions for the production of acid-hydrolysed winged bean and soybean proteins with reduction of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD). *Int J Food Sci Technol* 2004;39:947-958.
- [9] Velíšek J, Davidek J, Hajšlová J, Kubelka V, Janíček G, Mánková B. Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Z Lebensm Unters Forsch* 1978;167:241-244.
- [10] Velíšek J, Dolezal M. Flavor changes during alkaline treatment of protein hydrolysates. *Developments in Food Science* 1994;35:367-371.
- [11] Weir GSD. Protein hydrolysates as flavorings. *Dev Food Proteins* 1986;4:175-217.
- [12] Pommer K. New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients. *Cereal Foods World* 1995;40:745-748.
- [13] Nakadai T, Nasuno S. Utilization of preparation of proteases for soy sauce manufacture (VI). Use of glutaminase for soy sauce made by koji or a preparation of proteases from *Aspergillus oryzae*. *J Ferment Bioeng* 1989;67:158-162.
- [14] Liao L, Liu T-X, Zhao M-M, Cui C, Yuan B-E, Tang S, Yang F. Functional, nutritional and conformational changes from deamidation of wheat gluten with succinic acid and citric acid. *Food Chem* 2010;123:123-130.
- [15] Schlichtherle-Cerny H, Amado R. Analysis of Taste-Active Compounds in an Enzymatic Hydrolysate of Deamidated Wheat Gluten. *J Agric Food Chem* 2002;50:1515-1522.

- [16] Nandakumar R, Yoshimune K, Wakayama M, Moriguchi M. Microbial glutaminase: Biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. *J Mol Catal B: Enzym* 2003;23:87-100.
- [17] Blank I, Robert F, Goldmann T, Pollien P, Varga N, Devaud S, Saucy F, Huynh-Ba T, Stadler RH. Mechanisms of acrylamide formation: Maillard-induced transformation of asparagine. *Adv Exp Med Biol* 2005;561:171-189.
- [18] Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 2002;419:448-449.
- [19] Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert MC, Riediker S. Food chemistry: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 2002;419:449-450.
- [20] Granvogl M, Schieberle P. Thermally Generated 3-Aminopropionamide as a Transient Intermediate in the Formation of Acrylamide. *J Agric Food Chem* 2006;54:5933-5938.
- [21] Friedman M, Levin CE. Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J Agric Food Chem* 2008;56:6113-6140.
- [22] Rommens CM, Yan H, Swords K, Richael C, Ye J. Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnol J* 2008;6:843-853.
- [23] Weißhaar R. Acrylamide in Bakery Products - Results from Model Experiments. *Deut Lebensm-Rundsch* 2004;100:93-97+i.
- [24] Bouws H, Wattenberg A, Zorn H. Fungal secretomes-nature's toolbox for white biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;80:381-388.
- [25] Krügener S, Krings U, Zorn H, Berger RG. A dioxygenase of *Pleurotus sapidus* transforms (+)-valencene regio-specifically to (+)-nootkatone via a stereo-specific allylic hydroperoxidation. *Bioresour Technol* 2009;101:457-462.
- [26] Zorn H, Fraatz MA, Riemer SJL, Takenberg M, Krings U, Berger RG, Marx S. Enzymatic synthesis of nootkatone by oxidation of valencene. International Patent. WO 2010060898.
- [27] Lomascolo A, Stentelaire C, Asther M, Lesage-Meessen L. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnol* 1999;17:282-289.
- [28] Faraco V, Palmieri G, Festa G, Monti M, Sannia G, Giardina P. A new subfamily of fungal subtilases: structural and functional analysis of a *Pleurotus ostreatus* member. *Microbiology* 2005;151:457-466.
- [29] Burton KS, Partis MD, Wood DA, Thurston CF. Accumulation of serine proteinase in senescent sporophores of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycol Res* 1997;101:146-152.
- [30] Burton KS, Hammond JBW, Minamide T. Protease activity in *Agaricus bisporus* during periodic fruiting (flushing) and sporophore development. *Curr Microbiol* 1994;28:275-278.
- [31] Burton KS, Smith JF, Wood DA, Thurston CF. Extracellular proteinases from the mycelium of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycol Res* 1997;101:1341-1347.
- [32] Burton KS, Wood DA, Thurston CF, Barker PJ. Purification and characterization of a serine proteinase from senescent sporophores of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol* 1993;139:1379-1386.

- [33] Kingsnorth CS, Eastwood DC, Burton KS. Cloning and postharvest expression of serine proteinase transcripts in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Fungal Genet Biol* 2001;32:135-144.
- [34] Grimrath A, Berends P, Rabe S, Berger RG, Linke D. Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*. *Eur Food Res Technol* 2010;232:415-424.
- [35] Hummel KM, Inselman AL, Ramos ER, Gathman AC, Lilly WW. Extracellular protease production by submerged cultures of *Schizophyllum commune*. *Mycologia* 1998;90:883-889.
- [36] Islam MM. Molecular cloning, expression and characterization of a serine proteinase from Japanese edible mushroom, *Grifola frondosa*: Solving the structure - Function anomaly of a reported aminopeptidase. *Electron J Biotechnol* 2008;11.
- [37] Nishiwaki T, Hayashi K. Purification and characterization of an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2001;65:424-427.
- [38] Shaginyan KA, Alekhina IA, Denisova NP. Serine proteinase from the higher basidiomycete *Genus coprinus*. *Biokhimiya* 1990;55:1387-1395.
- [39] Staszczak M, Zdunek E, Leonowicz A. Studies on the role of proteases in the white-rot fungus *Trametes versicolor*: Effect of PMSF and chloroquine on ligninolytic enzymes activity. *J Basic Microbiol* 2000;40:36-51.
- [40] Palmieri G, Bianco C, Cennamo G, Giardina P, Marino G, Monti M, Sannia G. Purification, Characterization and Functional Role of a Novel Extracellular Protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2754-2759.
- [41] Jackson RC, Handschumacher RE. *Escherichia coli* L-asparaginase. Catalytic activity and subunit nature. *Biochemistry (Mosc)* 1970;9:3585-3590.
- [42] Scheuplein RJ, Mizutani A, Yamaguchi S. Studies on the non-pathogenicity of *Chryseobacterium proteolyticum* and on the safety of the enzyme: protein-glutaminase. *Regul Toxicol Pharm* 2007;49:79-89.
- [43] Sato I, Kobayashi H, Hanya Y, Abe K, Murakami S, Scorzetti G, Fell JW. *Cryptococcus nodaensis* sp. nov., a yeast isolated from soil in Japan that produces a salt-tolerant and thermostable glutaminase. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1999;22:127-132.
- [44] Curthoys NP, Lowry OH. The distribution of glutaminase isoenzymes in the various structures of the nephron in normal, acidotic, and alkalotic rat kidney. *J Biol Chem* 1973;248:162-168.
- [45] Suld HM, Herbut PA. Guinea pig serum and liver L-asparaginases. Comparison of serum and papain-digested liver L-asparaginases. *J Biol Chem* 1970;245:2797-2801.
- [46] Yano T, Ito M, Tomita K, Kumagai H. Purification and properties of glutaminase from *Aspergillus oryzae*. *J Ferment Technol* 1988;66:137-143.
- [47] Elzainy TA, Ali TH. Detection of the antitumor glutaminase-asparaginase in the filamentous fungi. *Journal of Applied Sciences* 2006;6:1389-1395.
- [48] Kohlmunzer S, Wegiel J. Investigation of L-asparaginase activity in some domestic species of higher fungi. *Herba Polonica* 1980;26:227-231.
- [49] Grimrath A. Neue Peptidasen aus Basidiomyceten für die Glutenhydrolyse: Leibniz Universität Hannover, Germany; Dissertation; 2011.

- [50] Chenchik A, Zhu YY, Diatchenko L, Li R, Hill J, Siebert PD. Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. *RT-PCR Methods for Gene Cloning and Analysis* 1998;305-319.
- [51] Matz M, Shagin D, Bogdanova E, Britanova O, Lukyanov S, Diatchenko L, Chenchik A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1558-1560.
- [52] Shi X, Kaminskyj SGW. 5' RACE by tailing a general template-switching oligonucleotide. *Biotechniques* 2000;29:1192-1195.
- [53] Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 2007;127:335-347.
- [54] Clark EDB. Protein refolding for industrial processes. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:202-207.
- [55] Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 2004;22:1399-1407.
- [56] Fahnert B, Lilie H, Neubauer P. Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004;89:93-142.
- [57] Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;72:211-222.
- [58] Kurakata Y, Tonozuka T, Liu Y, Kaneko S, Nishikawa A, Fukuda K, Yoshida M. Heterologous expression, crystallization and preliminary x-ray characterization of CcCel6C, a glycoside hydrolase family 6 enzyme from the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Acta Crystallographica, Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 2009;F65:140-143.
- [59] Pisanelli I, Kujawa M, Spadiut O, Kittl R, Halada P, Volc J, Mozuch MD, Kersten P, Haltrich D, Peterbauer C. Pyranose 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium*-Expression in *E. coli* and biochemical characterization. *J Biotechnol* 2009;142:97-106.
- [60] Hannig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 1998;16:54-60.
- [61] Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 1986;189:113-130.
- [62] Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 2005;41:207-234.
- [63] Studier FW. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 1991;219:37-44.
- [64] Guzman L, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P(BAD) promoter. *J Bacteriol* 1995;177:4121-4130.
- [65] Harmer T, Wu M, Schleif R. The role of rigidity in DNA looping-unlooping by AraC. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:427-431.

- [66] Kurland C, Gallant J. Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:489-493.
- [67] Choi JH, Lee SY. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;64:625-635.
- [68] Mergulhao FJM, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv* 2005;23:177-202.
- [69] Shokri A, Sanden AM, Larsson G. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;60:654-664.
- [70] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:411-421.
- [71] Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13703-13708.
- [72] Ritz D, Lim J, Reynolds CM, Poole LB, Beckwith J. Conversion of a peroxiredoxin into a disulfide reductase by a triplet repeat expansion. *Science (Washington, DC, United States)* 2001;294:158-160.
- [73] Nguyen VD, Hatahet F, Salo KEH, Enlund E, Zhang C, Ruddock LW. Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of *E. coli*. *Microb Cell Fact* 2011;10:1.
- [74] Hammarström M, Hellgren N, Van Den Berg S, Berglund H, Härd T. Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *Protein Sci* 2002;11:313-321.
- [75] Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, Bray J, Gileadi O, Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, dhe-Paganon S, Park HW, Savchenko A, Yee A, Edwards A, Vincentelli R, Cambillau C, Kim R, Kim SH, Rao Z, Shi Y, Terwilliger TC, Kim CY, Hung LW, Waldo GS, Peleg Y, Albeck S, Unger T, Dym O, Prilusky J, Sussman JL, Stevens RC, Lesley SA, Wilson IA, Joachimiak A, Collart F, Dementieva I, Donnelly MI, Eschenfeldt WH, Kim Y, Stols L, Wu R, Zhou M, Burley SK, Emtage JS, Sauder JM, Thompson D, Bain K, Luz J, Gheyi T, Zhang F, Atwell S, Almo SC, Bonanno JB, Fiser A, Swaminathan S, Studier FW, Chance MR, Sali A, Acton TB, Xiao R, Zhao L, Ma LC, Hunt JF, Tong L, Cunningham K, Inouye M, Anderson S, Janjua H, Shastry R, Ho CK, Wang D, Wang H, Jiang M, Montelione GT, Stuart DI, Owens RJ, Daenke S, Schutz A, Heinemann U, Yokoyama S, Bussow K, Gunsalus KC. Protein production and purification. *Nat Methods* 2008;5:135-146.
- [76] Sachdev D, Chirgwin JM. Order of Fusions between Bacterial and Mammalian Proteins Can Determine Solubility in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:933-937.
- [77] de Marco A, Volrath S, Bruyere T, Law M, Fonne-Pfister R. Recombinant Maize Protoporphyrinogen IX Oxidase Expressed in *Escherichia coli* Forms Complexes with GroEL and DnaK Chaperones. *Protein Expr Purif* 2000;20:81-86.
- [78] Martínez-Alonso M, García-Fruitós E, Ferrer-Miralles N, Rinas U, Villaverde A. Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. *Microbial Cell Factories* 2010;9:64.
- [79] Singh SM, Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 2005;99:303-310.

- [80] Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* 2004;3.
- [81] Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 2003;28:1-8.
- [82] St. John RJ, Carpenter JF, Randolph TW. High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13029-13033.
- [83] Fischer B, Perry B, Sumner I, Goodenough P. A novel sequential procedure to enhance the renaturation of recombinant protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Eng* 1992;5:593-596.
- [84] Katoh S, Katoh Y. Continuous refolding of lysozyme with fed-batch addition of denatured protein solution. *Process Biochem (Oxford)* 2000;35:1119-1124.
- [85] Terashima M, Suzuki K, Katoh S. Effective refolding of fully reduced lysozyme with a flow-type reactor. *Process Biochem (Oxford)* 1996;31:341-345.
- [86] Jungbauer A, Kaar W. Current status of technical protein refolding. *J Biotechnol* 2007;128:587-596.
- [87] Kojima S, Yanai H, Miura K-i. Accelerated Refolding of Subtilisin BPN' by Tertiary-Structure-Forming Mutants of Its Propeptide. *J Biochem* 2001;130:471-474.
- [88] Gu Z, Su Z, Janson JC. Urea gradient size-exclusion chromatography enhanced the yield of lysozyme refolding. *Journal of Chromatography, A* 2001;918:311-318.
- [89] Gu Z, Weidenhaupt M, Ivanova N, Pavlov M, Xu B, Su Z-G, Janson J-C. Chromatographic methods for the isolation of, and refolding of proteins from, *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 2002;25:174-179.
- [90] Li M, Poliakov A, Danielson UH, Su Z, Janson J-C. Refolding of a recombinant full-length non-structural (NS3) protein from hepatitis C virus by chromatographic procedures. *Biotechnol Lett* 2003;25:1729-1734.
- [91] Batas B, Chaudhuri JB. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng* 1996;50:16-23.
- [92] Batas B, Chaudhuri JB. Considerations of sample application and elution during size-exclusion chromatography-based protein refolding. *Journal of Chromatography, A* 1999;864:229-236.
- [93] Fahey EM, Chaudhuri JB, Binding P. Refolding of low molecular weight urokinase plasminogen activator by dilution and size exclusion chromatography - a comparative study. *Sep Sci Technol* 2000;35:1743-1760.
- [94] Dong X-Y, Chen L-J, Sun Y. Refolding and purification of histidine-tagged protein by artificial chaperone-assisted metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography, A* 2009;1216:5207-5213.
- [95] Batas B, Schiraldi C, Chaudhuri JB. Inclusion body purification and protein refolding using microfiltration and size exclusion chromatography. *J Biotechnol* 1999;68:149-158.
- [96] Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988;67:31-40.

- [97] De Bernardez Clark E, Schwarz E, Rudolph R. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Methods Enzymol* 1999;309:217-236.
- [98] Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS, Arakawa T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnol Progr* 2004;20:1301-1308.
- [99] Rozema D, Gellman SH. Artificial chaperones: Protein refolding via sequential use of detergent and cyclodextrin. *J Am Chem Soc* 1995;117:2373-2374.
- [100] Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular Chaperones, Folding Catalysts, and the Recovery of Active Recombinant Proteins from *E. coli*: To Fold or to Refold. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 1997;66:197-238.
- [101] DeCollo TV, Lees WJ. Effects of Aromatic Thiols on Thiol-Disulfide Interchange Reactions That Occur during Protein Folding. *J Org Chem* 2001;66:4244-4249.
- [102] Gough JD, Williams RH, Jr., Donofrio AE, Lees WJ. Folding Disulfide-Containing Proteins Faster with an Aromatic Thiol. *J Am Chem Soc* 2002;124:3885-3892.
- [103] Jung E, Williams KL. The production of recombinant glycoproteins with special reference to simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol Appl Biochem* 1997;25:3-8.
- [104] Russell D, Oldham NJ, Davis BG. Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydr Res* 2009;344:1508-1514.
- [105] Hjort C. Industrial enzyme production for food applications. *Novel Enzyme Technology for Food Applications* 2007:43-59.
- [106] Casselton LA, Herce AdF. Heterologous gene expression in the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus*. *Curr Genet* 1989;16:35-40.
- [107] Kilaru S, Hoegger PJ, Majcherczyk A, Burns C, Shishido K, Bailey A, Foster GD, Kuees U. Expression of laccase gene *lcc1* in *Coprinopsis cinerea* under control of various basidiomycetous promoters. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;71:200-210.
- [108] Kuo C-Y. Use of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter and heterologous gene expression in *Pleurotus*. US Patent. US 20090193544.
- [109] Kuo C-Y, Chou S-Y, Hseu R-S, Huang C-T. Heterologous expression of EGFP in enoki mushroom *Flammulina velutipes*. *Botanical Studies* 2010;51:303-309.
- [110] Li D, Youngs HL, Gold MH. Heterologous Expression of a Thermostable Manganese Peroxidase from *Dichomitus squalens* in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 2001;385:348-356.
- [111] Ogawa K, Yamazaki T, Hasebe T, Kajiwara S, Watanabe A, Asada Y, Shishido K. Molecular breeding of the basidiomycete *Coprinus cinereus* strains with high lignin-decolorization and -degradation activities using novel heterologous protein expression vectors. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;49:285-289.
- [112] Ichinose H, Wariishi H, Tanaka H. Identification and heterologous expression of the cytochrome P450 oxidoreductase from the white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002;59:658-664.
- [113] Miki Y, Morales M, Ruiz-Duenas FJ, Martinez MJ, Wariishi H, Martinez AT. *Escherichia coli* expression and in vitro activation of a unique ligninolytic peroxidase that has a catalytic tyrosine residue. *Protein Expr Purif* 2009;68:208-214.

- [114] Nakamura T, Ichinose H, Wariishi H. Cloning and heterologous expression of two aryl-aldehyde dehydrogenases from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:470-475.
- [115] Zelena K, Zorn H, Nimtz M, Berger RG. Heterologous expression of the *msp2* gene from *Marasmius scorodoni*. *Arch Microbiol* 2009;191:397-402.
- [116] Ishihara H, Aimi T, Takahashi K, Kitamoto Y. Heterologous expression and characterization of the endocellulase encoding gene *cel3A* from the basidiomycete *Polyporus arcularius*. *Mycoscience* 2005;46:154-161.
- [117] Krügener S, Zelena K, Zorn H, Nimtz M, Berger RG. Heterologous expression of an extracellular lipase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *J Mol Catal B: Enzym* 2009;57:16-21.
- [118] Zelena K, Krügener S, Lunkenbein S, Zorn H, Berger RG. Functional expression of the lipase gene *Lip2* of *Pleurotus sapidus* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 2009;31:395-401.
- [119] Yeh CM, Yeh CK, Hsu XY, Luo QM, Lin MY. Extracellular expression of a functional recombinant *Ganoderma lucidum* immunomodulatory protein by *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:1039-1049.
- [120] Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimtz M, de BL, Berger RG, Zorn H. Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade  $\beta$ -carotene. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;77:1241-1250.
- [121] Conesa A, Punt PJ, van dHCAJ. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J Biotechnol* 2002;93:143-158.
- [122] Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv* 2006;24:500-513.
- [123] Abyanova AR, Chulkin AM, Vavilova EA, Fedorova TV, Loginov DS, Koroleva OV, Benevolensky SV. A heterologous production of the *Trametes hirsuta* laccase in the fungus *Penicillium canescens*. *Appl Biochem Microbiol* 2010;46:313-317.
- [124] Bohlin C, Joensson LJ, Roth R, van ZWH. Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger*. *Appl Biochem Biotechnol* 2006;129-132:195-214.
- [125] Faraco V, Ercole C, Festa G, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G. Heterologous expression of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus* in *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;77:1329-1335.
- [126] Larrondo LF, Avila M, Salas L, Cullen D, Vicuna R. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispota* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology (Reading, U K)* 2003;149:1177-1182.
- [127] Rodriguez E, Ruiz-Duenas FJ, Kooistra R, Ram A, Martinez AT, Martinez MJ. Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pel3* encoded protein. *J Biotechnol* 2008;134:9-19.
- [128] Yaver DS, Del Carmen Overjero M, Xu F, Nelson BA, Brown KM, Halkier T, Bernauer S, Brown SH, Kauppinen S. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase *Lcc1*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:4943-4948.



- [129] Zhou H-M, Hong Y-Z, Xiao Y-Z, Cui T-J, Wang X-T, Pu C-L. High output of a *Trametes* laccase in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant enzymes. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2007;23:1055-1059.
- [130] Wagner G. *Waschmittel : Chemie, Umwelt, Nachhaltigkeit*. Weinheim: Wiley-VCH. p. 114.
- [131] Yasokawa D, Shimizu T, Nakagawa R, Ikeda T, Nagashima K. Cloning, sequencing, and heterologous expression of a cellobiohydrolase cDNA from the Basidiomycete *Corticium rolfsii*. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 2003;67:1319-1326.
- [132] Quiroz-Castaneda RE, Martinez-Anaya C, Cuervo-Soto LI, Segovia L, Folch-Mallol JL. Loosenin, a novel protein with cellulose-disrupting activity from *Bjerkandera adusta*. *Microb Cell Fact* 2011;10:8.
- [133] Halpern YS, Grossowicz N. Hydrolysis of amides by extracts from Mycobacteria. *Biochem J* 1957;65:716-720.
- [134] Ho PPK, Frank BH, Burck PJ. Crystalline L-asparaginase from *Escherichia coli* B. *Science* 1969;165:510-512.
- [135] Fu CH, Sakamoto KM. PEG-asparaginase. *Expert Opin Pharmaco* 2007;8:1977-1984.
- [136] Maloney KW. Erwinia asparaginase: Coming closer to an understanding of its use in pediatric acute lymphoblastic leukemia? *Pediatr Blood Cancer* 2010;54:189-190.
- [137] Laan VDJM, Stor MC, Lange DI, Mohrmann L. *Aspergillus niger* asparaginase variants and their commercial uses. WO 2008128974.
- [138] Matsui T, Friis EP, Yamagishi A. Design of thermostable asparaginases and their use for reduction of acrylamide in foods. WO 2008110513.
- [139] Wakayama M, Yamagata T, Kamemura A, Bootim N, Yano S, Tachiki T, Yoshimune K, Moriguchi M. Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005;32:383-390.
- [140] Soda K, Ohshima M, Yamamoto T. Purification and properties of isozymes of glutaminase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;46:1278-1284.
- [141] Moriguchi M, Sakai K, Tateyama R, Furuta Y, Wakayama M. Isolation and characterization of salt-tolerant glutaminases from marine *Micrococcus luteus* K-3. *J Ferment Bioeng* 1994;77:621-625.
- [142] Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* 2002;50:4998-5006.
- [143] Friedman M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem* 2003;51:4504-4526.
- [144] Lindsay RC, Jang S. Chemical intervention strategies for substantial suppression of acrylamide formation in fried potato products. *Adv Exp Med Biol* vol. 561; 2005. p. 393-404.
- [145] Zyzak DV, Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J Agric Food Chem* 2003;51:4782-4787.

- [146] Linke D, Berger RG. Foaming of proteins: New prospects for enzyme purification processes. J Biotechnol 2010;In Press, Accepted Manuscript.
- [147] Hecker KH, Roux KH. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. Biotechniques 1996;20:478-485.
- [148] Bendtsen JD, Nielsen H, Von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. J Mol Biol 2004;340:783-795.
- [149] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215:403-410.
- [150] Ahn T, Yim S, Choi H, Yun C. Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: Use of amino acids as electrolytes. Anal Biochem 2001;291:300-303.
- [151] Racusen D. Glycoprotein detection in polyacrylamide gel with thymol and sulfuric acid. Anal Biochem 1979;99:474-476.
- [152] Borek D, Jaskólski M. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. Acta Biochim Pol 2001;48:893-902.
- [153] Siezen RJ, Leunissen JAM. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. Protein Sci 1997;6:501-523.
- [154] Bryan PN. Protein engineering of subtilisin. Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology 2001;1543:203-222.
- [155] Fu X, Inouye M, Shinde U. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked. J Biol Chem 2000;275:16871-16878.
- [156] Yabuta Y, Takagi H, Inouye M, Shinde U. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: Propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin. J Biol Chem 2001;276:44427-44434.
- [157] Aaslyng MD, Martens M, Poll L, Nielsen PM, Flyge H, Larsen LM. Chemical and Sensory Characterization of Hydrolyzed Vegetable Protein, a Savory Flavoring. J Agric Food Chem 1998;46:481-489.
- [158] Ney KH. Amino acid composition of proteins and bitterness of their peptides. Z Lebensm-Unters Forsch 1972;149:321-323.
- [159] Adler-Nissen J, Olsen HS. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymically modified soy protein. ACS Symp Ser 1979;92:125-146.
- [160] Zorn H, Peters T, Nimtze M, Berger RG. The secretome of *Pleurotus sapidus*. Proteomics 2005;5:4832-4838.
- [161] Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. Electrophoresis 1988;9:288-291.
- [162] Wondrak EM. Process for fast visualization of protein. US Patent. US 20010046709.
- [163] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.

- [164] Eisele N, Linke D, Bitzer K, Na'amnieh S, Nimtz M, Berger RG. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. *Bioresour Technol* 2011;102:3316-3321.
- [165] Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. CODEHOP (CONsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3763-3766.
- [166] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22:4673-4680.
- [167] Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95-98.
- [168] Linke D, Krings U, Zorn H, Rabe S, Ulmer H. Production of gluten-specific peptidases from basidiomycetes and their use in hydrolysis of proteins for food industry applications. European Patent, International Patent. EP 1985698, WO 2008131938.
- [169] Winther JR, Sorensen P. Propeptide of carboxypeptidase Y provides a chaperone-like function as well as inhibition of the enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9330-9334.
- [170] Subbian E, Yabuta Y, Shinde UP. Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: Intrinsically unstructured propeptide modulates stochastic activation of subtilisin. *J Mol Biol* 2005;347:367-383.
- [171] Tanaka SI, Saito K, Chon H, Matsumura H, Koga Y, Takano K, Kanaya S. Crystal structure of unautoprocessed precursor of subtilisin from a hyperthermophilic archaeon: Evidence for Ca<sup>2+</sup>-induced folding. *J Biol Chem* 2007;282:8246-8255.
- [172] Eder J, Rheinnecker M, Fersht AR. Folding of subtilisin BPN': Role of the pro-sequence. *J Mol Biol* 1993;233:293-304.
- [173] Ikemura H, Inouye M. In vitro processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1988;263:12959-12963.
- [174] Li Y, Inouye M. Autoprocessing of prothiolsubtilisin E in which active-site serine 221 is altered to cysteine. *J Biol Chem* 1994;269:4169-4174.
- [175] Kojima S, Iwahara A, Hisano Y, Yanai H. Effects of hydrophobic amino acid substitution in *Pleurotus ostreatus* proteinase A inhibitor 1 on its structure and functions as protease inhibitor and intramolecular chaperone. *Protein Engineering, Design and Selection* 2007;20:211-217.
- [176] Bajorath J, Hinrichs W, Saenger W. The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *Eur J Biochem* 1988;176:441-447.
- [177] Zhang X, Liu Q, Zhang G, Wang H, Ng T. Purification and molecular cloning of a serine protease from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Process Biochem* 2010;45:724-730.
- [178] Setyorini E, Takenaka S, Murakami S, Aoki K. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. *Biosci, Biotechnol, Biochem* 2006;70:433-440.
- [179] Gödde C, Sahm K, Brouns SJJ, Kluskens LD, van der Oost J, de Vos WM, Antranikian G. Cloning and expression of islandisin, a new thermostable subtilisin from *Fervidobacterium islandicum*, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:3951-3958.

- 
- [180] El-Baky HA, Linke D, Nimtz M, Berger RG. PsoP1, a milk clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. submitted.
- [181] El-Baky HA, Linke D, Nimtz M, Metry W, El-Demerdash O, Berger RG. The extracellular aspartic peptidase of basidiomycete *Wolfiporia cocos* is a highly efficient milk clotting enzyme *Milchwissenschaft* 2011;in press.
- [182] El-Baky HA, Linke D, El-Demerdash O, Metry WA, Berger RG. Submerged cultured basidiomycete fungi secrete peptidases with distinct milk clotting properties. *Adv Food Sci* 2011;33:109-115.
- [183] Wang J-s, Zhao M-m, Zhao Q-z, Bao Y, Jiang Y-m. Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *J Food Sci* 2007;72:C103-C107.

---

## 6 Anhang

---

### 6.1 Ergänzende Daten FvNase



Abb. 17: Für die Ermittlung der vollständigen FvNase-Sequenz wurden 3'-RACE- und 5'RACE-PCRs mit verschiedenen spezifischen Primern durchgeführt. Umrandete Amplifikate wurden kloniert und sequenziert.

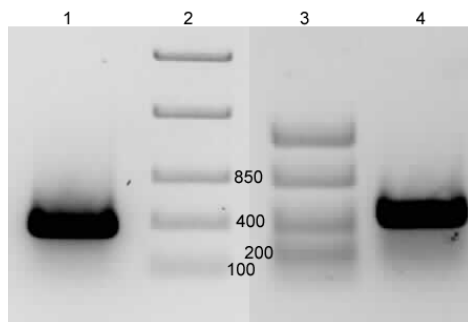


Abb. 18: Amplifikation der vollständigen FvNase-Sequenz aus cDNA (1) und gDNA (2). Die Amplifikate wurden kloniert und sequenziert.

```

gDNA_FvNase      ATGAAATCTTTTGCCCTCTTCGTCCCTCTCATCGTTGCTGCTGTCGTC AACAGCGCCGTG 60
cDNA_FvNase      ATGAAATCTTTTGCCCTCTTCGTCCCTCTCATCGTTGCTGCTGTCGTC AACAGCGCCGTG 60
*****

gDNA_FvNase      GTCACCTTTTCCACCGGCCTTGGCTGCAACTCTGTCTCGCAGACCTACCGTGGCAACTGC 120
cDNA_FvNase      GTCACCTTTTCCACCGGCCTTGGCTGCAACTCTGTCTCGCAGACCTACCGTGGCAACTGC 120
*****

gDNA_FvNase      AACTTCTGCGCTGACCCACCCGGCGGTAGGTCTACTTCACATFGATCCCTATAGCTCGAT 180
cDNA_FvNase      AACTTCTGCGCTGACCCACCCGGCG----- 145
*****

gDNA_FvNase      GCTCATCTCATCTACTAGACTGGAGCTCAGTCGGCTTTTCTGAGATCGGAGGCGACAACC 240
cDNA_FvNase      -----ACTGGAGCTCAGTCGGCTTTTCTGAGATCGGAGGCGACAACC 187
*****

gDNA_FvNase      GCGTCACCGTTCATAACCAGAACAGCTGCACCCCGCTTCGCAGGTTCGCCAAGGCTTTG 300
cDNA_FvNase      GCGTCACCGTTCATAACCAGAACAGCTGCACCCCGCTTCGCAGGTTCGCCAAGGCTTTG 247
*****

gDNA_FvNase      GACCGCCTGCTGGAACCAAGGCGCTACCAAGCTTCGTTCTGCTTGGGTTGCGTGCCCTG 360
cDNA_FvNase      GACCGCCTGCTGGAACCAAGGCGCTACCAAGCTTCGTTCTGCTTGGGTTGCGTGCCCTG 307
*****

gDNA_FvNase      GACAGAGGTGAGTCGGTTCTCTGCAGCTTCTCTTTTGGTTTACTAACGATGCCACTAGA 420
cDNA_FvNase      GACAG-----AGA 315
*****

gDNA_FvNase      CTCGCTGAGAACGGTACCATCGTCGACGACGACGGCGCCTTCATCGACTTTGCTTGA 477
cDNA_FvNase      CTCGCTGAGAACGGTACCATCGTCGACGACGACGGCGCCTTCATCGACTTTGCTTGA 372
*****

```

Abb. 19: Bestätigung der ermittelten codierenden Sequenz durch Abgleich mit der Sequenz aus gDNA.

## 6.2 Ergänzende Daten POP1

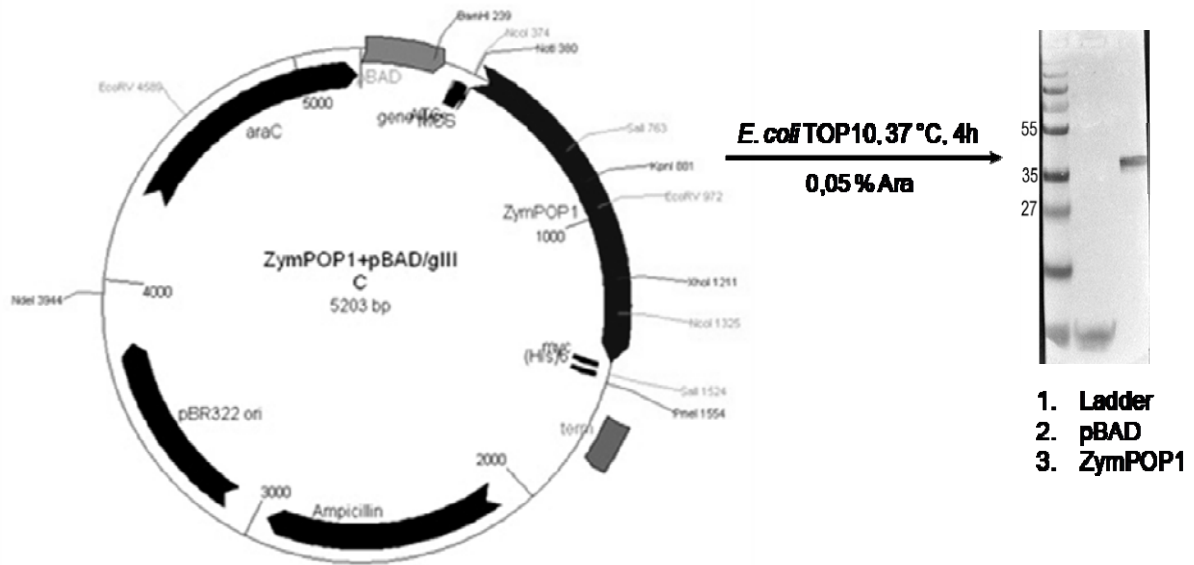


Abb. 20: Expression von ZymPOP1 im Expressionsvektor pBAD/gIII C. Am C-Terminus wurde ein Hexahistidintag fusioniert. Die Expression wurde in *E. coli* TOP10 bei 37 °C über 4 h durchgeführt. Die Kultur erfolgte in TB, die Induktion mit 0,05 % L-Arabinose. Western-Blot Analyse mit Antikörper Anti-His(C-term) bestätigte die Expression von ZymPOP1.

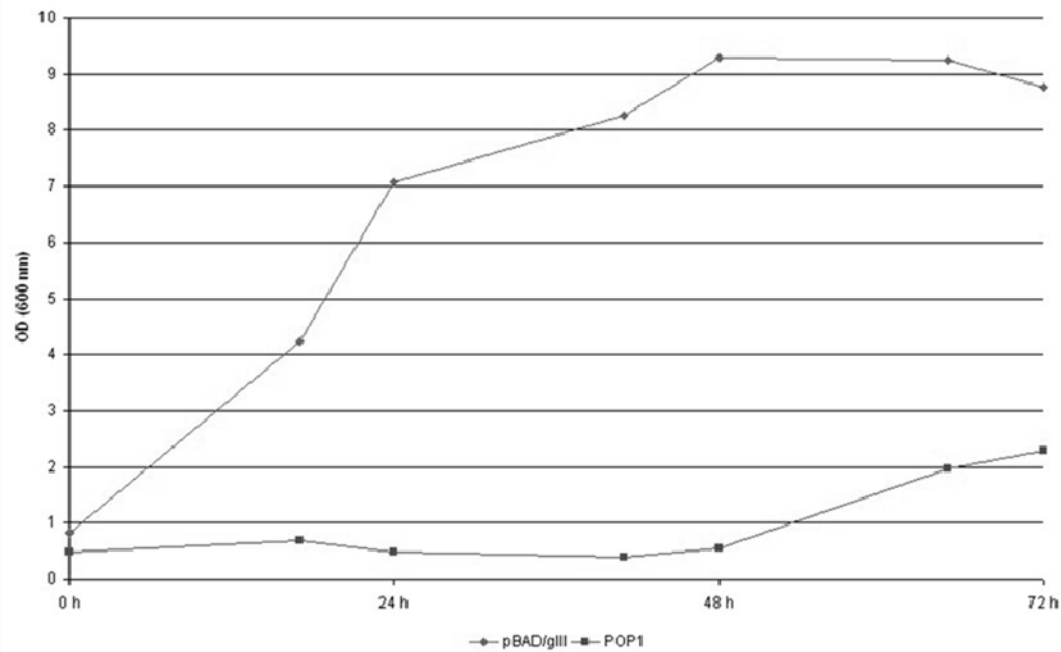


Abb. 21: Entwicklung der OD<sub>600 nm</sub> von *E. coli* TOP10 transformiert mit ZymPOP1pBAD oder Leervektor pBAD/gIII C. Kulturführung in TB mit 100 µg/ml Carbenicillin bei 16 °C. Induktion mit 0,02 % L-Arabinose. Kulturdauer 72 h. Induktion verursachte erwartungsgemäß eine Einstellung des Wachstums. Es wurde kein lösliches rekombinantes Protein erhalten.

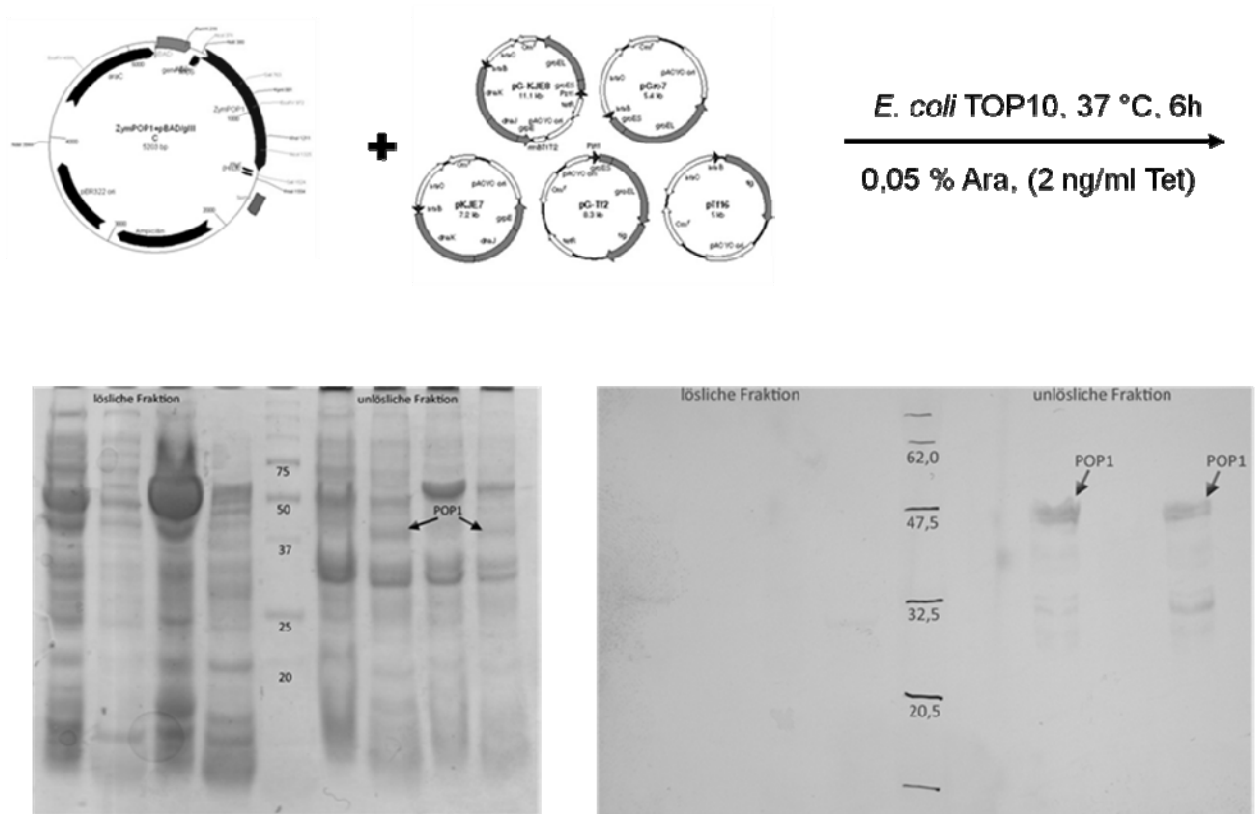


Abb. 22: Coexpression mit Chaperonen (Chaperon Plasmid Set von Takara Bio Inc.). Verschiedene Kombinationen aus GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE und Tig wurden mit ZymPOP1pBAD coexprimiert. Durch SDS-PAGE und Western Blot (Anti-His(C-term), Invitrogen) konnte nur unlösliches ZymPOP1 nachgewiesen werden.



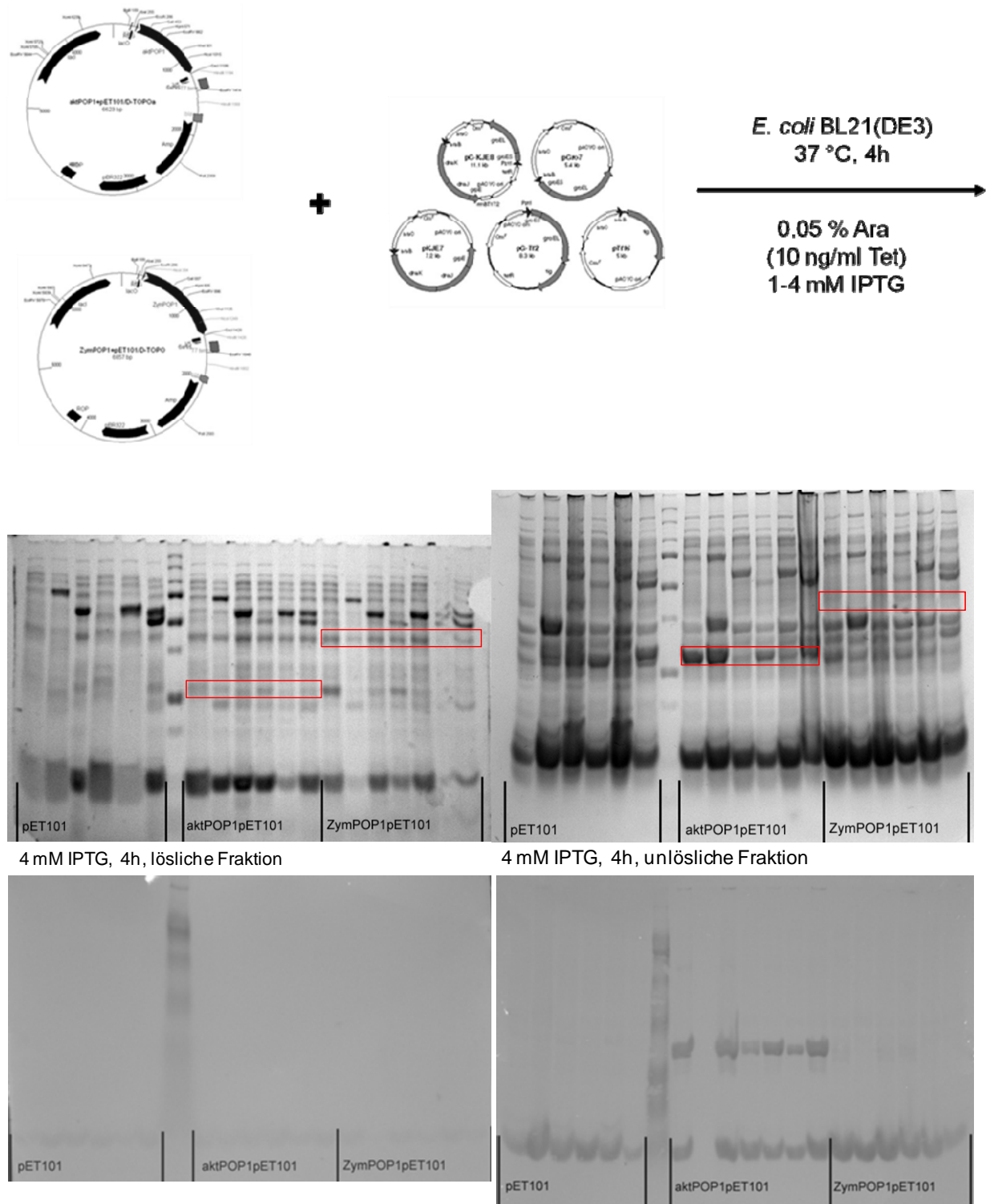


Abb. 23: Coexpression mit Chaperonen (Chaperon Plasmid Set von Takara Bio Inc.). Verschiedene Kombinationen aus GroEL, GroES, DnaK, DnaJ, GrpE und Tig wurden mit Leervektor pET101 (Invitrogen), aktPOP1pET101 oder ZymPOP1pET101 coexprimiert. Durch SDS-PAGE und Western Blot (Anti-His(C-term), Invitrogen) konnte nur unlösliche aktPOP1 nachgewiesen werden. ZymPOP1 wurde nicht exprimiert. Umrandungen deuten die Bereiche der erwarteten Banden von aktPOP1 bzw. ZymPOP1 an.

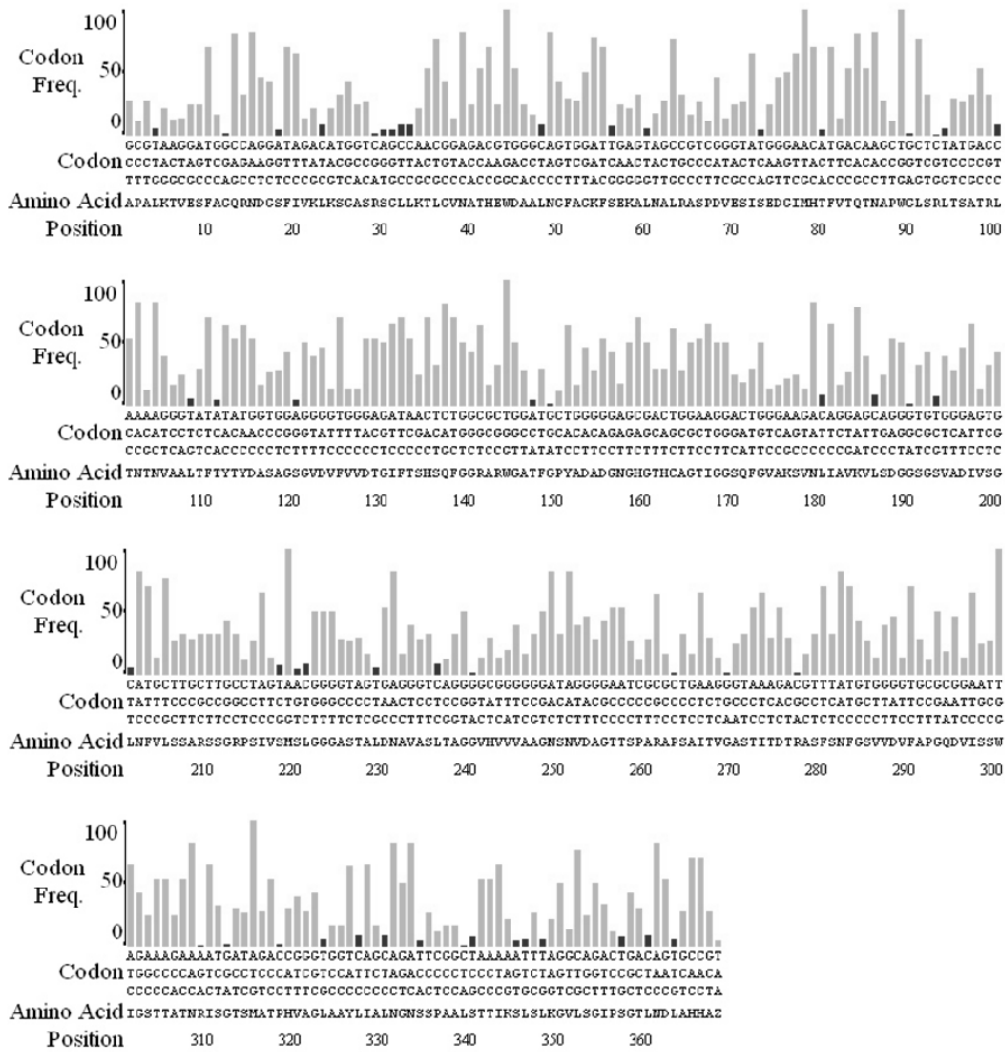


Abb. 24: Vergleich der *codon usage* von ZymPOP1 mit der von *E. coli*. Sowohl am N-, als auch am C-Terminus kommt es vermehrt zu Codons, die in *E. coli* selten vorkommen.

**Tab. 6: Renaturierungsmethoden, die keine aktive POP1 aus Einschlusskörpern erzielen.**

Methode	Durchführung
Schnelle Verdünnung	<ul style="list-style-type: none"><li>- 100fache Verdünnung</li><li>- 50 mM Tris/HCl pH 6,2, 0,5 M <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>, 1 mM <math>\text{CaCl}_2</math>, 5 mM DTT</li><li>- Langsame Zugabe des Solubilisats</li><li>- Rühren über Nacht bei 4 °C</li><li>- Konzentrierung zum Ursprungsvolumen mittels Ultrafiltration</li></ul>
Dialyse	<ul style="list-style-type: none"><li>- Dialyse gegen 100faches Volumen</li><li>- 50 mM Tris/HCl pH 6,2, 0,5 M <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>, 1 mM <math>\text{CaCl}_2</math>, 5 mM DTT</li><li>- MWCO 15 000 Da</li></ul>

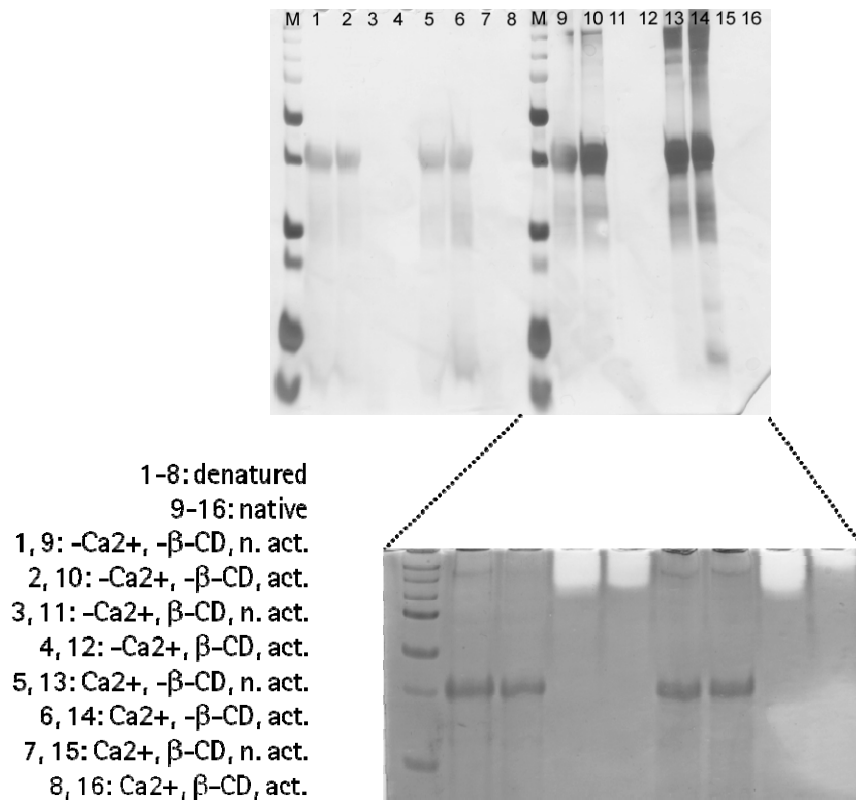


Abb. 25: Zymographie und PAGE-Analyse von POP1, die aus ZymPOP1-Einschlusskörpern mit CTAB und β-Cyclodextrin renaturiert wurde. Folgende Parameter wurden variiert: 10 mM CaCl<sub>2</sub> (Ca<sup>2+</sup>), β-Cyclodextrin (β-CD), Aktivierung bei 50 °C für 5 min nach Aufarbeitung der Renaturierung (act./n. act.). Die Proben wurden denaturiert (10 min, 95 °C, 100 mM DTT) oder nativ aufgetragen. Die denaturierten Proben zeigten unprozessiertes ZymPOP1, wenn kein β-CD eingesetzt wurde. In den Proben mit β-CD war kein Protein mehr detektierbar. Die nativen Proben zeigten ein ähnliches Muster. ZymPOP1 neigte zur Aggregation und bildete Oligomere mit einer Größe von ca. 150 kDa. Diese Oligomere zeigten sich auch in der Zymographie: anstatt bei 28 kDa wurde ein Entfärbungshof im hochmolekularen Bereich erhalten. Die korrespondierenden nicht aktiven Proben zeigten jedoch die 39 kDa Bande des ZymPOP1. Die Aggregation wirkte sich in der Zymographie nicht nachteilig auf die Aktivität aus.

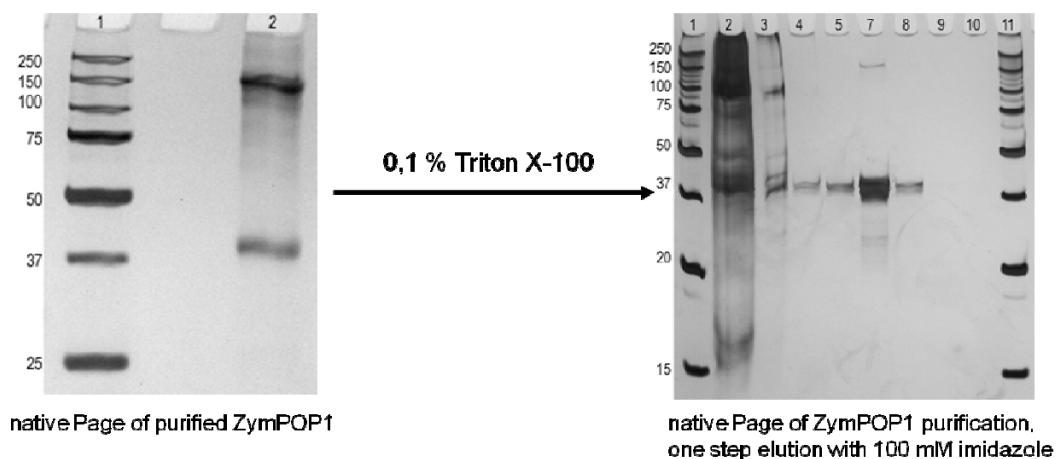


Abb. 26: Verminderung der Aggregation von ZymPOP1 durch Zusatz von 0,1 % Triton X-100 während der Aufreinigung mittels Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatografie.

---

---

# Lebenslauf

---

---

---

## PERSÖNLICHE ANGABEN

Nadine Eisele

\*09. Oktober 1981 in Basel/Schweiz

---

## SCHULE

- 8/1994 - 6/1998    Gymnasium Bad Zwischenahn-Edeweicht
- 8/1998 - 7/1999    Ripon Indian High School, Ripon, Kalifornien
- 8/1999 - 4/2002    Fachgymnasium für Ernährung, Oldenburg (Oldb)  
Abschluss: Abitur (1,3)

---

## STUDIUM UND PROMOTION

- 10/2002 – 10/2007    Studium der Biochemie, Leibniz Universität Hannover
- Diplomarbeit: „Molekularbiologische Charakterisierung lebensmitteltechnologisch relevanter Peptidasen aus zwei Basidiomyceten.“
- Abschluss: Diplom-Biochemikerin (sehr gut)
- seit 12/2007    Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelchemie bei Prof. Dr. Dr. Berger, Leibniz Universität Hannover

## Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel  
Charakterisierung lebensmitteltechnologisch relevanter Amidasen aus *Flammulina velutipes*  
und *Pleurotus ostreatus*  
selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu  
Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.  
Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere  
Prüfungsarbeit verwendet.

-----  
(Unterschrift)  
Nadine Eisele