

# **Enzyme aus Basidiomyceten zur Modifikation von Hydrokolloid-Systemen**

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

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Lebensmittelchem.

**René Matthes**

geboren am 24. Mai 1980 in Bernburg

2011

Referent: Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger

Korreferentin: PD Dr. Ursula Rinas

Tag der Promotion: 19.08.2011

## **Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde von April 2008 bis Mai 2011 im Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Herzlich danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, das entgegengebrachte Vertrauen, den eingeräumten Freiraum zur Bearbeitung des Themas und die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Dem BMBF Cluster BIODIVERSITY2021 danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Mein weiterer Dank gilt insbesondere Frau Dr. Diana Linke für die Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft, die wesentlich zu einem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen hat.

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

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

Herrn Dr. Jörg Fohrer (Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für seine Unterstützung bei der Aufnahme und Interpretation der NMR-Spektren.

Des Weiteren gilt mein ausdrücklicher Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Lebensmittelchemie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, hilfsbereite und freundliche Zusammenarbeit und die gemeinsam verbrachte Zeit.

Nicht zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern danken, die mich immer unterstützt und gefördert haben, und meiner Freundin für ihre moralische Hilfe und ihr Verständnis.



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Zusammenfassung und Abstract.....</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenfassung.....	1
1.2 Abstract.....	2
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1 Hydrokolloide .....	3
2.2 Rheologie .....	7
2.3 Laccase zur oxidativen Gelierung.....	10
2.4 Feruloylsterase .....	13
2.5 Ziele der Arbeit.....	15
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>17</b>
3.1 Geräte und Chemikalien .....	17
3.1.1 Allgemeine Geräte.....	17
3.1.2 Chemikalien.....	18
3.1.3 Lösungsmittel .....	21
3.2 Rheologische Messungen .....	21
3.3 Oxidatives <i>Crosslinking</i> mit Lcc1 .....	22
3.4 Verwendete Organismen.....	23
3.5 Medien .....	24
3.5.1 SNL-Standardnährlösung (SPRECHER, 1959) .....	24
3.5.2 SNL-Agar .....	24
3.5.3 GCM-Ganoderma complete medium (CHOUTER <i>et al.</i> , 2008).....	25
3.6 Kulturführung der Basidiomyceten.....	25
3.6.1 Kultivierung auf SNL-Agar in Petrischalen .....	25
3.6.2 SNL-Vorkultur .....	25

---

3.6.3	Hauptkultur.....	25
3.7	Puffer .....	26
3.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
3.9	Coomassie-Färbung .....	28
3.10	Silberfärbung.....	29
3.11	Isoelektrische Fokussierung.....	30
3.12	Fast protein liquid chromatography (FPLC).....	31
3.13	High pressure liquid chromatography (HPLC).....	32
3.14	High pressure liquid chromatography mit Massenspektrometrikopplung .....	34
3.15	Präparative Schäumung .....	35
3.16	Bestimmung des Ferulasäuregehaltes in Polysacchariden.....	35
3.17	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford .....	36
3.18	Proteinsequenzierung.....	36
3.19	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	37
3.19.1	Bestimmung der Laccaseaktivität .....	37
3.19.2	Bestimmung der Lipase-Aktivität mit Tween 80.....	37
3.19.3	Bestimmung der Esterase-Aktivität mit <i>p</i> -Nitrophenylderivaten.....	38
3.19.4	Bestimmung der Esterase-Aktivität mit Zimtsäure- und Ferulasäuremethylester.....	39
3.20	Myzelaufschluss.....	40
3.21	Umesterung in organischen Lösungsmitteln.....	40
3.22	Umesterung in wässriger Lösung.....	41
3.23	Präparative Synthese des Saccharoseferulates.....	41
3.24	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	42
3.25	Entsorgungshinweise .....	43
4	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>44</b>
4.1	Laccase aus <i>Meripilius giganteus</i> zur oxidativen Gelierung.....	44
4.2	Stammscreening nach Aktivität zur Hydrolyse von Ferulasäureestern.....	49

---

4.3	Isolierung und Charakterisierung von ferulasäureesterspaltenden Enzym aus <i>Pleurotus sapidus</i> .....	56
4.3.1	Ferulylesteraseaktivität aus <i>Pleurotus sapidus</i> .....	56
4.3.2	Isolierung der Esterase aus <i>Pleurotus sapidus</i> .....	57
4.3.2.1	Ionenaustauschchromatographie (IEX).....	57
4.3.3	Charakterisierung der Esteraseaktivität.....	58
4.3.3.1	pH-Abhängigkeit der Ferulasäuremethylesterhydrolyse.....	58
4.3.3.2	Temperatur-Abhängigkeit der Ferulasäuremethylesterhydrolyse.....	59
4.3.3.3	Bestimmung enzymkinetischer Parameter der Ferulasäuremethylesterhydrolyse.....	60
4.3.3.4	Hydrolyse weiterer Ferulasäureester und anderer Substrate.....	62
4.3.3.5	Erhöhung der Enzymkonzentration.....	63
4.4	Isolierung und Charakterisierung des ferulasäureesterspaltenden Enzyms aus <i>Ganoderma applanatum</i> .....	64
4.4.1	Untersuchung der Kultivierungsparameter.....	64
4.4.2	Isolierung der Esterase aus <i>Ganoderma applanatum</i> .....	66
4.4.2.1	Konzentrierung.....	66
4.4.2.2	Ionenaustauschchromatographie (IEX).....	66
4.4.2.3	Size-Exclusion-Chromatography (SEC) .....	68
4.4.2.4	SDS-PAGE.....	69
4.4.2.5	Bilanzierung der Aufreinigung .....	72
4.4.3	Sequenzierung der Esterase mittels ESI-MS/MS .....	73
4.4.4	Charakterisierung der Ferulylesteraseaktivität aus <i>Ganoderma applanatum</i> .....	77
4.4.4.1	pH-Abhängigkeit der Ferulasäuremethylesterhydrolyse.....	77
4.4.4.2	Temperatur-Abhängigkeit der Ferulasäuremethylesterhydrolyse.....	78
4.4.4.3	Bestimmung enzymkinetischer Parameter der Ferulasäuremethylesterhydrolyse.....	79
4.4.4.4	Hydrolyse weiterer Ferulasäureester und anderer Substrate.....	80

---

4.5	Enzymatische Synthese von Ferulasäure-Saccharid-Estern .....	81
4.5.1	Versuche zur Umesterung von Ferulasäuremethylester und Sacchariden in organischen Lösungsmitteln.....	82
4.5.2	Umesterung von Ferulasäuremethylester und Monosacchariden.....	83
4.5.3	Umesterung von Ferulasäuremethylester und Disacchariden .....	85
4.5.4	Parameter der Umesterung mit Esterase aus <i>Ganoderma applanatum</i> .....	88
4.5.5	Strukturaufklärung des enzymatisch synthetisierten Saccharoseferulates ...	92
5	<b>Ausblick.....</b>	<b>98</b>
6	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
7	<b>Anhang .....</b>	<b>113</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AA	Acrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BIS	Bisacrylamid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz
ESI	Elektronenstoßionisation
FA	Ferulasäure
FAM	Ferulasäuremethylester
F-A	5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-arabinofuranose
F-AX	$\beta$ -D-Xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O- <i>trans</i> -feruloyl-L-arabinofuranose
F-AXG	$\alpha$ -L-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O- <i>trans</i> -feruloyl-L-arabinofuranose
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
Gap	<i>Ganoderma applanatum</i>
GCM	<i>Ganoderma</i> Complete Medium
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	Ionenaustauschchromatographie
LVE	linear-viskoelastisch
MALDI	Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation
MS	Massenspektroskopie
MWCO	Moleculare Weight Cut Off: Ausschlussgrenze (Molekülmasse) einer Membran
m/z	Masse-Ladungsverhältnis

NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pI	Isoelektrischer Punkt
Psa	<i>Pleurotus sapidus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SNL	Standardnährlösung
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TOF	Flugzeit
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )
UV	Ultraviolett

Aminosäuren werden nach dem internationalen Einbuchstabenkode abgekürzt.

# 1 Zusammenfassung und Abstract

## 1.1 Zusammenfassung

Für die in vorangegangenen Arbeiten aus *Meripilus giganteus* isolierte Laccase Lcc1 konnte die Eignung zur oxidativen Gelierung nachgewiesen werden. Die Laccase zeigte ein breites Substratspektrum, so dass sowohl die oxidative Quervernetzung von phenolhaltigen Polysacchariden als auch die Polymerisierung von Proteinen möglich war, sofern die Zugänglichkeit der oxidierbaren Seitenketten nicht durch eine globuläre Struktur behindert wurde. Am Beispiel des  $\beta$ -Caseins, als Modell für Proteine ohne definierte Tertiärstruktur, konnte eine Quervernetzung und damit Polymerisierung des Proteins gezeigt werden.

Für das vom Basidiomyceten *Pleurotus sapidus* exprimierte und durch Tween 80 induzierbare Enzym mit Feruloyl-esteraseaktivität wurde ein Aufreinigungsprotokoll entwickelt, um die Esterase aus Kulturmedien frei von anderen störenden Enzymaktivitäten zu gewinnen. Die isolierte Esterase hydrolysiert neben Ferulasäuremethylester als Standardsubstrat auch Ferulasäuresaccharidester. Als Substrate wurden 5-O-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose,  $\beta$ -D-Xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose und  $\alpha$ -L-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose verwendet.

Aus einer Reihe von höheren Pilzen wurde der Basidiomycet *Ganoderma applanatum* mit der besten Feruloyl-esteraseaktivität identifiziert. Das Enzym mit einem berechneten Molekulargewicht von 52 kDa (SDS-PAGE) und einem isoelektrischen Punkt von ca. pH 5,0 wurde durch chromatographische Verfahren isoliert und charakterisiert. Für das neuartige Enzym wurde mittels ESI-MS/MS gewonnener Partialpeptidsequenzen und Homologievergleich die Zugehörigkeit zur Esterase-Lipase Familie nachgewiesen. Neben der Hydrolyse von diversen Ferulasäureestern konnte die Esterase erfolgreich zur Synthese von Ferulasäuresacchariden eingesetzt werden. Durch NMR-Analyse wurde exemplarisch die Struktur des Syntheseproduktes 6-O-Feruloyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranosid belegt. Neben der ersten enzymatischen Synthese von Feruloylsaccharose ist dies die erste Beschreibung einer Estersynthese unter Verwendung einer aus Basidiomyceten isolierten Esterase.

### **Schlagwörter:**

Basidiomyceten, oxidative Gelierung, Esterase, *Ganoderma applanatum*, Estersynthese

## 1.2 Abstract

Recently the laccase Lcc1 was isolated from the basidiomycete *Meripilus giganteus*. The applicability for oxidative gelation was demonstrated. Lcc1 had a broad range of substrates. It was possible to form both oxidative crosslinks between phenol containing polysaccharides and to polymerize proteins. Protein polymerization occurred unless the oxidable residues were blocked due to a globular structure. The crosslinking and polymerization was shown for  $\beta$ -casein as an example for proteins without defined tertiary structure.

A protocol was developed for the purification of the enzyme with feruloyl esterase activity of the basidiomycete *Pleurotus sapidus*. The esterase was isolated from culture media containing Tween 80 as inducer without any other interfering enzyme activities. The esterase hydrolyzed the standard substrate ferulic acid methyl and, additionally, ferulic acid saccharide ester. 5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose,  $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose und  $\alpha$ -L-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose were used as substrates.

Out of a selection of higher fungi the basidiomycete *Ganoderma applanatum* showed the most promising feruloyl esterase activity. The enzyme with a calculated molecular weight of 52 kDa (via SDS-PAGE) and an isoelectric point of approx. pH 5.0 was purified by chromatography and characterized. Partial peptid sequences were obtained by ESI-MS/MS analysis. The novel enzyme was categorized as a member of the esterase/lipase family by means of comparison of homology. In addition to the hydrolysis of several ferulic acid esters, the esterase was used successfully for the synthesis of ferulic acid saccharide esters. The structure of the synthetic product 6-O-feruloyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranoside was confirmed by NMR spectroscopy.

Apart from the first enzymatic synthesis of feruloylsucrose, this is the first description of the synthesis of an ester by using an esterase isolated from a basidiomycete.

### Keywords:

basidiomycete, oxidative gelation, esterase, *Ganoderma applanatum*, ester synthesis

## 2 Einleitung

### 2.1 Hydrokolloide

Unter dem Begriff Hydrokolloide, der sich aus den griechischen Wörtern für Wasser (*hydro*) und Leim (*kolla*) zusammensetzt, wird eine Vielzahl an heterogenen Polymeren verstanden, die alle die Eigenschaft vereinen, große Mengen an Wasser binden zu können. Die Herkunft der Hydrokolloide kann dabei pflanzlichen, tierischen oder auch mikrobiellen Ursprungs sein. Dazu zählen sowohl Polysaccharide wie Stärke, Cellulose, Pektine, Xanthane oder Alginat als auch Proteine wie Gelatine oder Caseine. Die verschiedenen Hydrokolloide erfahren auf Grund ihrer hohen Wasserbindungskapazität in unterschiedlichen Industriezweigen und dabei vor allem in der Lebensmittelindustrie ein breites Anwendungsspektrum. Sie werden unter anderem als Verdickungsmittel, Gelbildner oder Stabilisatoren für Schäume, Emulsionen und Dispersionen eingesetzt.

Da sich die Hydrokolloide so vielseitig nutzen lassen, ist ihr Marktvolumen entsprechend groß. So betrug das Welthandelsvolumen im Jahr 2006 über 19 Milliarden US\$ (WILL *et al.*, 2007). Für den weltweiten Verbrauch wird dabei ein kontinuierliches Wachstum für den Zeitraum von 2009 – 2014 von 2,5 – 3,5 % vorausgesagt (WILL *et al.*, 2010). Bezogen auf das Gewicht haben Stärke und dessen Derivate daran einen Anteil von 94% (DE GUZMAN, 2008) stellen dabei aber nur ca. 63% (12 Milliarden US\$) des Marktwertes dar. Der Handel von individuellen und höherwertigen Hydrokolloiden verspricht daher einen höheren Umsatz und Gewinn (Tab. 1).

Tab. 1 Preise einiger Hydrokolloide in den Jahren 2007/2008 (SEISUN, 2010); \* DE GUZMAN, 2008

Hydrokolloid	Preis US\$/kg
native Stärke	0,33 – 0,44
Guar Gum	1,60 – 1,66
Gellan	31 – 33
Gummi Arabicum	3,60 – 4,70
Johannisbrotkernmehl	12,70 – 13,80
Pektin*	9,90 – 12,10
Xanthan	4,60 – 5,80

Die Auswahl des Hydrokolloids erfolgt stark orientiert an dem gegebenen Problem. So unterscheiden sich Hydrokolloide nicht nur global in ihrer Struktur und den daraus resultierenden Eigenschaften, sondern sie zeigen auch individuelle Abhängigkeiten gegenüber der Temperatur, dem pH-Wert oder nötigen Zusatzstoffen.

Deutlich wird dies bei der Betrachtung der Gelbildung durch unterschiedliche Hydrokolloide. Gele, die durch Einsatz von Gelatine oder Agar produziert werden, sind thermoreversibel. Dabei werden die Agenzien unter Wärmezufuhr gelöst und bilden beim Abkühlen ein Gel durch Agglomeration einzelner Makromoleküle. Diese Gele können durch erneute Wärmezufuhr wieder verflüssigt werden. Nicht thermoreversibel sind beispielsweise Gele, die durch Einsatz von hoch methoxylierten Pektinen in Kombination mit hohen Zuckerkonzentrationen erhalten werden.

Die individuellen Unterschiede werden unter anderem bei Pektinen deutlich. Bei diesen Hetero-Polysacchariden, deren Hauptkomponente Galacturonsäuremonomere sind (mind. 65 %), wird zwischen hoch- und niederveresterten Pektinen unterschieden. Für die Gelierung mit hochveresterten Pektinen, d.h. mit einem Veresterungsgrad von >50 %, sind ein hoher Zuckeranteil (ca. 65 %) und saure pH-Werte (1 – 3,5) nötig. Bei niederveresterten Pektinen ist die Gelierung über einen breiten pH-Bereich (1 – 7) in Gegenwart von mehrwertigen Ionen wie Calciumionen möglich.

Allgemein erfolgt die Gelbildung durch Bildung eines Netzwerkes der einzelnen Polymermoleküle. Die Verbrückungen untereinander entstehen durch intramolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Anziehungskräfte oder ionische Quervernetzungen. In den dabei entstehenden Zwischenräumen wird Wasser eingeschlossen und fixiert.

Das spezifische Verhalten der einzelnen Hydrokolloide lässt sich nicht nur durch unterschiedliche Rezepturen bzw. Mischungen beeinflussen, sondern auch durch Modifikationen. Besonders bei Stärke existiert eine Vielzahl an Verfahren um jeweils maßgeschneiderte Produkte zu erhalten (PHILLIPS *et al.*, 2000; THARANATHAN, 2005) (Tab. 2).

Tab. 2 Modifikationen von Stärke (Auswahl) nach Phillips *et al.*, 2000, modifiziert

Modifikation	Ziel	Nutzen
Quervernetzung	stärken der Granula	verbesserte Prozesstoleranz gegenüber Hitze, Säure und Scherung
	Verzögerung der Viskositätsentwicklung durch Verlangsamung der Quellung	Produktionseffizienz: verbessertes Eindringen von Hitze, verkürzt die Prozesszeit
Stabilisierung	verhindert das Schrumpfen der Stärkekörner und Stabilisierung bei niedrigen Temperaturen	exzellente Abkühl- und Einfrier-/Auftaustabilität zur Haltbarkeitsverlängerung
	geringere Verkleisterungstemperatur	einfacher zu kochen in System mit hohem Feststoffanteil
Dextrinisierung	Abbau und Neuordnung der Stärkemoleküle führt zu geringerer Viskosität, höherer Stabilität	einfacher zu handhaben, in höheren Konzentrationen einsetzbar als native Stärke für den gewünschten Effekt
		Schaffung von Filmbildungseigenschaften
Oxidation	Einführung von Carbonyl- und Carboxylgruppen mit Erhöhung der Klarheit und Verringerung der Retrogradation von gekochten Stärkekleistern	verbessert die Adhesion von Überzügen weichere, stabile Gele bei höheren Konzentrationen als mit nativer Stärke
	geringere Viskosität und Stabilität bei niedrigen Temperaturen	
lipophile Substitution	Einführung von lipophilen Gruppen	als Emulgator für fett- und ölhaltige Produkte einsetzbar
		verringert Ranzigkeit durch Verhinderung der Oxidation
enzymatische und saure Hydrolyse	Veränderung der Viskosität und Gelstärke	Beeinflussung der Textur und Rheologie

Durch derartige Modifikationen lassen sich gezielt die Geleigenschaften eines Hydrokolloids verändern. Der Austausch von nicht-kovalenten Bindungen durch kovalente führt zur Stabilisierung und Festigung des Netzwerkes. Dadurch lässt sich maßgeblich die Festigkeit von Lebensmittelmatrices beeinflussen. Bisher gibt es dazu nur

eine begrenzte Anzahl an Verfahren. Für Lebensmittel wird dies hauptsächlich bei Stärke angewandt, wo eine chemische Quervernetzung vorrangig durch Distärkephosphate erfolgt, aber auch Quervernetzungen durch andere bi- oder polyfunktionale Reagenzien wie Adipate oder Citrate möglich sind (WURZBURG, 1986).

Die enzymatische Quervernetzung in Lebensmitteln kam bisher hauptsächlich bei Hydrokolloiden auf Proteinbasis zur Anwendung. Durch Transglutaminase lassen sich Proteine über die Ausbildung von Isopeptidbindungen zwischen Glutamin und Lysin quervernetzen. Dies ist seit geraumer Zeit Gegenstand von Untersuchungen, und mikrobiell gewonnene Transglutaminase wird bei unterschiedlichsten Lebensmitteln verwendet (ZHU *et al.*, 1995; KURAISHI *et al.*, 2001). Beispielsweise können Milchproteine wie Caseine quervernetzt werden, um Joghurtprodukte zu erhalten, die stabiler und fester sind (LAUBER *et al.*, 2000; BÖNISCH *et al.*, 2007). Das Proteinnetzwerk in Fleischprodukten wie Würstchen oder Schinken lässt sich ebenfalls durch Transglutaminase stärken (HAMMER, 1998; DONDERO *et al.*, 2006).

Eine andere Art der enzymatischen Quervernetzung ist bei Hydrokolloiden gegeben, die in ihrer Struktur phenolische Komponenten besitzen. Die Phenolgruppen können durch Oxidoreduktasen enzymatisch oxidiert und durch anschließend ablaufende weitere Reaktionen vernetzt werden. Für Tyrosinasen, Laccasen und Peroxidasen wurde eine Quervernetzung von Kohlenhydraten oder Proteinen beschrieben, was vorrangig bei der Teigverarbeitung untersucht wurde.

Bei Behandlung von Weizenmehl mit Tyrosinase wurde eine Erhöhung der Viskosität beobachtet (HOSENEY *et al.*, 1981; SELINHEIMO *et al.*, 2007). Für Laccasen und Peroxidasen (mit Zusatz von  $H_2O_2$ ) wurde ebenfalls die Quervernetzung von Polysacchariden und Proteinen bei Weizenteigen beschrieben (FIGUEROA-ESPINOZA *et al.*, 1999; LABAT *et al.*, 2001).

Diese oxidative Gelierung ist auch bei Zuckerrübenpektin möglich (MICARD *et al.*, 1999; NORSEKER *et al.*, 2000). Zuckerrübenpektin besitzt im Gegensatz zu Citruspektin einen natürlichen Gehalt an Ferulasäure (ROMBOUTS *et al.*, 1986). Auch bei Arabinoxylanen ist die Quervernetzung durch Oxidoreduktasen möglich (NG *et al.*, 1997) und wird ebenfalls zur Verbesserung von Weizenteigen vorgeschlagen (SELINHEIMO *et al.*, 2006; FLANDER *et al.*, 2008).

Der verfügbare Pool an Hydrokolloiden mit endogenen phenolischen Gruppen wie

Ferulasäure ist sehr gering, und zusätzlich unterliegt der Gehalt an Ferulasäure einer natürlichen Schwankungsbreite (PARKER *et al.*, 2005; BARBEROUSSE *et al.*, 2008). Dadurch ist der Einsatz der Oxidoreduktasen zur Quervernetzung bisher begrenzt oder kann erst nach exogener Modifizierung der Hydrokolloide erfolgen.

Eine chemische Modifizierung mit anschließender enzymatischer Quervernetzung wurde für Alginat durchgeführt. Dazu wurde Tyramin nach einer Carbodiimid-Aktivierung der Carboxylgruppen des Alginates kovalent gebunden und anschließend durch ein Peroxidase/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-System zur Gelbildung gebracht (SAKAI *et al.*, 2007). Das gleiche Verfahren wurde zur Erzeugung von medizinischen Hydrogelen angewandt. Als Gerüststruktur wurden dazu Hydrokolloide wie Hyaluronsäure (KURISAWA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2008), Gelatine (SAKAI *et al.*, 2009) oder Carboxymethylcellulose (OGUSHI *et al.*, 2007) verwendet. Diese Methode ist aber aufgrund der physiologischen Wirkung von Tyramin (SHALABY, 1996) nicht für den Einsatz in Lebensmitteln geeignet.

## 2.2 Rheologie

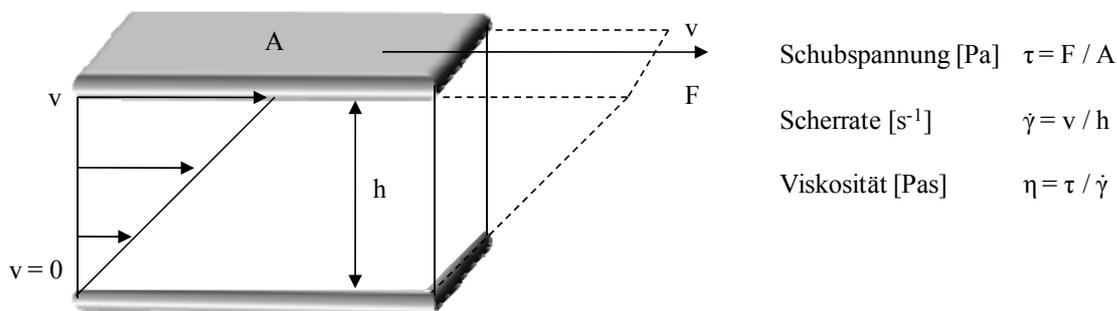
Zur Charakterisierung von Hydrokolloid-Systemen werden unter anderem rheologische Verfahren angewandt. Die Rheologie, abgeleitet aus den griechischen Wörtern für fließen (*rhei*) und Lehre (*logos*), befasst sich mit dem Fließverhalten von Substanzen. Darunter fallen sowohl Flüssigkeiten als auch Festkörper und somit auch deren Deformationsverhalten. Die rheologischen Eigenschaften sind besonders bei Lebensmitteln von Bedeutung, da dadurch nicht nur der Verarbeitungsprozess beeinflusst wird, sondern auch die Textur und somit sensorische bzw. haptische Eigenschaften wie das Mundgefühl.

Das rheologische Verhalten realer Substanzen liegt dabei zwischen dem Verhalten einer idealviskosen (newtonschen) Flüssigkeit und eines idealelastischen (hookeschen) Festkörpers. Newtonsche Flüssigkeiten zeigen ein scherbelastungsunabhängiges Verhalten, d.h. ihre Viskosität ist unabhängig von der Höhe und Dauer der Scherbelastung. Ebenso ist das Deformationsverhalten eines hookeschen Körpers von der Scherbelastung unabhängig, nach Entlastung nimmt er sofort wieder seine Ursprungsform an.

Das Fließverhalten von idealviskosen Flüssigkeiten oder Substanzen, die diesen sehr nahe kommen, kann mit einfachen Messapparaturen wie Auslaufbechern oder Kugelfall-

Viskosimetern bestimmt werden. Die meisten realen Substanzen zeigen aber ein komplexes viskoelastisches Verhalten, d.h. sie besitzen sowohl einen viskosen als auch einen elastischen Anteil. Ihre Viskosität verändert sich bei unterschiedlichen Scherbelastungen. Dadurch kann scherverdünnendes oder scherverdickendes Verhalten auftreten. Bei scherverdünnendem Verhalten nimmt die Viskosität mit steigender Belastung ab, dies trifft beispielsweise auf Kleister oder Polymerlösungen zu. Im Ruhezustand sind diese Substanzen hochviskos, erst durch eine Scherbelastung wie Rühren nimmt die Viskosität ab und sie beginnen schneller zu fließen. Andersherum verhält es sich bei scherverdickenden Stoffen. Bei Dispersionen, beispielsweise hochkonzentrierter Speise-stärke, tritt eine Verfestigung der Probe auf, wenn die Belastung zunimmt.

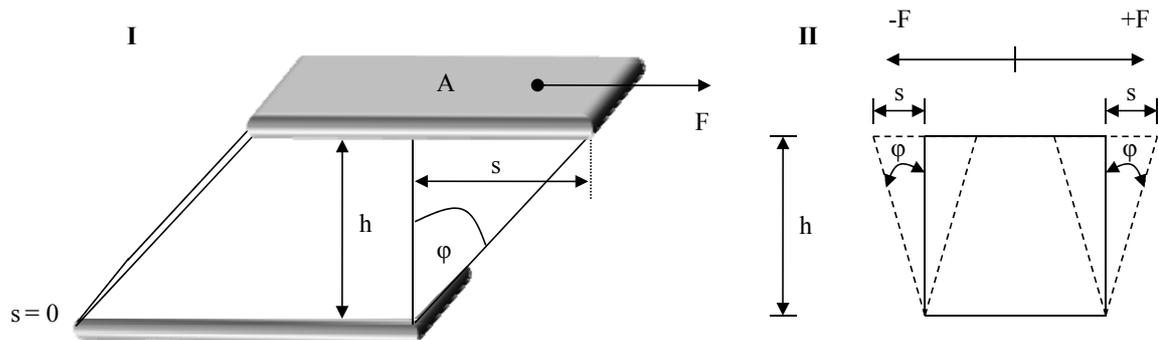
Zur reproduzierbaren Bestimmung solcher komplexer Fließverhalten sind Rotations- und Oszillationsrheometer geeignet. Das Messprinzip baut dabei auf dem Zwei-Platten-Modell auf, bei dem sich die Probe zwischen einer unbeweglichen Platte und einer drehbaren Platte befindet und im Spalt geschert wird (Abb. 1).



**Abb. 1** Fließgeschwindigkeit im Spalt des Zwei-Platten-Modells für Scherversuche in Rotation; A: Scherfläche, F: Scherkraft, v: Geschwindigkeit, h: Plattenabstand, (nach MEZGER, 2010)

Zur Bestimmung der Viskosität werden Rotationsmessungen durchgeführt, bei denen entweder die Scherrate oder die Schubspannung vorgegeben wird und der jeweils andere Parameter die Messgröße darstellt. Mit diesen Rotationsmessungen lassen sich neben der Viskosität auch eine eventuell vorhandene Fließgrenze (die Probe beginnt erst unter einer gewissen Belastung zu fließen) oder zeitabhängiges Verhalten bestimmen. Zu den zeitabhängigen Verhalten zählt unter anderem die Thixotropie. Bei diesem Verhalten baut sich die Strukturstärke einer Substanz während einer Scherbelastung ab und in der Ruhephase wieder vollständig auf. Dieser Vorgang des „Verflüssigens“ ist somit reversibel. Ein Beispiel ist das Verhalten von Ketchup.

Zur Bestimmung des elastischen Verhaltens werden Oszillationsversuche durchgeführt. Dabei rotiert die bewegliche Platte nicht, sondern oszilliert nur mit einer vorgegebenen Auslenkung. Das Verhalten der Substanz ist dabei anders als bei Rotationsversuchen nicht nur von der Geschwindigkeit der Oszillation, d.h. der Frequenz, sondern auch vom Ausmaß der Auslenkung, der Amplitude abhängig. Diese beiden Größen sind dabei unabhängig voneinander.



$$\text{Schubspannung [Pa]} \quad \tau = F / A$$

$$\text{Scherdeformation [1]} \quad \gamma = s / h$$

$$\text{Schubmodul [Pa]} \quad G = \tau / \gamma$$

$$\text{komplexes Schubmodul [Pa]} \quad G^* = \tau(t) / \gamma(t)$$

$$|G^*| = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$$

**Abb. 2 I: Deformation im Spalt des Zwei-Platten-Modells für Scherversuche; II: Scherung bei Oszillationsversuchen; A: Scherfläche, F: Scherkraft, s: Auslenkung, h: Plattenabstand, phi: Auslenkwinkel; (nach MEZGER, 2010)**

Als Ergebnis der Oszillationsmessung erhält man aus der Schubspannung  $\tau$  und der Scherdeformation  $\gamma$  den komplexen Schubmodul  $G^*$ . Dieser stellt dem Widerstand der Substanz gegen die Verformung dar. Der Schubmodul setzt sich aus 2 Größen zusammen, dem Speichermodul  $G'$  und dem Verlustmodul  $G''$ , die sich durch komplexe Mathematik berechnen lassen. Die im Probenmaterial gespeicherte Deformationsenergie wird dabei durch den Speichermodul repräsentiert und ist ein Maß für das elastische Verhalten der Probe. Das irreversible Deformationsverhalten wird durch den Verlustmodul dargestellt und entspricht dem viskosen Verhalten der Probe. Wenn die Probe während der Oszillation teilweise zu fließen beginnt, treten dabei Reibungseffekte auf und ein Teil der Energie geht dadurch verloren.

Mit Hilfe der beiden Module  $G'$  und  $G''$  lässt sich eine Aussage über den Zustand der Probe machen. Wenn der Speichermodul größer als der Verlustmodul ist, besitzt die Probe einen festen Charakter, d.h. die elastischen Eigenschaften überwiegen. Bei größerem Verlustmodul bestimmt das viskose Verhalten den Zustand und die Probe ist flüssig. Der Gel-/Sol-Übergangspunkt ist erreicht, wenn beide Module gleich groß sind.

Durch Oszillationsversuche lassen sich die Zeit- und Temperaturabhängigkeit des Strukturcharakters einer Probe messen. Dazu ist eine zerstörungsfreie Messung nötig. Dies wird erreicht, indem bei geringen Amplituden im linear-viskoelastischen Bereich gemessen wird. In diesem Bereich weisen die beiden Module  $G'$  und  $G''$  keine Abhängigkeit von dem vorgegebenen Ausmaß der Auslenkung und damit der Scherdeformation auf. Dadurch wird das Verhalten der Probe im Ruhezustand gemessen. Durch entsprechende Vorgaben kann so die Gelbildung beispielsweise bei Hydrokolloiden verfolgt werden. So lässt sich beispielsweise die thermoreversible Gelierung von Gelatine verfolgen oder auch die Gelbildung durch Polymerisierung.

### 2.3 Laccase zur oxidativen Gelierung

Oxidoreduktasen bilden die erste Hauptgruppe in der Klassifikation von Enzymen und katalysieren Redoxreaktionen. Eine Untergruppe davon bilden Laccasen (EC 1.10.3.2), diese katalysieren in einer Ein-Elektronen-Reaktion die Oxidation eines aromatischen Substrates, vorrangig Phenole, unter Reduktion von Sauerstoff. Dabei entstehen Radikale, die anschließend weitere nicht enzymatische Reaktionen eingehen, und Wasser (SOLOMON *et al.*, 1996). Aufgrund der bevorzugten Substrate werden Laccasen auch als Monophenol-oxidasen bezeichnet, wobei eine Vielzahl von anderen Substraten wie Di- und Polyphenole, Aniline oder Aromaten ebenfalls oxidiert werden (XU, 1996).

Laccasen gehören zu den ersten beschriebenen Enzymen und wurden ursprünglich aus dem japanischen Lackbaum isoliert (YOSHIDA, 1883). Vorrangig sind sie in Pilzen, besonders in Weißfäulepilzen vertreten (THURSTON, 1994), wurden aber auch in höheren Pflanzen, Bakterien und Insekten nachgewiesen (MAYER *et al.*, 2002; GIARDINA *et al.*, 2010). Mit vier gebundenen Kupfer-Atomen zählen sie zu den Multi-Kupfer-Enzymen. Die Kupferatome werden dabei in Typ1, Typ2 und Typ3 unterschieden (Abb. 3), wobei die Oxidation des Substrates am Typ1 Kupferatom stattfindet. Die beiden Kupferatome

des Typ3 und das Typ2-Atom sind für die Reduktion des Sauerstoffs verantwortlich (MESSERSCHMIDT, 1997; BALDRIAN, 2006).

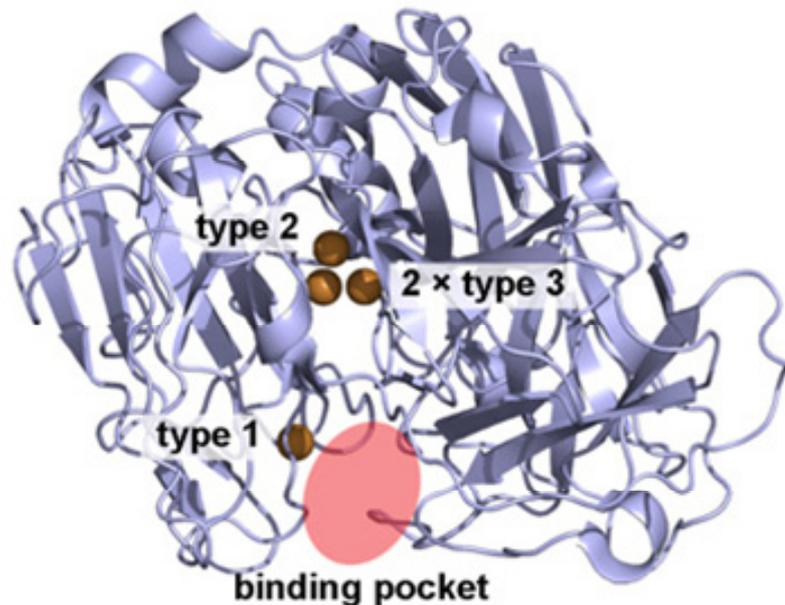
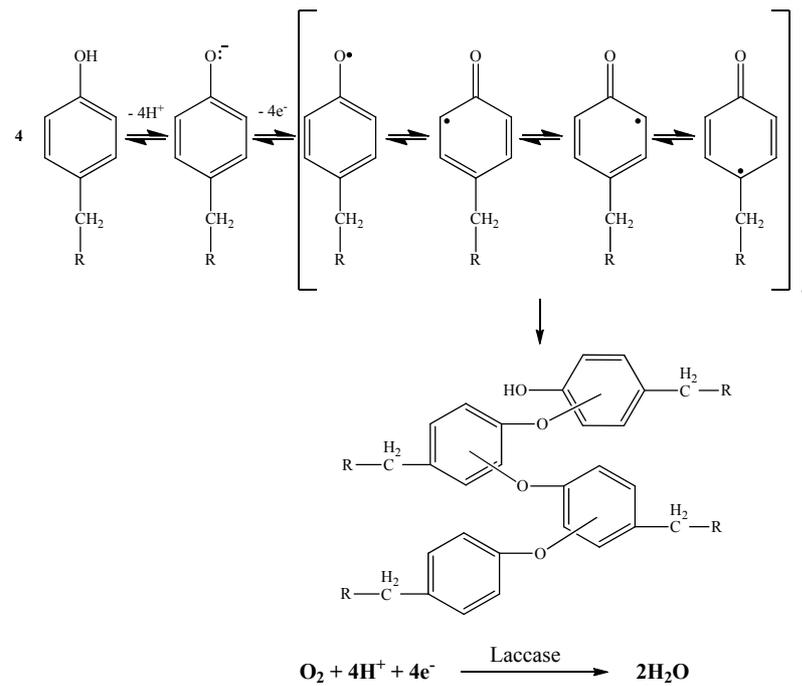


Abb. 3 Modell der Röntgenkristallstruktur der *Trametes versicolor* Lac1 (PDB 1kya) mit den Kupferatomen (orange) und Substratbindungstasche (rot) (RODGERS *et al.*, 2009)

Laccasen aus Pilzen sind am Abbau von Lignin beteiligt und erfüllen weitere Funktionen bei Pigmentierung, Sporulierung, Pathogenität oder Entgiftung (THURSTON, 1994).

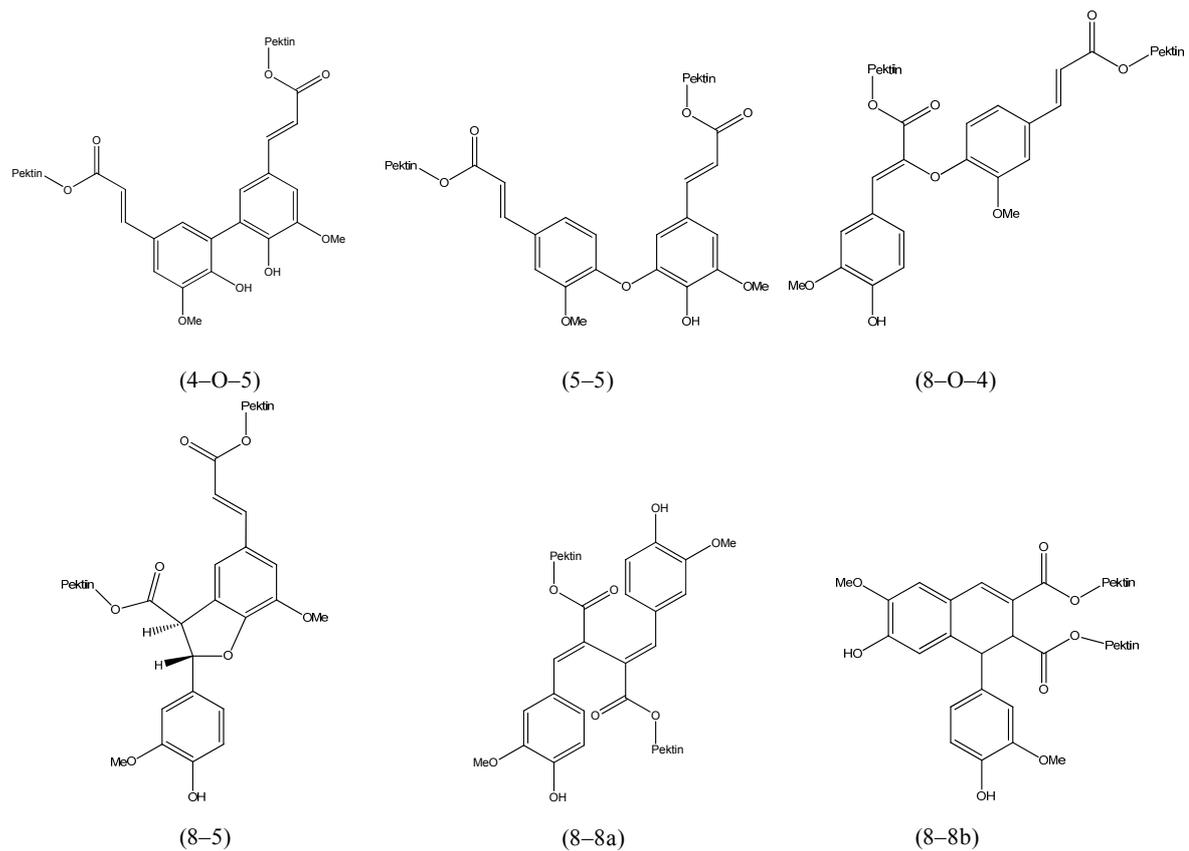
Aufgrund der breiten Substratspezifität und der Bildung von phenolischen Radikalen werden Laccasen bereits für einige industrielle biotechnologische Anwendungen genutzt. Häufig werden sie zur Entfärbung von Abwässern (DURAN *et al.*, 2000; HUSAIN, 2006) und zur Delignifizierung in der Textil-, Färbe- und Papierindustrie eingesetzt (WIDSTEN *et al.*, 2008; GIARDINA *et al.*, 2010).

Neben dem Abbau von Substraten wie Lignin lassen sich durch Laccasen auch Quervernetzungen ausbilden und dadurch eine Gelbildung möglich machen. Da die Substrate dabei ebenfalls oxidiert werden, spricht man von oxidativer Gelierung. Die C-C- und C-O-Crosslinks entstehen dabei durch radikalische Di- bzw. Oligomerisierung von Phenolen (Abb. 4).



**Abb. 4** Laccase katalysierte Redoxreaktion von Phenolen und Sauerstoff (MATTINEN *et al.*, 2006)

Genutzt werden diese durch Laccase katalysierten Verknüpfungen bei der Teigbereitung, um festere Teige zu erhalten (SELINHEIMO *et al.*, 2006). Dabei findet eine Quervernetzung von an Arabinoxylanen veresterten Ferulasäuresubstituenten statt (CARVAJAL-MILLAN *et al.*, 2005). Es wurden auch *Crosslinks* zwischen den Polysacchariden und Proteinen hergestellt (FIGUEROA-ESPINOZA *et al.*, 1999; LABAT *et al.*, 2001). Weitere Möglichkeiten der oxidativen Gelierung durch Laccasen wurden anhand von Zuckerrübenpektin gezeigt (NORSKER *et al.*, 2000). Dabei werden ebenfalls Ferulasäureeinheiten dimerisiert, was zur Ausbildung von unterschiedlichen Dimeren führt (Abb. 5).



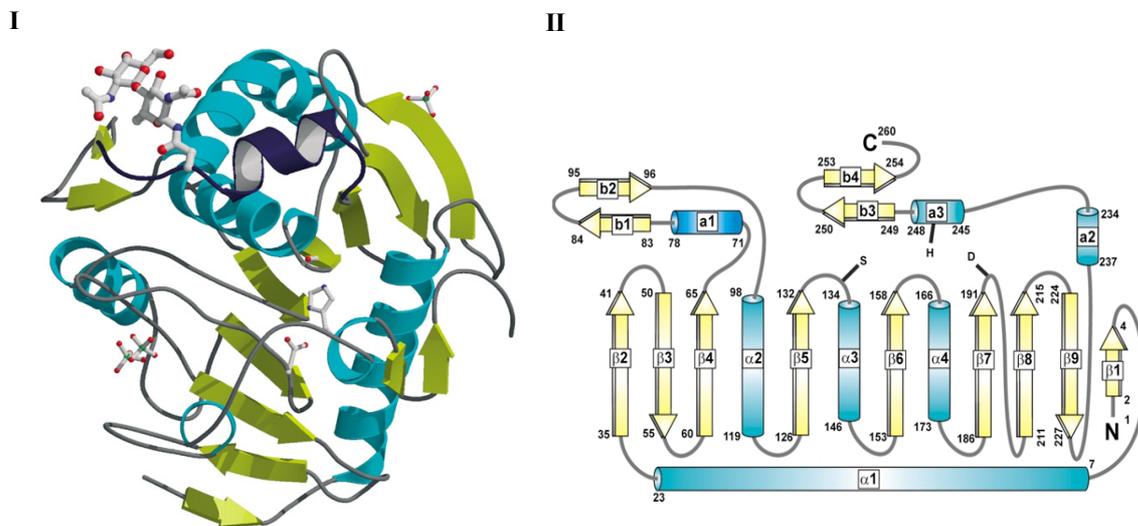
**Abb. 5** Ferulasäuredimere durch oxidatives *Crosslinking* von Zuckerrübenpektin generiert (OOSTERVELD *et al.*, 1997)

Eine Stabilisierung von Proteingelen durch Laccase *Crosslinking* wurde für Caseingele beschrieben, wenn zusätzlich ein Mediator wie Ferulasäure vorhanden ist (ERCILI CURA *et al.*, 2009). Ebenfalls konnte die Quervernetzung und Gelfestigung von gelösten Myofibrillen der Hühnerbrust nachgewiesen werden (LANTTO *et al.*, 2005). Die Proteinquervernetzung wird dabei durch Oxidation von Tyrosin, Cystein oder Tryptophanresten hervorgerufen (FIGUEROA-ESPINOZA *et al.*, 1998; LABAT *et al.*, 2000). Generell zeigen Laccasen gegenüber Proteinen eine schlechtere Reaktivität aufgrund der begrenzten Zugänglichkeit der Tyrosinreste (MATTINEN *et al.*, 2006) oder der höheren Redoxpotentiale der oxidierbaren Aminosäurereste (XU, 1996).

## 2.4 Ferulylesterase

Ferulylesterasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen (EC 3.1.1.73). Die Strukturen der bisher untersuchten Ferulylesterasen zeigen die typische Faltung der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen (Abb. 6). Das Vorhandensein eines ähnlichen Lid- oder Flap-Segmentes wie bei Lipasen wird diskutiert, wobei dieses Segment durch Unterschiede in der Primärstruktur und

Modifikationen hydrophiler ist und das Aktivitätszentrum nicht verschließt (HERMOSO *et al.*, 2004; MCAULEY *et al.*, 2004).



**Abb. 6** Modell der Kristallstruktur der Feruloyl esterase A aus *Aspergillus niger*; I: Bändermodell,  $\alpha$ -Helices blau,  $\beta$ -Faltblätter: grün, Coils: grau, Segmente der Flap/Lid-Region: dunkelblau, katalytische Triade (Ser133, Asp194, His247), Sulfationen und Asn-verknüpfte N-Acetylglucosamineinheit als Ball-Stäbchen-Darstellung; II: Topologiediagramm mit Sekundärstrukturelementen,  $\alpha$ -Helices: blau,  $\beta$ -Faltblätter: gelb, Positionen der katalytischen Aminosäurereste markiert (HERMOSO *et al.*, 2004)

Feruloyl esterases katalysieren die Spaltung von Ferulasäureestern an Polysacchariden. Ihr Vorkommen wurde für eine Vielzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und Pilzen beschrieben (RUMBOLD *et al.*, 2004; FAZARY *et al.*, 2007). Wenig ist bisher über Feruloyl esterases aus Pflanzen bekannt. Für Gerste konnte die Esteraseaktivität nachgewiesen werden (SANCHO *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2005). Im Allgemeinen sind Feruloyl esterases am Abbau von pflanzlichen Zellwandmaterialien wie Xylanen beteiligt. Ferulasäure dient dort der Stabilisierung der Zellwände durch Quervernetzungen innerhalb der Polysaccharide oder mit Lignin. Durch die Hydrolyse von Ferulasäure und deren Dimeren sind die Polysaccharide leichter für andere degradierende Enzyme zugänglich. So wird die Effektivität von Xylanasen gesteigert, wenn gleichzeitig eine Feruloyl esterase anwesend ist (YU *et al.*, 2002). Daher wurden Feruloyl esterases vorrangig in Pilzen gefunden, die pflanzliche Polysaccharide als Energiequelle nutzen (TOPAKAS *et al.*, 2007; BENOIT *et al.*, 2008). Bisher sind Feruloyl esterases aus Ascomyceten, speziell der Gattung *Aspergillus*, am besten untersucht worden (BENOIT *et al.*, 2008). Für Basidiomyceten fand bisher keine Isolierung der Esterasen statt, sondern nur eine Beschreibung der Aktivität für einzelne Arten (MACKENZIE *et al.*, 1988; DINIS *et al.*, 2009).

Ein großes Interesse an Feruloylsterasen besteht aufgrund der Tatsache, dass sie zu einer zusätzlichen Wertschöpfung aus Abfallströmen der Agrarindustrie beitragen können. Die aus Weizen- oder Maiskleie (MACKENZIE *et al.*, 1988), Zuckerrübenpulpe (KROON *et al.*, 2000), Haferhülsen (YU *et al.*, 2002) oder Weizenstroh (BENOIT *et al.*, 2006) freigesetzte Ferulasäure lässt sich als Ausgangs- und Rohstoff für weitere Verarbeitungen einsetzen. Beispielsweise ist eine biokatalytische Umwandlung zu Vanillin, Vanillinsäure oder Vinylguaiacol möglich (ROSAZZA *et al.*, 1995).

Weiterhin werden Feruloylsterasen für die Bioethanolproduktion eingesetzt, da sie in ihrer synergistischen Wirkung mit anderen Enzymen die Ausbeute an fermentierbaren Saccharidmonomeren erhöhen (TABKA *et al.*, 2006).

Neben dem Einsatz zum Abbau von unterschiedlichsten Substraten wurden Feruloylsterasen in der letzten Zeit hinsichtlich ihres Einsatzes für enzymatische Synthesen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ihre Verwendung zur Generierung oder Modifizierung von aliphatischen Alkoholen und Sacchariden möglich ist. Die bei einigen kommerziellen Enzympräparaten als Nebenaktivität enthaltene Feruloylsteraseaktivität wurde genutzt, um unterschiedliche Glycoside und Alkohole wie Glycerol und Butanol mit Ferulasäure zu verestern (MASTIHUBOVÁ *et al.*, 2006; TSUCHIYAMA *et al.*, 2006; COUTO *et al.*, 2010). Mit aus Kulturmedien isolierten Feruloylsterasen war die Umesterung von Ferulasäuremethylester und Arabinose bzw. Arabinobiose in ternären Lösungsmittelmischungen möglich (TOPAKAS *et al.*, 2005b; VAFIADI *et al.*, 2006a). Auch die Möglichkeit der reversen Hydrolyse konnte gezeigt werden. Ferulasäurepentylester wurde in einer Mikroemulsion aus Hexan, Pentanol und Wasser in Kombination mit dem Detergenz CTAB enzymatisch hergestellt (GIULIANI *et al.*, 2001).

## 2.5 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche Enzyme aus Basidiomyceten auf ihre Eignung zur Modifizierung von Hydrokolloiden untersucht werden. Die Arbeit wurde in vier Aufgabengebiete eingeteilt:

1. Die Laccase Lcc1 aus *Meripilus giganteus* sollte auf ihren Einsatz zur oxidativen Gelierung von protein- und polysaccharidhaltigen Systemen getestet und charakterisiert werden.

Weiterhin sollten Modifikationen durchgeführt werden, um phenolische Substrate (Ferulasäure) enzymatisch mit Sacchariden kovalent zu verknüpfen.

2. Dazu war es nötig, geeignete Kandidaten innerhalb der Basidiomyceten zu identifizieren, die entsprechende Esterasen produzieren.
3. Aus Pilzen, die die gesuchte Feruloylsteraseaktivität zeigten, sollten anschließend die verantwortlichen Enzyme isoliert und charakterisiert werden.
4. Für diese für Basidiomyceten neuartigen Enzyme sollte die Fähigkeit zur Synthese von Ferulasäuresaccharidestern nachgewiesen werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Geräte und Chemikalien

#### 3.1.1 Allgemeine Geräte

Tab. 3 Allgemeine Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav 75S	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Autoklav	5075 ELV	Systemec (Wettenberg)
IEF-Flachbettssystem	Multiphor II Multidrive XL	Pharmacia LKB (Schweden)
Inkubator	Certomat HK	B. Braun (Melsungen)
Inkubator	BE 500	Memmert (Schwabach)
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph (Kelheim)
Magnetrührer	Variomag <sup>®</sup>	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
pH-Meter	UB-5	Denver Instruments (Denver, USA)
pH-Meter	GPHR 1400	NeoLab (Heidelberg)
Photometer	UV 1650 PC	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Pipetten	Transferpette	Brand (Wertheim)
Schüttler	Multitron	Infors (Einsbach)
SDS-PAGE	Minigel-Twin System	Biometra (Göttingen)
Sterile Werkbank	safeflow 1.2	Nunc (Wiesbaden)
Sterile Werkbank	Clean Air CA RE 4	Clean Air (Hilden)
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Thermoschüttler	-	Schuttron (Quedlinburg)
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Thermoschüttler	MHR 13	HLC Biotech (Bovenden)
Ultraschallbad	RK 100 H	Bandelin electronic (Berlin)
Ultraturrax	TP-18/10	IKA Labortechnik (Staufen)
Vortex	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waage	SI-234	Denver Instruments (Denver, USA)
Wasseraufbereiter	GenPure UC-TOC/UF	TKA (Niederelbert)

Gerät	Typ	Hersteller
Wasserbad	SW22	Julabo (Seelbach)
Zentrifuge	Sorval RT7-Plus	Kendro (Langenselbold)
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Zentrifuge	Mikro R200 R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge	Rotina R380 R	Hettich (Tuttlingen)

### 3.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid Rotiphorese	Gel 40	Carl Roth (Karlsruhe)
Agar-Agar		Carl Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roti <sup>®</sup> garose	Carl Roth (Karlsruhe)
Ameisensäure	98 – 100 %	Merck (Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	> 98 %	Carl Roth (Karlsruhe)
L-(+)-Arabinose	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
L-Asparagin Monohydrat	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6'-sulfonsäure)diammoniumsalz (ABTS)	purum 99% HPLC	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bernsteinsäure Dinatriumsalz Hexahydrat	> 99 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
bovines Serumalbumin (BSA)	> 96 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau		Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid Dihydrat	99%	Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\beta$ -Casein		Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Caseinhydrolysat	f. d. Mikrobiologie	Merck (Darmstadt)
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	> 98 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Coomassie Brillant Blue G 250	pure	Serva (Heidelberg)
Coomassie Brillant Blue R 250	pure	Serva (Heidelberg)
Deuteriumoxid	mind. 99,96 %	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Rotipur	Carl Roth (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)		Carl Roth (Karlsruhe)

Chemikalie	Qualität	Hersteller
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	> 99 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure	99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Ferulasäure	puriss	Aldrich/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ferulasäuremethylester	99 %	Alfa Aesar (Karlsruhe)
Formaldehyd	37 % (w/v)	Carl Roth (Karlsruhe)
D-(-)-Fructose	f. d. Mikrobiologie	Merck (Darmstadt)
D-(+)-Galactose	f. d. Mikrobiologie	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D-(+)-Glucose Monohydrat	f. d. Mikrobiologie	Merck (Darmstadt)
Glycerin	> 99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycin	f. d. Molekularbiologie	Applichem (Darmstadt)
Hefeextrakt	f. d. Mikrobiologie	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	> 99,5 %	Merck (Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat	> 99 %	Merck (Darmstadt)
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat	99 %	Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
$\beta$ -Lactoglobulin		Sigma/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
D-(+)-Lactose Monohydrat	Ph. Eur.	Carl Roth (Karlsruhe)
D-(+)-Maltose-Monohydrat	90 –95 %	Sigma/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Magnesiumsulfat Heptahydrat	rein	Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Mangan(II)sulfat Monohydrat	> 98 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methyl- $\alpha$ -D-glucoopyranosid	99 %	Sigma/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumacetat	> 99 %	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	> 99,5 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Natriumborhydrid	99%	Aldrich/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumcarbonat	99,8 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	p. a.	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dinatriumhydrogenphosphat	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat	p. a.	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydroxid	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumsulfat	> 99 %	Riedel-de Haën/ Sigma- Aldrich (Taufkirchen)
Dinatriumtartrat Dihydrat	purum	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumthiosulfat Pentahydrat	p. a.	Merck (Darmstadt)
<i>p</i> -Nitrophenol	> 99 %	Aldrich/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>p</i> -Nitrophenylbutanoat	98%	Sigma/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat		Sigma/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pepton aus Casein	f. d. Mikrobiologie	Riedel-de Haën/ Sigma- Aldrich (Taufkirchen)
Precision Plus Protein Standard (All Blue)		BioRad (München)
D-(+)-Saccharose	> 99,5 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	32 %	Fisher (Schwerte)
SDS	> 98 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Silbernitrat	p. a.	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED	f. d. Elektrophorese	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-HCl	> 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	reinst	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tween 80		Riedel-de Haën/ Sigma- Aldrich (Taufkirchen)
Zimtsäure	> 99 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Chemikalie	Qualität	Hersteller
Zimtsäuremethylester	> 99 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Zink(II)sulfat Heptahydrat	> 99 %	Fluka/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Zuckerrübenpektin RU 301		Herbstreith&Fox

### 3.1.3 Lösungsmittel

Lösungsmittel	Qualität	Hersteller
Acetonitril	HPLC	SDS Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich)
Acetonitril	HPLC-MS	Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich)
<i>tert</i> -Butanol	zur Synthese	Merck (Darmstadt)
Diethylether	Rotisolv <sup>®</sup>	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol	96 %	KWST (Hannover)
Hexan	HPLC	SDS Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich)
Methanol	HPLC	SDS Carlo Erba Réactifs (Val de Reuil, Frankreich)
MTBE	HPLC	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pentan	> 95% reinst	Carl Roth (Karlsruhe)
Toluol	> 99,5 %	Riedel-de Haën/ Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Wasser	HPLC-MS	J.T.Baker (Deventer, Niederlande)

### 3.2 Rheologische Messungen

Die rheologischen Messungen wurden mit einem Physica MCR301 Rheometer der Firma Anton Paar durchgeführt. Mit der dazugehörigen Software Rheoplus erfolgte die Datenaufzeichnung und -auswertung. Als Messgeometrie wurde ein Kegel/Platte-System verwendet, wobei der Kegel mit abgenommener Spitze als Rotor fungierte und einen Kegelwinkel von  $\alpha = 1^\circ$  und einen Kegelradius von  $R = 25 \text{ mm}$  hatte. Der durch die Geometrie vorgegebene Messspalt betrug  $a = 99 \text{ }\mu\text{m}$ . Um strukturzerstörungsfreie

Messungen durchzuführen, erfolgten diese im Oszillationsmodus im linear-viskoelastischen (LVE) Bereich der Probe.

Zur Bestimmung des LVE-Bereiches wurden Amplitudensweeps mit einer vorgegebenen Frequenz von  $f = 1$  Hz und einem Messbereich zwischen  $\gamma = 0,01$  bis 100 % als Deformationsamplitude mit sechs Messpunkten pro Dekade aufgenommen. Vor Messbeginn wurde nach der Probenaufgabe eine zehnmünütige Wartephase für den Relaxationsprozess eingefügt.

Das zeit-, bzw. temperaturabhängige Verhalten wurde durch Messungen im LVE-Bereich (Standardvorgaben  $f = 1$  Hz,  $\gamma = 1$  %) aufgenommen. Die Einstellung der jeweiligen Temperatur erfolgte über die Software. Die Probe wurde direkt vor der Aufgabe mit der entsprechenden Enzymlösung gemischt und auf die untere Messplatte gegeben. Nach Anfahren des Messkegels in die endgültige Messposition wurde wie nach Herstellerangaben verfahren und überschüssiges Probenmaterial entfernt, so dass der Messspalt circa 1 mm über seinen Rand hinaus befüllt war. Als Verdunstungsschutz wurde ein Silikonöl (DC 200) aufgegeben und anschließend sofort die Messung gestartet.

### 3.3 Oxidatives *Crosslinking* mit Lcc1

Die verwendete Laccase Lcc1 aus *Meripilus giganteus* wurde am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover von Herrn Gunnar Schmidt isoliert (SCHMIDT *et al.*, 2011). Für Quervernetzungsversuche mit Polysacchariden wurde das Zuckerrübenpektin Betapec RU 301 von Herbstreith&Fox verwendet. 2%ige Lösungen in Wasser wurden durch kontinuierliches Rühren bei 70 °C hergestellt. Für die Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit wurden die Lösungen in Phosphat- oder Acetat-Puffer mit dem entsprechendem pH-Wert angesetzt. Für die rheologischen Messungen wurden 1,2 mL Zuckerrübenpektinlösung mit 20  $\mu$ L Lcc1 (20 U mL<sup>-1</sup>, entspricht 0,33 U mL<sup>-1</sup> Pektinlösung) versetzt und sofort am Rheometer vermessen (vgl. 3.2).

Für die Versuche zur Quervernetzung von Proteinen wurden Standardproteine (bovines Serumalbumin BSA,  $\beta$ -Lactoglobulin und  $\beta$ -Casein) in einer Konzentration von 0,5 mM in 50 mM Phosphatpuffer pH 6 (bzw. Puffer mit entsprechendem pH-Wert) gelöst. Für  $\beta$ -Lactoglobulin wurden außerdem Lösungen mit einem Zusatz von Ferulasäure als Mediator (0,05 mM Endkonzentration) hergestellt. Die Proteinlösungen wurden mit Lcc1 versetzt und 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten maximalen Enzymmengen variierten für die einzelnen Standardproteine (Tab. 4).

Tab. 4 Maximale eingesetzte Enzymmengen der Lcc1 zur Quervernetzung von Proteinen

Standardprotein [0,5 mM]	Enzymmenge Lcc1 [U mL <sup>-1</sup> ]
BSA	4
$\beta$ -Lactoglobuline	12
$\beta$ -Casein	1,5

Anschließend wurde zur Visualisierung der Proteine eine SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese mit Coomassie-Färbung durchgeführt (vgl. 3.8).

### 3.4 Verwendete Organismen

Tab. 5 Verwendete Organismen; DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande; JMRC: Jenaer Mikroorganismen Sammlung, Institut für Mikrobiologie, Jena; CCBAS: Culture Collection of Basidiomycetes, Institute of Microbiology, Prag, Tschechische Republik; GAU: Institut für Molekulare Holzbiotechnologie, Georg-August-Universität, Göttingen

Organismus	Stamm	Herkunft
<i>Agaricus arvensis</i>	8327	DSMZ
<i>Armillaria mellea</i>	100.12	CBS
<i>Bjerkandera adusta</i>	230.93	CBS
<i>Ganoderma applanatum</i>	250.61	CBS
<i>Grifola frondosa</i>	480.63	CBS
<i>Hericiium erinaceum</i>	260.74	CBS
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	L 13-2	JMRC
<i>Phellinus pini</i>	5238	DSMZ
<i>Phlebia radiata</i>	5111	DSMZ
<i>Pholiota populnea</i>	264.32	CBS
<i>Piptoporus betulinus</i>	583	CCBAS
<i>Pleurotus floridanus</i>		GAU

Organismus	Stamm	Herkunft
<i>Pleurotus sapidus</i>	8266	DSMZ
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	353.63	CBS
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	614.73	CBS
<i>Trametes sp.</i>	11309	DSMZ
<i>Wolfiporia cocos</i>	279.55	CBS

### 3.5 Medien

#### 3.5.1 SNL-Standardnährlösung (SPRECHER, 1959)

D-(+)-Glucose Monohydrat	30,0 g
L-Asparagin Monohydrat	4,5 g
Hefeextrakt	3,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
Spurenelementlösung	1 mL
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

Einstellung mit 1 M NaOH auf pH 6,0

#### Spurenelementlösung

FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,08 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,09 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,03 g
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,005 g
Titriplex III (EDTA)	0,4 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

#### 3.5.2 SNL-Agar

10-15 g L<sup>-1</sup> Agar-Agar wurden SNL-Medium zugegeben und nach Sterilisation in Petri-schalen gegossen.

### 3.5.3 GCM-Ganoderma complete medium (CHOITER *et al.*, 2008)

Saccharose	20 g
D-(+)-Glucose Monohydrat	20 g
Pepton	4 g
Caseinhydrolysat	5 g
Hefeextrakt	10 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,50 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,46 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 L

## 3.6 Kulturführung der Basidiomyceten

### 3.6.1 Kultivierung auf SNL-Agar in Petrischalen

Die Basidiomyceten wurden zur eigenen Stammhaltung auf SNL-Agar Arbeitsplatten gehalten. Dazu wurde jeweils ein bereits bewachsenes Agar-Stück ausgestochen und auf eine neue Agarplatte inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C im Dunkeln. Nachdem das Myzel ca.  $\frac{3}{4}$  der Platte bedeckte, wurde diese bei 4 °C gelagert.

### 3.6.2 SNL-Vorkultur

Erlenmeyerkolben (300 mL, ohne Schikane) wurden mit 100 mL SNL Medium befüllt und autoklaviert. Von einer bewachsenen Agarplatte wurde ein 1 x 1 cm<sup>2</sup> Stück ausgestochen, in den Kolben mit SNL überführt und mit dem Ultra-Turrax Stab zerkleinert. Die Kulturen wurden bei ca. 24 °C und 150 rpm inkubiert. Nach ausreichend Myzelwachstum wurde die Vorkultur als Inokulum für die Hauptkulturen verwendet. Das Inokulumvolumen betrug 1/10 des Hauptkulturvolumens.

### 3.6.3 Hauptkultur

#### Standardkultivierung

Erlenmeyerkolben (500 mL, ohne Schikane) wurden mit 250 mL SNL Medium gefüllt und autoklaviert. Nach Inokulierung erfolgte die Inkubation analog zur Vorkultur.

### **Kultivierung *Pleurotus sapidus* mit Tween 80 Induktion**

Die Kultivierung wurde analog der Standardkultivierung durchgeführt mit dem Zusatz, dass zur Hauptkultur 0,4 % (1 mL) Tween 80 zugegeben wurden. Tween 80 diente zur Induktion der Esteraseproduktion von *Pleurotus sapidus*.

### **Kultivierung *Ganoderma applanatum* in statischer Kultur**

Bei der späteren, statischen Kultivierung von *Ganoderma applanatum* wurde auf eine Vorkultur verzichtet, außerdem wurden die Kolben nicht geschüttelt. Die Hauptkultur (SNL oder GCM) wurden mit einem 1 x 1 cm<sup>2</sup> großen Agarstück einer bewachsenen SNL-Agarplatte inokuliert. Das Agarstück wurde dazu unter sterilen Bedingungen mit dem Skalpell in kleine Stücke zerteilt und diese dann in den Erlenmeyerkolben überführt. Die Inkubation erfolgte bei ca. 24 °C im Dunkeln.

## **3.7 Puffer**

### **Tartrat/Succinat Puffer 100 mM**

Natriumtartrat	2,3 g
Natriumsuccinat	2,7 g
Wasser	95 mL

Mit konz. HCl pH-Wert auf 3,5 bis 6,5 eingestellt und ad 100 mL mit Wasser aufgefüllt.

### **Tris Puffer 200 mM pH 7,1 (4 °C)**

Tris-HCl	0,1959 mol
Tris	0,004 mol
Wasser	0,950 L

Der pH-Wert wurde bei 21 °C auf 6,6 eingestellt, ad 1 L mit Wasser aufgefüllt. Bei Verwendung bei 4 °C stellte sich ein pH-Wert von 7,1 ein.

### **Natriumacetat Puffer 100 mM**

Eisessig	6,005 g
Wasser	0,950 L

Der pH-Wert wurde mit konz. NaOH auf 3,8 bis 5,7 eingestellt und ad 1 L mit Wasser aufgefüllt.

### **Natriumphosphat Puffer 100 mM**

Natriumdihydrogenphosphat	12 g
---------------------------	------

Wasser 0,950 L

Der pH-Wert wurde mit konz. HCl bzw. NaOH auf 6,5 bis 8,0 eingestellt und ad 1 L mit Wasser aufgefüllt.

### 3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### SDS-PAGE Laufpuffer 10x

Tris base	30,2 g
Glycin	144,2 g
SDS	10,0 g
VE-Wasser	ad 1 L

Der Puffer wurde 1:10 verdünnt und eingesetzt.

#### SDS-PAGE 2x Single Gel Puffer

Tris Base (76 mM)	9,21 g
Serin (100 mM)	10,51 g
Glycin (100 mM)	7,51 g
Asparagin (100 mM)	15,01 g
VE-Wasser	ad 0,5 L

Der Puffer wurde auf pH 7,4 eingestellt und mit 0,22 µm Filter sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C, eventuell auftretende Kristallisation wurde vor Verwendung durch kurzzeitiges Erhitzen in der Mikrowelle beseitigt.

#### SDS-PAGE Ladepuffer

1,5 M Tris/HCl-Puffer pH 6,8	2 mL
1 M DTT-Stocklösung	4 mL
40 % Glycerin/8 % SDS/ Bromphenolblau (50 mg L <sup>-1</sup> )	10 mL
VE-Wasser	ad 20 mL

Der Puffer wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Herstellung nativen Puffers erfolgte ohne Zugabe der DTT-Lösung.

#### APS-Lösung

Ammoniumperoxodisulfat	400 mg mL <sup>-1</sup>
------------------------	-------------------------

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**Single-Gele 12 %**

dest. H <sub>2</sub> O	1,4 mL
2 × Puffer	3,5 mL
AA/BAA 37,5:1	2,1 mL
APS-Lsg.	7,5 µL
TEMED	3,5 µL

**Durchführung**

Es wurden das Mini Twin System (Biometra) oder das Miniprotean TetraCell System (BioRad) genutzt. Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Ladepuffer gemischt. Bei denaturierender SDS-PAGE folgte für 10 min ein Erhitzungsschritt bei 95 °C und anschließendes Abkühlen auf 4 °C.

Bei semi-nativer SDS-PAGE wurde Ladepuffer ohne DTT verwendet und es erfolgte kein Erhitzungsschritt. Durch das im Laufpuffer enthaltene SDS ist diese Elektrophorese dennoch nicht vollständig nativ und wird daher als semi-nativ bezeichnet. Bei Verwendung von IEF-Gelstücken wurden diese mit 20 µL Ladepuffer versetzt und erhitzt.

Die Gele wurden im Kammersystem installiert und dieses mit 1xLaufpuffer blasenfrei gefüllt. Je nach Probe wurden 10 – 20 µL in eine Geltasche geladen. Vom Protein-Standard-Marker (Biorad) wurden 5 µL verwendet. Bei IEF-Gelstücken wurden einerseits die Ladepufferlösung andererseits die IEF-Gelstücke selbst in die PAGE-Taschen eingebracht.

Zur Elektrophorese wurden 20 mA pro Gel angelegt. Bei semi-nativer Durchführung erfolgte die Elektrophorese bei 4 °C und mit 10 mA pro Gel. Nachdem das Bromphenolblau des Ladepuffers aus dem Gel eluierte, wurde die Elektrophorese beendet. Die Gele wurden von den Glasplatten gelöst und nach den entsprechenden Protokollen gefärbt.

**3.9 Coomassie-Färbung****CBB-Lösung (SDS-PAGE)**

Coomassie Brilliant Blue G-250	60 – 80 mg
VE-Wasser	ad 1 L

2 – 3 h rühren bei Raumtemperatur mit anschließender Zugabe von circa 3 mL HCl. Die Aufbewahrung der Färbelösung erfolgte im Dunkeln.

Vor der Färbung wurde das Gel dreimal mit je 20 mL VE-Wasser gewaschen um störendes SDS zu entfernen. Dazu wurde es jeweils 30 s in der Mikrowelle erhitzt und dann 5 min leicht geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit CBB-Lösung bedeckt, für 10 s in der Mikrowelle erhitzt und zur Färbung mindestens 10 min leicht geschwenkt. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde das Gel bei Bedarf mit VE-Wasser gewaschen.

### **Coomassie R (IEF)**

Ethanol	250 mL
Eisessig	100 mL
Coomassie Brilliant Blue R-250	500 mg
VE-Wasser	ad 1 L

Nach Auflösung des Farbstoffes wurde die Lösung filtriert und im Dunkeln aufbewahrt.

### **Entfärbe-Lösung**

Ethanol	250 mL
Eisessig	80 mL
VE-Wasser	ad 1 L

IEF-Gele wurden vor der Coomassie-Färbung kurz mit VE-Wasser gewaschen, anschließend mit Coomassie R bedeckt und bis zur ausreichenden Färbung leicht geschwenkt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch leichtes Schwenken des Geles in Entfärbe-Lösung.

## **3.10 Silberfärbung**

### **Lösung I**

Ethanol	30 %
Eisessig	10 %

### **Lösung II**

Ethanol	20 %
---------	------

### **Lösung III**

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	$0,2 \text{ g L}^{-1}$
--	------------------------

### **Lösung IV**

Silbernitrat	$2,0 \text{ g L}^{-1}$
--------------	------------------------

**Lösung V**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	30 g L <sup>-1</sup>
Formaldehyd (37 %)	0,25 mL L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	12,5 mg L <sup>-1</sup>

**Lösung VI**

Tris 8 %	50 %
Essigsäure 4 %	50 %

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

**Durchführung:**

- 1) Gel 30 min in Lösung I fixieren
- 2) 2x10 min in Lösung II inkubieren
- 3) 1 min in Lösung III sensitivieren
- 4) 2x1 min in H<sub>2</sub>O waschen
- 5) 20 min in Lösung IV inkubieren
- 6) 2x10 min mit H<sub>2</sub>O waschen
- 7) mit Lösung V entwickeln
- 8) mit Lösung VI stoppen

**3.11 Isoelektrische Fokussierung**

Zur analytischen IEF wurden Fertiggele von SERVA mit immobilisiertem pH-Gradienten (pH 3 – 10 bzw. 3 – 6) verwendet. Zur Wärmeableitung wurde etwas Kerosin auf die Kühlplatte aufgetragen und anschließend das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Die Elektrodendochte wurden mit jeweils 1 mL/10 cm Anoden- bzw. Kathodenflüssigkeit getränkt und auf die markierten Stellen des Gels gelegt. Zur Probenfixierung wurden Silikonapplikatorstreifen unterschiedlicher Dimensionierung verwendet. Von Proben wurden bis zu 15 µL und vom Marker (SERVA) 5 µL aufgetragen. Die Fokussierung erfolgte bei max. 2000 V, 6 mA und 12 W für 3500 Vh. Bei Verwendung von halbierten Gelen wurden die Stromstärke und Leistung auf 3 mA und 6 W reduziert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele je nach gewünschter Weiterbehandlung in einzelne Abschnitte zerschnitten.

### 3.12 Fast protein liquid chromatography (FPLC)

Zur Isolierung der Esterasen aus Kulturmedium wurde die ‘Fast Protein Liquid Chromatography‘ eingesetzt. Verwendet wurde ein System der Firma Bio-Rad. Dieses bestand aus der Biologic-Duo-Flow Anlage in Kombination mit dem Fraktionsssammler Modell 2128. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm. Die Datenaufzeichnung und –auswertung erfolgte mit der Software Bio Duo Flow Workstation. Die Durchführung erfolgte bei 4 °C.

Als Trennmaterial wurden unterschiedliche Säulen und Trennprinzipien verwendet. Einen Überblick über die Säulen gibt Tab. 6 und Tab. 7 über die angewandten Methoden.

Tab. 6 Übersicht der verwendeten FPLC-Säulen

Säule	Volumen	Trennmethode
SP Sepharose FF	25 mL	IEX starker Kationenaustauscher
SP Sepharose FF	1 mL	IEX starker Kationenaustauscher
Q Sepharose XL	1 mL	IEX starker Anionenaustauscher
DEAE Sepharose FF	1 mL	IEX schwacher Anionenaustauscher
Superdex 75 10/300 (Spherical composite of <i>crosslinked</i> agarose and dextran)	24 mL	SEC
Phenyl Sepharose	1 mL	HIC

Die Menge der aufgegebenen Probe und die Flussrate wurden entsprechend des jeweiligen Säulenvolumens gewählt. Die Wahl der Fraktionsgrößen erfolgte anhand des erwarteten Elutionsvolumens des Zielproteins (Standardfraktionsgrößen 1 mL und 5 mL). Die Puffer wurden entsprechend des jeweiligen Trennprinzips angepasst. Zielaktivität enthaltene Fraktionen eines Trennschrittes wurden vereinigt, konzentriert und für den nächsten Trennschritt eingesetzt.

Tab. 7 Übersicht der verwendeten FPLC-Methoden

Organismus	Methode	Puffer	Methode
Psa	IEX (Kationen)	A: 50 mM Natriumacetat pH 5,1 B: 20 mM Tris pH 7,1	Probe mit A verdünnen (1:1); pH 5,1; Probenaufgabe (100 mL/25 mL Säule, 1 mL/1 mL Säule); Spülen mit A; Elution mit B (ohne Gradient)
Psa	HIC	A: 50 mM Tris pH 7,1 + 1 M Natriumchlorid B: 50 mM Tris pH 7,1	Probenaufgabe; Spülen mit A, Elution mit B (linearer Gradient)
Gap	IEX (Anionen)	A: 20 mM Tris pH 7,1 B: 20 mM Tris pH 7,1 + 1 M Natriumchlorid	Probe mit A verdünnen (1:10); pH 6,5 – 7,1; Probenaufgabe (1 mL/1 mL Säule); Spülen mit A; Elution mit Stufengradient B (5% Schritte)
Gap	SEC	200 mM Tris pH 7,1	Probenaufgabe (250µL); Elution ohne Gradient

Bei der Isolierung der Esterase aus *Ganoderma applanatum* mit der Anionenaustauschchromatographie als ersten FPLC-Trennschritt war es ausschlaggebend, das Konzentrat des Mediums ausreichend zu verdünnen (1:5 – 1:10), um die Leitfähigkeit möglichst niedrig zu halten (bis  $3 \text{ mS cm}^{-1}$ ). Anderenfalls kam es bereits im Durchbruch zur Elution der Zielaktivität.

### 3.13 High pressure liquid chromatography (HPLC)

Die Analyse von Ferulasäure und deren Derivaten sowie von Zimtsäure erfolgte mittels HPLC. Verwendet wurde eine Hewlett-Packard Ti-Series 1050 Anlage bestehend aus Degaser-, Pumpen-, Autosampler- und Multi-Wavelength-Detektor-Einheit (MWD). Als Trennmaterial wurde eine monolithische Chromolith-Performance RP-18e Säule von Merck mit der Dimension 100 – 4,6 mm verwendet. Die Datenaufzeichnung und –auswertung erfolgte mit der Agilent ChemStation Software für LC und LC/MS Systeme.

Als Fließmittel wurden Wasser mit 0,05% Ameisensäure und Acetonitril in einer Gradientenmischung verwendet (Tab. 8). Die Flußrate betrug 1,5 mL/min. Die HPLC-Methode wurde im Lauf der Arbeit zur reinen Bestimmung von Ferulasäure, Ferulasäuremethylester und Ferulasäuresaccharidestern gekürzt, da der Methylester bereits nach 5,2 min eluierte (Tab. 9). Zur Detektion wurde die Absorption bei den Wellenlängen 254, 280 und 325 nm aufgezeichnet. Zur Bestimmung des Gehaltes an Ferulasäure und deren Derivaten wurde das 325 nm Signal verwendet, da dies dem zweiten Absorptionsmaximum von Ferulasäure entspricht. Die anderen beiden Wellenlängen dienten der Überprüfung auf eventuell andere enthaltene absorbierende und coeluisierende Substanzen. Bei der Auswertung wurden dazu die Peakflächenverhältnisse der einzelnen Wellenlängen untereinander überwacht.

**Tab. 8 HPLC-Gradientenprogramm**

Zeit [min]	0,05 % Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
0	90	10
10	10	90
11	0	100
15	0	100
20	90	10

**Tab. 9 Verkürztes HPLC-Gradientenprogramm zur Bestimmung von Ferulasäure und Derivaten**

Zeit [min]	0,05 % Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
0	90	10
4	58	42
5	0	100
8	0	100
11	90	10
12	90	10

### 3.14 High pressure liquid chromatography mit Massenspektrometriekopplung

Die Bestimmung der Molekülmassen mittels HPLC-MS/MS (Varian 212-LC Pump, ProStar 325 UV-Vis Detector, 320-MS TQ Mass Spectrometer) erfolgte ähnlich der Standard-HPLC-Analyse. Die Fließmittel waren ebenfalls Wasser mit 0,05 % Ameisensäure und Acetonitril (beide in MS-Qualität). Die Trennung erfolgte mittels RP-18 Säule von Macherey-Nagel (Nucleodur C18 Pyramid 5  $\mu\text{m}$ ) der Dimension 250 – 4 mm und angepassten Trennprogramm (Tab. 10) bei einem Fluss von 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$ . Die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 254 und 325 nm. Die Detektion der Molekülmassen erfolgte mittels Quadrupol Massenspektrometer im ESI negativ Modus mit folgenden Systemparametern:

ESI Nadel Spannung:	-4500 Volt
ESI Schild Spannung:	-600 Volt
Trocknungsgastemperatur:	350 °C
API Gehäusetemperatur:	50 °C
Zerstäuber Gasdruck:	55 psi
Trocknungsgasdruck:	25 psi
Gas:	N <sub>2</sub>
Massenbereich:	150 – 600 m/z

Tab. 10 HPLC-MS-Gradientenprogramm

Zeit [min]	0,05 % Ameisensäure [%]	Acetonitril [%]
0	90	10
5	90	10
20	0	100
30	0	100
35	90	10

### 3.15 Präparative Schäumung

Zur Schäumung der Esterase aus *Pleurotus sapidus* wurde Kulturüberstand der mit Tween 80 induzierten Kulturen verwendet und das Verfahren nach LINKE *et al.*, 2009 durchgeführt. Das Kulturmedium konnte durch noch vorhandenes Tween 80 ohne weitere Zusätze geschäumt werden oder es wurde bei nicht ausreichend Schaumstabilität Tween 80 nachdotiert. Weiterhin wurden als Detergentien Triton-X 100 und CTAB eingesetzt. Vor der Schäumung wurde der pH-Wert auf 7, für Versuche zur isoelektrischen Schäumung auf die pI-Werte des zu schäumenden Zielproteins eingestellt. Die Schäumungsapparatur bestand aus einem Vorlagengefäß mit Fritte (Chromatographiesäule aus Glas), aufgesetztem Glasrohr mit Glaskugel (250 mL) als Trennstrecke und einem U-Rohr zur Überleitung des Schaumes. Der Schaumbrecher bestand aus einer Absaugflasche und Trichter, über den mittels Vakuumpumpe der Schaum kontinuierlich angesaugt wurde. Zur Schaumbildung wurde Stickstoff mit ca.  $60 \text{ mL min}^{-1}$  über die Fritte eingeleitet. Die Dimension der Apparatur wurde je nach Vorlagenvolumen gewählt (50 – 250 mL). Der erhaltene verflüssigte Schaum und das in der Vorlage verbliebene Retentat wurden anschließend auf Enzymaktivitäten untersucht.

### 3.16 Bestimmung des Ferulasäuregehaltes in Polysacchariden

Die Bestimmung der Ferulasäuregehaltes von Zuckerrübenpektin und Arabinoxylanen erfolgte durch alkalische Hydrolyse der Esterbindungen und nach Extraktion der freigesetzten Ferulasäure durch HPLC-Analyse (3.13).

Es wurden 25 mg des Polysaccharids in 2,5 mL einer wässrigen Lösung von 4 % Natriumhydroxid und 0,5 % Natriumborhydrid über Nacht hydrolysiert. Anschließend wurde mit Salzsäure ein pH-Wert von ca. 2 eingestellt und die Lösung drei Mal mit je 10 mL Pentan/Ether extrahiert. Die organischen Phasen wurden abgenommen, vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 1 mL Methanol aufgenommen und zur HPLC-Analyse eingesetzt. Zur Quantifizierung der freigesetzten Ferulasäure wurden die Mengen mittels externer Kalibrierung mit Standardlösungen von Ferulasäure berechnet.

### 3.17 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

Die Bestimmung der Proteingehalte von Lösungen wurde mittels Bradford-Reagenz nach Anleitung des Herstellers (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Der Assay wurde in 96 Well-Platten und mit BSA als Standardprotein durchgeführt. Zuerst wurde das Bradford-Reagenz auf Raumtemperatur angewärmt und leicht geschüttelt. 5 µL der Standardproteinlösung oder der Probenlösung wurden in separate Wells pipettiert, als Blindwert diente reine Pufferlösung. Anschließend wurde in jedes Well 250 µl des Bradford-Reagenz gegeben und die Platte für 30 Sekunden geschüttelt. Nach einer Inkubationsdauer von 5 – 45 min bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm mittels Microplatereader vermessen. Der Proteinfarbkomplex ist dabei bis zu 60 Minuten stabil und die Messung aller Proben sollte innerhalb von 10 Minuten erfolgen. Die Berechnung der Probenkonzentration erfolgte mittels der BSA-Kalibriergeraden.

### 3.18 Proteinsequenzierung

Zur Sequenzierung wurden Proteinbanden aus denaturierender SDS-PAGE mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, dreimal mit bidest. Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. Die Sequenzierung wurde am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig von Herrn Dr. Manfred Nimtz durchgeführt. Nach tryptischem Verdau wurden die Proben für die Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-tandem MS<sup>2</sup>) vorbereitet. Für diese wurde ein Q ToF II-Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) mit Nanospray-Ionenquelle und goldbeschichteten Kapillaren (Protona, Odense, Denmark) verwendet. Zur kollisionsinduzierten Fragmentierung wurden mehrfach geladene Molekülonen vom Quadrupol-Analysator selektiv in die Kollisionszelle überführt (25 to 30 eV). Mittels orthogonalem Flugzeit-(time of flight)-Analysator wurden die gebildeten Tochterionen getrennt. Die aufgenommenen MS-MS-Spektren wurden nach Verstärkung zur Sequenzbestimmung der tryptischen Peptide verwendet. Die Sequenzvergleiche erfolgten mit dem Protein Basic Local Alignment Search Tool von NCBI.

### 3.19 Bestimmung von Enzymaktivitäten

#### 3.19.1 Bestimmung der Laccaseaktivität

Die Bestimmung der Laccaseaktivität erfolgte mittels ABTS-Assay. Dabei wird 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS) durch Laccase zu dem farbigen Radikal  $ABTS^{•+}$  oxidiert, welches photometrisch bei 420 nm gemessen werden kann. Bestimmt wurde die Kinetik der Umsetzung, d.h. die Änderung der Absorption in Abs/min. Mittels einer Kalibriergeraden kann die Aktivität in Units berechnet werden. Eine Unit entspricht dabei dem Umsatz von einem Mikromol Zielsubstrat pro Minute. Die Durchführung erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten und zur photometrischen Messung wurde ein Synergy 2 Mikrotiterplattenleser der Firma BioTek mit dazugehöriger Software (Gen5) verwendet.

#### Durchführung

Natrium-Tartrat-Puffer	150 $\mu$ L
VE-Wasser	105 $\mu$ L
Probe (3x mischen)	15 $\mu$ L

Bei 30 °C ca. 10 min schüttelnd inkubieren, um Ansatzlösung auf Messbedingungen zu temperieren.

ABTS 5 mM (mischen)	30 $\mu$ L
---------------------	------------

Bei 30 °C Kinetik bei 420 nm messen (Zunahme der Absorption).

#### Tartratpuffer 200 mM pH 4,5

Dinatriumtartrat	46,016 g
------------------	----------

Den pH-Wert mit konz. HCl bzw. NaOH auf 4,5 einstellen und ad 1 L mit VE-Wasser auffüllen.

#### ABTS 5 mM

ABTS	46,016 g
------	----------

Ad 10,0 mL mit VE-Wasser lösen.

#### 3.19.2 Bestimmung der Lipase-Aktivität mit Tween 80

Die qualitative Bestimmung der Lipase-Aktivität erfolgte mittels Tween 80 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat) Agarosegelen. Dazu wurde Tween 80 zusammen

mit Calciumchlorid in 1%ige Agarosegele einpolymerisiert und die zu untersuchende Enzymprobe zusammen mit dem Gel inkubiert. Dies erfolgte einerseits als Overlaygel, bei dem ein analytisches IEF-Gel auf das Tween-Gel gelegt wurde und andererseits durch Ausstanzen von Löchern im Tween-Gel und Einfüllen der Enzymprobe. Nach erfolgter Inkubation erfolgte ein Überschichten mit 0,1 M Natriumhydroxidlösung. Lipaseaktivität wurde durch einen weißen Hof angezeigt, welcher durch Fällung der aus der Hydrolyse freigesetzten Ölsäure mit Calciumionen entsteht.

### Durchführung

#### Lösung I

Tween 80	1 g
Calciumchlorid	20 mg
Tris/HCl-Puffer 50 mM pH 7	100 mL

#### Lösung II

Agarose	2 g
Tris/HCl-Puffer 50 mM pH 7	100 mL

Die Agarose wurde durch Kochen gelöst und Lösung I hinzugeben. Zum Aushärten wurde die Lösung in Petrischalen oder als Platte gegossen und abkühlen gelassen. Nach über Nacht Inkubation wurde mit 0,1 M NaOH überschichtet.

### 3.19.3 Bestimmung der Esterase-Aktivität mit *p*-Nitrophenylderivaten

Zur quantitativen Bestimmung der Esterase-Aktivität wurden *p*-Nitrophenolester als Modellsubstrate verwendet. Standardmäßig erfolgte die Bestimmung mit *p*-Nitrophenylbutanoat (*p*-Nitrophenylpalmitat zur Untersuchung auf Spezifität). Bei der Hydrolyse wird *p*-Nitrophenol als gelber Farbstoff freigesetzt, welcher bei 410 nm gemessen werden kann. Bestimmt wurde die Kinetik der Umsetzung, d.h. die Änderung der Absorption in Abs/min. Mittels einer Kalibriergeraden kann die Aktivität in Units berechnet werden. Eine Unit entspricht dabei dem Umsatz von 1 Mikromol Zielsubstrat pro Minute. Die Durchführung erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten und zur photometrischen Messung wurde ein Synergy 2 Mikrotiterplattenleser der Firma BioTek mit dazugehöriger Software (Gen5) verwendet. Als Blindwert wurde jeweils ein Ansatz mit dest. Wasser anstelle der Probe mitgeführt.

**Durchführung**

Puffer-Lösung:

100 mM Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % TritonX-100, 50 mM NaCl

Substratlösung:

50 mM *p*-Nitrophenylbutanoat in Ethanol (Palmitat in Acetonitril)

Pufferlösung 175  $\mu$ L

*p*-Nitrophenylbutanoat 5  $\mu$ L

Probe 20  $\mu$ L

Bei 37 °C Kinetik bei 410 nm gemessen (Zunahme der Absorption).

**3.19.4 Bestimmung der Esterase-Aktivität mit Zimtsäure- und Ferulasäuremethylester**

Die qualitative und quantitative Bestimmung der Esteraseaktivität gegenüber Ferulasäureestern und Zimtsäuremethylester erfolgte mittels HPLC. Standardmäßig wurde Ferulasäuremethylester verwendet. Zur Untersuchung der Esterasespezifität wurden aus Maiskleie isolierte Ferulasäurearabinosylester (ALLERDINGS *et al.*, 2006) und Zimtsäuremethylester verwendet. Zur qualitativen Bestimmung der Esteraseaktivität wurden enzymhaltige Proben (Myzelaufschlüsse, Kulturüberstände oder Fraktionen der chromatographischen Aufreinigung) mit dem jeweiligen Ester, gelöst in Puffer, gemischt und inkubiert. Nach ausreichender Inkubation wurde der Ansatz mit Acetonitril verdünnt, stark zentrifugiert, gegebenenfalls filtriert (0,45  $\mu$ m) und zur HPLC-Analyse eingesetzt (3.13). Ein typischer Ansatz zur Untersuchung von Myzelaufschlüssen oder Kulturüberständen wurde wie folgt durchgeführt: 125  $\mu$ L Probenlösung wurden mit 375  $\mu$ L 1,33 mM Substratlösung (in 100 mM Tris-Puffer pH 7; 3 % DMSO zur Lösung des Substrates) gemischt, bei 37 °C über Nacht inkubiert, 500  $\mu$ L Acetonitril zugegeben, 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur HPLC-Analyse verwendet. Bei jeder Analyse wurde ein Kontrollansatz mit Wasser statt Probenlösung mitgeführt. Esteraseaktivität wird durch das Auftreten der jeweiligen freien Säure angezeigt. Bei späteren Aktivitätsbestimmungen und zur quantitativen Analyse wurde eine 2 mM Ferulasäuremethylesterlösung in 100 mM Tartrat/Succinat-Puffer verwendet. Zusätzlich enthielt die Lösung 1,33 mM Natriumazid zur Inaktivierung von Laccasen und 1 M Natriumchlorid (Natriumchlorid in diesem Konzentrationsbereich führte zur Aktivitätssteigerung). Bei Verwendung von Natriumchlorid war eine Verdünnung mit

50%iger Acetonitril/Wasser-Mischung nötig, da es sonst zu Bildung eines 2-phasigen Systems kam. Durch Erhöhung der Verdünnung mit Acetonitril (von Faktor 2 auf 15) konnten die Untersuchungen mit deutlich kleineren Volumina durchgeführt werden. Die eingesetzte Probenmenge konnte je nach Aktivität variieren (Verhältnis Probe:Substratlösung von 1:1 bis 1:5) und bei Fraktionen aus chromatographischer Aufreinigung auf Zentrifugation und Filtration verzichtet werden. Ein typischer Ansatz zur Bestimmung der Reaktionsparameter-Abhängigkeit wurde wie folgt durchgeführt: 2  $\mu\text{L}$  Esteraselösung wurden mit 8  $\mu\text{L}$  2 mM FAM/ 1 M NaCl/ 1,33 mM  $\text{NaN}_3$  gemischt, bei gegebener Temperatur 4 h inkubiert, anschließend mit 140  $\mu\text{L}$  Acetonitril (50%) verdünnt und direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Zur Bestimmung der pH- und Temperaturabhängigkeiten der Esterasen wurden die Puffer der Substratlösung (Tartrat/Succinat-Puffer, Phosphat-Puffer, Tris-Puffer) und die Inkubationstemperatur variiert.

Zur Quantifizierung der freigesetzten Ferulasäure wurden die Gehalte mittels externer Kalibrierung mit Standardlösungen von Ferulasäure berechnet. Eine Unit [U] an Feruloylesteraseaktivität wurde als die Menge an Enzym definiert, die 1  $\mu\text{mol}$  Ferulasäure innerhalb einer Minute freisetzt. Als Blindwerte wurden jeweils Ansätze mit dest. Wasser anstelle der Probe mitgeführt.

### 3.20 Myzelaufschluss

Im Screening wurde das Myzel der untersuchten Basidiomyceten mittels Precellys<sup>®</sup>24 Homogenisator der Firma Bertin Technologies aufgeschlossen. Dazu wurden 2  $\text{cm}^2$  Myzel vom äußeren Drittel einer Agarplatte in die 2 mL Aufschlussbehälter gegeben. Anschließend wurden Glasperlen (0,25 – 0,50 mm) und 1 mL Tris-Puffer pH 7 hinzugefügt. Die Homogenisierungseinheit wurde mit flüssigem Stickstoff und der dazugehörigen Kühleinheit Cryolys gekühlt, um ein zu starkes Erwärmen der Probe zu verhindern. Das Aufschlussprogramm wurde mit den Parametern 2 x 5800 rpm für jeweils 15 s mit 10 s Abkühlpause verwendet. Anschließend wurden die Aufschlussbehälter bei 18000 g zentrifugiert und der Überstand für die Aktivitätstests (3.19.4) verwendet.

### 3.21 Umesterung in organischen Lösungsmitteln

Versuche zur Umesterung von Ferulasäuremethylestern mit Sacchariden, bzw. Veresterung von Ferulasäure mit Sacchariden wurden in organischen Lösungsmitteln analog zum

ternären Lösungsmittelsystem aus Hexan/*tert*-Butanol/Wasser 47,2/50,8/2 nach VAFIADI *et al.* (2006) durchgeführt. Dazu wurden die Ferulasäuresubstrate 10 mM in den organischen Lösungsmitteln (Toluol, MTBE, Acetonitril, Hexan/*tert*-Butanol) gelöst. 10  $\mu\text{mol}$  des jeweiligen Monosaccharides (ca. 2 mg) (Arabinose, Glucose,  $\alpha$ -D-Methylglycopyranose) wurden in 20  $\mu\text{L}$  Enzymlösung gelöst. Zur wässrigen Saccharid-Enzym-Lösung wurde 1 mL der organischen Ferulasäuresubstratlösung gegeben und sofort kurz geschüttelt, um eine Feinverteilung der wässrigen Phase zu erhalten. Die Inkubation erfolgte bei 40 °C. Zur Analyse wurden 100  $\mu\text{L}$  Aliquots entnommen, mittels Stickstoffstrom zur Trockne eingengt, in 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril (50%) aufgenommen und zur HPLC-Analyse (3.13) eingesetzt.

### 3.22 Umesterung in wässriger Lösung

Die Umesterung der Mono- und Disaccharide erfolgte in wässriger Lösung. Dazu wurden in Anlehnung an TSUCHIYAMA *et al.* (2006) gesättigte Lösungen in 100 mM Tartrat-Succinat-Puffer pH 6 hergestellt. Die Saccharide wurden im Überschuss zur Pufferlösung und 6 h bei 50 °C erhitzt und geschüttelt. Verwendet wurde der Überstand nach kurzer Zentrifugation. Als Feruloyldonor wurde Ferulasäuremethylester zu 1% (später 10%) in DMSO gelöst. Ein typischer Umesterungsansatz wurde wie folgt durchgeführt: 44  $\mu\text{L}$  der Saccharidlösung wurden mit 6  $\mu\text{L}$  Ferulasäuremethylesterlösung (in DMSO) versetzt, 2  $\mu\text{L}$  100 mM Natriumazid zugegeben und durch Vortexen homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  Esteraselösung und erneutes Vortexen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Zur Analyse wurden 10  $\mu\text{L}$  Aliquots entnommen, mit 140  $\mu\text{L}$  Acetonitril (50%) verdünnt und zur HPLC-Analyse (3.13) eingesetzt. Zur Quantifizierung der gebildeten Ester wurden die Gehalte mittels externer Kalibrierung mit Standardlösungen von Ferulasäure berechnet, da die Ester nicht als Standardsubstanzen verfügbar waren. Die Ermittlung der Konversionsrate in mol-% erfolgte bezogen auf die eingesetzte Menge an Ferulasäuremethylester (6  $\mu\text{L}$  1 % FAM/57  $\mu\text{L}$  Ansatz: 5,055 mmol L<sup>-1</sup>).

### 3.23 Präparative Synthese des Saccharoseferulates

Die Synthese des Saccharoseferulates wurde analog zu 3.22 unter Vergrößerung des Ansatzvolumens durchgeführt. Zu 4,4 mL der gesättigten Saccharoselösung wurden 300  $\mu\text{L}$  der Ferulasäuremethylesterlösung (10 % in DMSO) zugegeben und mit 200  $\mu\text{L}$

100 mM Natriumazid versetzt. Nach Homogenisierung der Lösung erfolgten die Zugabe von 2 mL Esteraselösung und eine erneute Durchmischung. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 63 h wurde der komplette Ansatz mit der vierfachen Menge an Wasser (28 mL) verdünnt und mit 1 M HCl der pH-Wert auf 2 eingestellt. Die Extraktion von überschüssigem Methylester und von freigesetzter Ferulasäure erfolgte durch mehrfaches Ausschütteln mit Pentan/Ether (je 20 mL) bis in der wässrigen Phase mittels HPLC-Analyse keine Ferulasäure und kein Ferulasäuremethylester mehr nachgewiesen werden konnte.

Die Isolierung des Syntheseproduktes erfolgte mittels Fest-Phasen-Extraktion (SPE). Das Säulenmaterial der Chromabond C18 ec SPE-Kartusche von Macherey-Nagel (6 mL, 500 mg, Ref: 730014) wurde vor der Verwendung mit 6 mL Acetonitril konditioniert und anschließend mit 6 mL Wasser equilibriert. Nach Aufgabe des wässrigen Syntheseansatzes wurde nicht veresterte Saccharose mit 2 x 7 mL Wasser eluiert. Die Elution des Saccharoseferulates erfolgte mit 2 mL Acetonitril.

Zur Aufnahme der Kernspinresonanzspektren wurde das in Acetonitril gelöste Produkt unter Stickstoffstrom zur Trockne eingengt und in Deuteriumoxid aufgenommen.

### 3.24 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Experimente wurden am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover von Herrn Dr. Jörg Fohrer und Frau Monika Rettstadt durchgeführt. Die Aufnahme der eindimensionalen Kernspinresonanzspektren und der zweidimensionalen HSQC-Spektren (heteronuclear single quantum coherence) erfolgten mittels Bruker DPX 400 MHz Spektrometer mit 5 mm BBO (Z-GRD) Breitband-Probenkopf und BACS Probenwechsler. Die Frequenz bei  $^1\text{H}$ -Spektren betrug 400 MHz und bei  $^{13}\text{C}$ -Spektren 100 MHz. Die Aufnahme der zweidimensionalen HMBC (heteronuclear multiple bond coherence) und TOCSY-Spektren (total correlated spectroscopy) erfolgten mittels Bruker DRX 500 MHz Spektrometer mit 5 mm TCI  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  (Z-GRD) Cryo-Probenkopf.

### **3.25 Entsorgungshinweise**

#### **Biologisches Material**

Pilzkulturen und Nährlösungen wurden vor der Entsorgung durch Autoklavieren (121 °C, 40 min) sterilisiert. Das sterilisierte Nährmedium und feste Bestandteile wurden als Laborabfall entsorgt.

#### **Lösungsmittel und Chemikalien**

Nicht wieder verwendbare Lösungsmittelreste wurden getrennt nach folgenden Gruppen gesammelt:

- nichthalogenierte wassermischbare Lösungsmittel
- nichthalogenierte nicht wassermischbare Lösungsmittel
- halogenierte Lösungsmittel

Die gesammelten Lösungsmittel wurden ebenso wie andere Sonderabfälle (schwermetallhaltig o.ä.) der Zentralen Betriebseinheit Entsorgung der Leibniz Universität Hannover zugeführt.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Laccase aus *Meripilius giganteus* zur oxidativen Gelierung

Die aus dem Basidiomyceten *Meripilius giganteus* isolierte Laccase Lcc1 (SCHMIDT *et al.*, 2009) wurde auf ihre Eignung zum Einsatz zur oxidativen Gelierung untersucht. Als Modellsubstrat für Hydrokolloide mit Polysaccharidstruktur wurde Zuckerrübenpektin verwendet. Zuckerrübenpektin besitzt im Gegensatz zu Citruspektin schlechtere Gelierungseigenschaften (TOWLE *et al.*, 1973), hat aber einen natürlichen Gehalt an veresterter Ferulasäure (ROMBOUTS *et al.*, 1986). Durch oxidatives *Crosslinking* können Dimere der Ferulasäure gebildet werden (OOSTERVELD *et al.*, 1997).

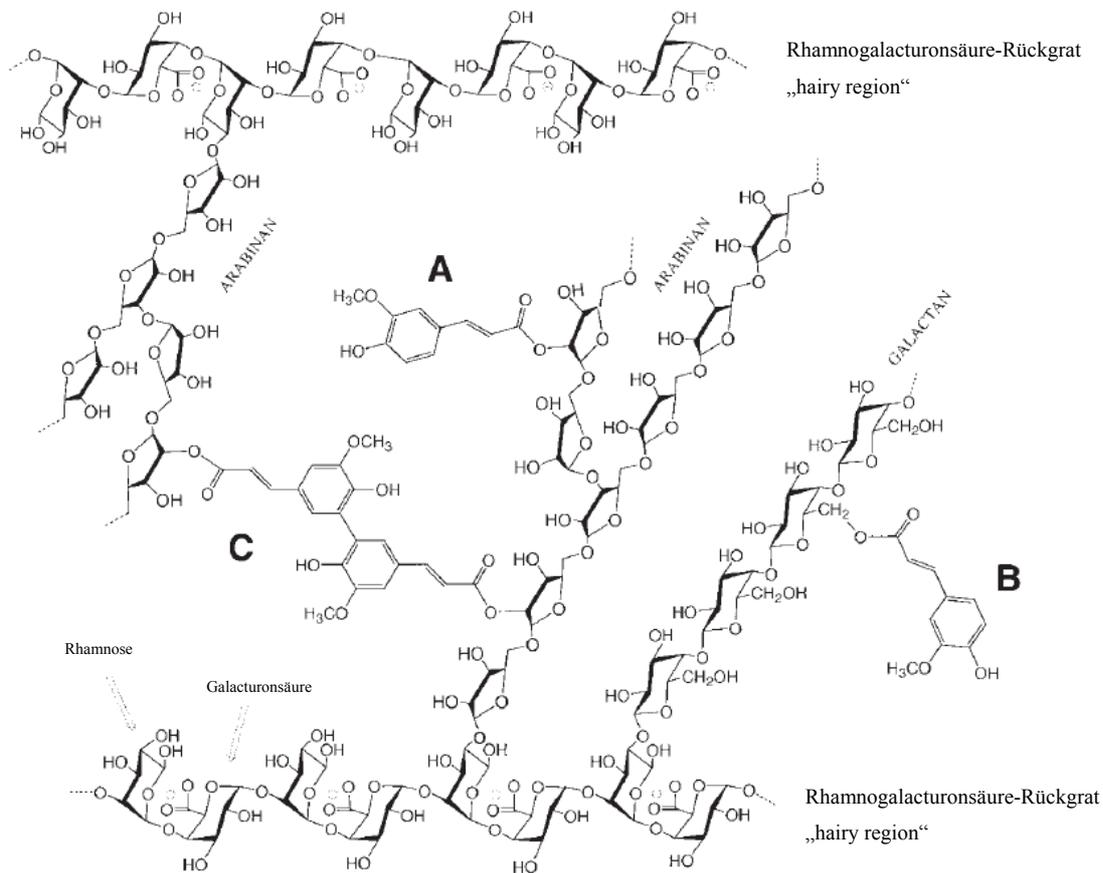
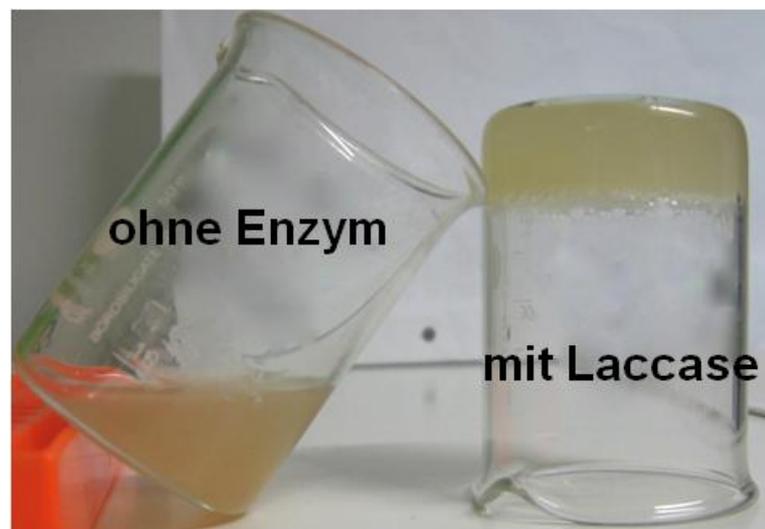


Abb. 7 Strukturausschnitt von teilweise vernetztem Zuckerrübenpektin mit Ferulasäureveresterung, gezeigt Rhamnogalacturonsäure-Rückgrat der „hairy“ region, nicht gezeigt „smooth“ aus  $\alpha$ -1,4-verknüpften Galacturonsäure-Einheiten : (A) Feruloyl-Gruppe verknüpft an C(O)2 der Arabinofuranosyl-Einheit; (B) Feruloyl-Gruppe an C(O)6 der Galactopyranosyl-Einheit; (C) Diferuloyl-Gruppe an C(O)2 der Arabinofuranosyl-Einheiten (5-5' dimer). (WONG, 2006)<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nutzung mit Genehmigung von Springer Science + Business Media

Diese kovalenten Bindungen führen zu einer Stabilisierung des dreidimensionalen Netzwerkes des Hydrokolloids (Abb. 7), wodurch stabile Gele erhalten werden können (MICARD *et al.*, 1999; NORSKER *et al.*, 2000).

Das Zuckerrübenpektin Betapec RU 301 von Herbstreith&Fox<sup>2</sup> hatte einen Ferulasäuregehalt von circa 0,43 %. Die Laccase Lcc1 ist in der Lage aus flüssigen Zuckerrübenpektinlösungen durch oxidative Quervernetzung der Ferulasäurereste stabile und feste Gele zu erzeugen. Eine 2 %ige Zuckerrübenpektinlösung bildet unter Zugabe von 5 U Laccase pro Gramm Zuckerrübenpektin bei Raumtemperatur nach circa 30 min ein selbsttragendes Gel (Abb. 8).



**Abb. 8** Oxidative Gelierung von Zuckerrübenpektin durch Laccase Lcc1

Zur Untersuchung der Gelbildung wurden rheologische Messungen mit dem Rheometer Physica MCR 301 durchgeführt. Die Messungen erfolgten im Oszillationsmodus im linear viskoelastischen Bereich (LVE) der Zuckerrübenpektinlösung bei einer Deformationsrate von 1 % und einer Frequenz von 1 Hz. Durch Verwendung der Oszillationsmessung konnte der Ruhezustand der Probe und die Gelbildung ohne Beeinflussung durch die Messanordnung beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen wurden die Gelbildung in Abhängigkeit der Temperatur und des pH-Wertes bei Verwendung der Lcc1 untersucht.

<sup>2</sup> Das Zuckerrübenpektin wurde freundlicherweise von der „Herbstreith & Fox KG“, Neuenbürg zur Verfügung gestellt

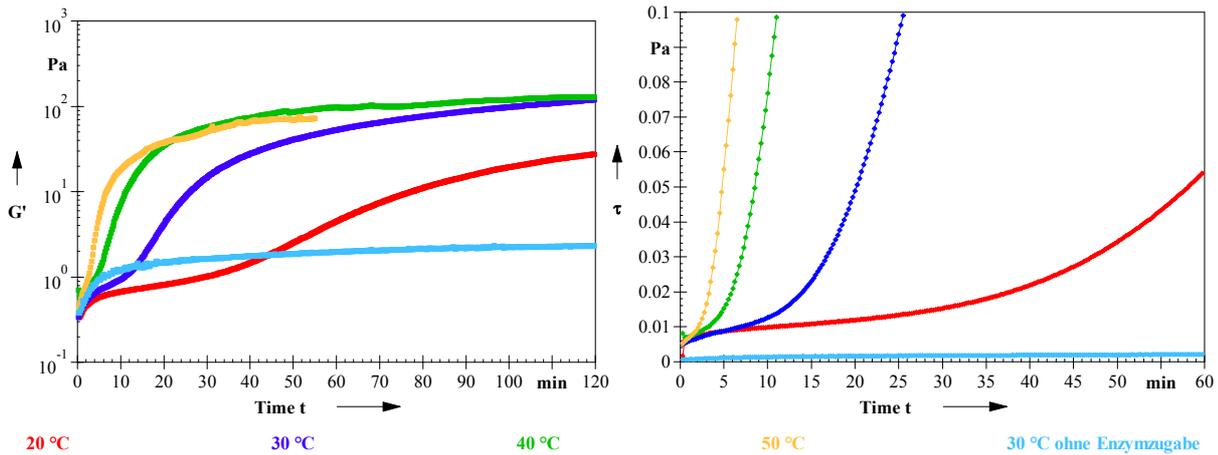


Abb. 9 Rheologische Parameter während der oxidativen Gelierung von 2 %iger Zuckerrübenpektinlösung mit Lcc1 (0,33 U/mL) in Abhängigkeit von der Temperatur; links: Speichermodul  $G'$ ; rechts: Schubspannung  $\tau$

Bei der Betrachtung der Temperaturabhängigkeit (Abb. 9) zeigte sich, dass mit steigender Temperatur die Gelierung der Probe schneller abläuft. Das Speichermodul, als Maß des elastischen Anteils der Probe, steigt bei 20 °C nach einer Inkubationsdauer von circa 40 Minuten langsam an. Bei 50 °C ist die Aktivität der Laccase deutlich gesteigert und die Gelierung beginnt nahezu direkt nach Messbeginn. Deutlich ist dies auch bei Betrachtung der gemessenen Schubspannung zu erkennen.

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Zuckerrübenpektinigelierung durch die Laccase Lcc1 (Abb. 10) zeigte, dass die schnellste Gelbildung am pH-Optimum<sup>3</sup> der Laccase stattfindet. Bei pH-Werten kleiner 3 konnte keine Gelbildung mehr beobachtet werden. Die Laccase ist bis zu einem pH-Wert von 2,0 noch aktiv<sup>3</sup>, aber Pektine sind auf Grund ihrer Struktur in ihrem Verhalten sehr sensitiv gegenüber pH-Änderungen (PHILLIPS *et al.*, 2000). Bei höheren pH-Werten nimmt die Festigkeit des durch Quervernetzung ausgebildeten Geles ab.

Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen mit Zuckerrübenpektin RU von Herbstreith&Fox bei denen Laccase aus *Trametes hirsuta* verwendet wurde (0,09 U/mL bei 1,5 %iger Zuckerrübenpektinlösung; KUUVVA *et al.*, 2003), konnte generell mit dem hier verwendeten Zuckerrübenpektin unter Einsatz der Laccase Lcc1 eine Gelbildung durch oxidative Quervernetzung beobachtet werden. Der Ablauf der Quervernetzung und die Geschwindigkeit der Änderung der rheologischen Eigenschaften der Gele werden dabei vorrangig durch die Laccaseaktivität beeinflusst. Bei einer höheren Laccaseaktivität findet ein schnellerer Übergang vom Sol- zum Gelcharakter statt.

<sup>3</sup> unveröffentlichte Daten Schmidt, G., Optimum pH 4 – 4,5 für phenolische Substrate

Anhand des Modellsubstrates Zuckerrübenpektin konnte die Eignung der Laccase Lcc1 zur oxidativen Gelierung von Hydrokolloiden auf Polysaccharidbasis nachgewiesen werden. Die finalen rheologischen Parameter der gebildeten Gele sind dabei nicht von der eingesetzten Laccase, sondern vorrangig vom eingesetzten Hydrokolloid und dessen Struktureigenschaften abhängig (MICARD *et al.*, 1999; KUUVVA *et al.*, 2003).

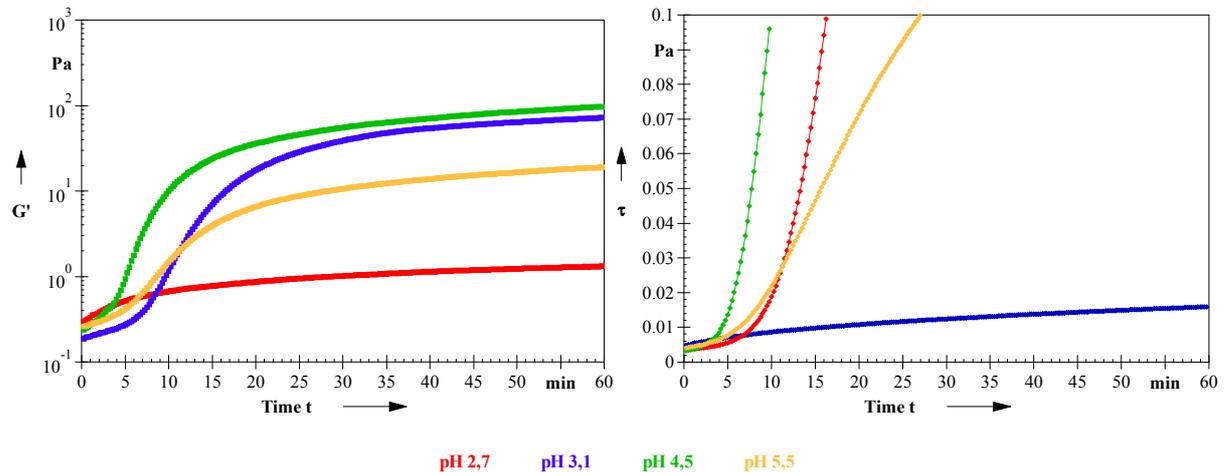


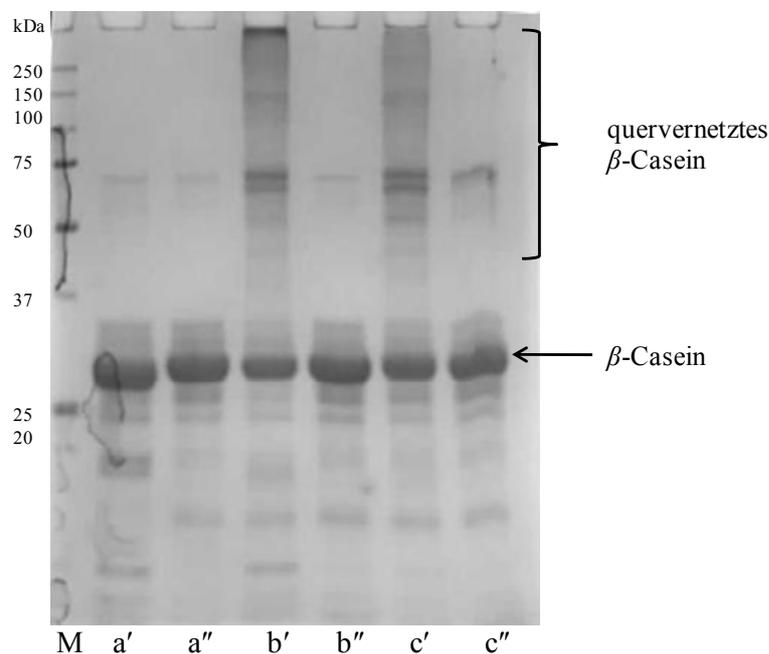
Abb. 10 Rheologische Parameter während der oxidativen Gelierung von 2 %iger Zuckerrübenpektinlösung mit Lcc1 (0,33 U/mL) in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 30 °C; links: Speichermodul  $G'$ ; rechts: Schubspannung  $\tau$

Neben der Quervernetzung von Phenolen und Phenolcarbonsäuren wie Ferulasäure sind einige Laccasen auch in der Lage *Crosslinks* zwischen Proteinen herzustellen (LANTTO *et al.*, 2005; MATTINEN *et al.*, 2006). Dabei werden die Seitenketten der Aminosäuren Tyrosin, Cystein oder Trytophan oxidiert (MATTINEN *et al.*, 2005; MATTINEN *et al.*, 2006). Die Eignung von Lcc1 zur oxidativen Quervernetzung von Proteinen wurde anhand von Standardproteinen untersucht. Bei der Behandlung von BSA und  $\beta$ -Lactoglobulin mit Lcc1 konnten im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Enzym keine Auswirkungen der Laccase auf die Proteingröße festgestellt werden. Die Zugabe von Ferulasäure als Mediator zu  $\beta$ -Lactoglobulin führte ebenfalls nicht zu einer Veränderung. Für Laccasen aus anderen Organismen wurde beschrieben, dass der Zusatz von Ferulasäure die Quervernetzung bei  $\beta$ -Lactoglobulin ermöglicht (STEFFENSEN *et al.*, 2008).

Auf Grund der globulären Struktur der beiden Proteine wird die Reaktion der Laccase behindert, da nur wenige der oxidierbaren Aminosäureseitenketten frei zugänglich sind. Bei  $\beta$ -Lactoglobulin ist nur eine von vier Tyrosinseitenketten dem Lösungsmittel zugewandt (TOWNEND *et al.*, 1969) und im BSA-Molekül sind nur 20% der Tyrosylreste (21 pro Molekül) zugänglich (HERSKOVITS *et al.*, 1968).

Daher wurde  $\beta$ -Casein als Modellprotein ohne ausgeprägte Tertiärstruktur gewählt, um die Eignung der Lcc1 zum *Crosslinking* von Proteinen nachzuweisen. Dabei zeigte sich, dass die Inkubationen von  $\beta$ -Caseinlösungen mit Lcc1 zu einer Abnahme der Monomerkomponenten führten und höhermolekulare Moleküle auftraten.

Die Untersuchungen des Einflusses des pH-Wertes auf die Oligomerisierung durch Lcc1 zeigten, dass bei einem pH-Wert von 6 der Effekt am stärksten ausgeprägt ist (Abb. 11). Bei pH-Werten kleiner als 5 konnten auf Grund der Unlöslichkeit von  $\beta$ -Casein keine Untersuchungen durchgeführt werden. Aber schon bei einem pH-Wert von 5 war im Vergleich zu den Inkubationen bei pH 6 und 7 kaum eine Veränderung zum Kontrollwert ohne Enzym zu erkennen. Dies war im Hinblick auf das pH-Optimum der Laccase Lcc1 gegenüber ABTS (pH 2) und phenolischen Substraten (pH 4 – 4,5) unerwartet und zeigt, dass die pH-Abhängigkeit der Laccaseaktivität vorrangig vom Substrat beeinflusst wird. Für die Oxidation von Phenolen durch Laccasen ist die Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe und somit eine Absenkung des Redoxpotentials ausschlaggebend (XU, 1997). Bei niedrigen pH-Werten liegt nur ein geringer Anteil der phenolischen OH-Gruppe der Tyrosinseitenkette deprotoniert vor, wodurch die Aktivität der Laccase begrenzt ist.



**Abb. 11** SDS-PAGE  $\beta$ -Casein-*Crosslinking* mit Lcc1 in Abhängigkeit vom pH-Wert; M: Marker; a: pH 5; b: pH 6; c: pH 7; ': mit Lcc1; ': Kontrolle ohne Lcc1; 0,5 mM  $\beta$ -Casein, 1,5 U Lcc1/mL, 16 h RT; Coomassie-Färbung; Lcc1 auf Grund geringer Proteinkonzentration nicht sichtbar

Die beobachtete Oligomerisierung des  $\beta$ -Caseins konnte durch eine Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge noch gesteigert werden. Die Verwendung einer zehnfach größeren Enzymmenge führte zu einem völligen Verschwinden der  $\beta$ -Caseinmonomeren und zur

Bildung von hochmolekularen Proteinaddukten, die auf Grund ihrer Größe nicht mehr in das SDS-Gel eindringen konnten (Abb. 12). Kleinere Proteinmoleküle waren nicht mehr als distinkte Banden zu erkennen.

Anhand von Modellsubstraten konnte gezeigt werden, dass die aus dem Basidiomyceten *Meripilius giganteus* isolierte Laccase Lcc1 zur oxidativen Quervernetzung eingesetzt werden kann. Die Laccase ist in der Lage neben phenolischen Komponenten von Polysacchariden auch Proteine quervernetzen. Für die Reaktion mit Proteinen kann auf den Einsatz eines Mediators verzichtet werden, sofern die Struktur der Proteine keine sterische Hinderung darstellt und entsprechende Aminosäureseitenketten vorhanden sind. Die Gesamtanzahl der quervernetzbaaren Aminosäureseitenketten kann dabei auch gering sein. Unter den 209 Aminosäurresten des  $\beta$ -Caseins sind nur vier Tyrosinreste (EIGEL *et al.*, 1984).

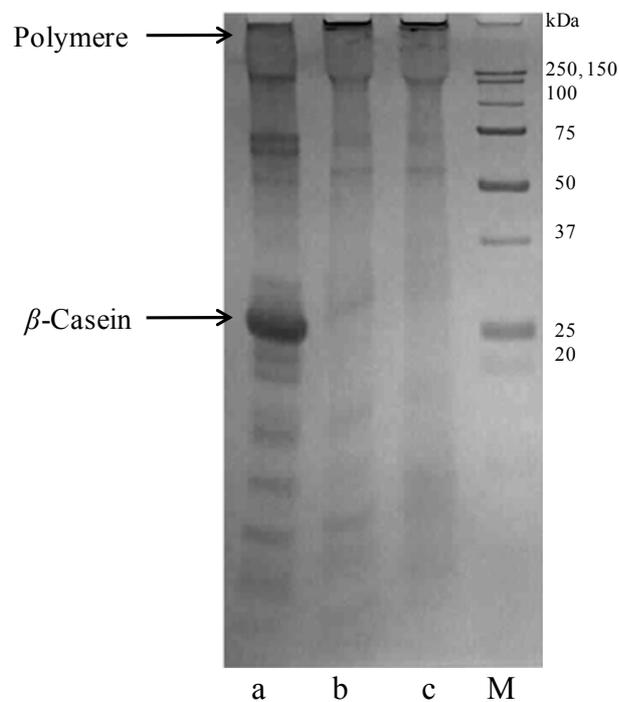


Abb. 12 SDS-PAGE  $\beta$ -Casein-Crosslinking mit Lcc1 in Abhängigkeit der Enzymmenge; M: Marker; a: 0,5 mM + 1,5 U Lcc1/mL; b: 0,5 mM + 7,5 U Lcc1/mL; c: 0,5 mM + 15 U Lcc1/mL; pH 6; 16 h RT; Coomassie-Färbung; Lcc1 auf Grund geringer Proteinkonzentration nicht sichtbar

#### 4.2 Stammscreening nach Aktivität zur Hydrolyse von Ferulasäureestern

Nachdem die Möglichkeit der oxidativen Quervernetzung und Gelierung unter Verwendung der Laccase Lcc1 gezeigt werden konnte, wurde nach möglichen Substraten gesucht. Für den Einsatz zur Gelierung gibt es nur wenige natürliche Hydrokolloide, die einen endogenen Gehalt an phenolischen Komponenten besitzen. Neben dem bereits beschriebenen

Zuckerrübenpektin besitzen auch Arabinoxylane veresterte Ferulasäureeinheiten. Einen hohen Anteil an Arabinoxylanen haben Getreide. Daher sind diese bereits seit geraumer Zeit Gegenstand von Forschungen, um durch Zusatz von Laccase die Eigenschaften von Weizenmehlteigen durch Quervernetzung zu verbessern (LABAT *et al.*, 2001; SELINHEIMO *et al.*, 2006; FLANDER *et al.*, 2008).

Ein neuartiger Ansatz zur oxidativen Gelierung mittels Oxidoreduktasen ist die künstliche Schaffung von anderen, neuen Substraten. Diese können durch Nachahmung der natürlichen phenolhaltigen Hydrokolloide generiert werden. Dazu müssten Polysaccharide ohne Phenolkomponenten so modifiziert werden, dass Verknüpfungsstellen für eine Behandlung mit Laccase eingefügt werden. Ferulasäure bietet sich dabei besonders an, da sie einerseits ein gutes Substrat für Laccasen darstellt und andererseits eine der Phenolkomponenten in natürlichen Hydrokolloiden ist. Eine gesteuerte Modifizierung hätte den Vorteil gegenüber natürlichen phenolhaltigen Hydrokolloiden, dass sich die Menge der Verknüpfungsstellen für eine oxidative Gelierung und damit die Festigkeit der Gele einstellen lassen würde. Bei natürlichen Hydrokolloiden unterliegt der Gehalt an Ferulasäure einer natürlichen Schwankungsbreite (PARKER *et al.*, 2005; BARBEROUSSE *et al.*, 2008) und ist zusätzlich noch abhängig vom Herstellungs- und Extraktionsprozess (Tab. 11).

**Tab. 11 Ferulasäuregehalte verschiedener Arabinoxylanpräparate<sup>4</sup> nach alkalischer Hydrolyse**

Arabinoxylanpräparat	Ferulasäuregehalt mg/100 g
I: 090511-2	0,6
II: 100419	2,4
III: 100503/10	5,0
IV: 100201	2,1

Mit dem Hintergrund die modifizierten Hydrokolloide später in Lebensmitteln einzusetzen, ist eine enzymatische Modifizierung einer rein chemischen Behandlung vorzuziehen. Hierbei kann auf den Einsatz umweltbedenklicher und nicht für Lebensmittel geeigneter Chemikalien verzichtet werden.

Durch eine enzymatische Umesterung bzw. reverser Hydrolyse könnte Ferulasäure kovalent

<sup>4</sup> Präparate wurden freundlicherweise von der „Jäckering Mühlen- u. Nahrungsmittelwerke GmbH“, Hamm zur Verfügung gestellt

an Polysaccharide gebunden werden. Für diesen Ansatz sind Esterasen nötig, die speziell die Reaktion an Ferulasäureesterbindungen katalysieren. Feruloylsterasen, EC 3.1.1.73, gehören zu den Hydrolasen und katalysieren die Hydrolyse von 4-Hydroxy-3-Methoxyzimtsäure-Gruppen von veresterten Zuckern; in natürlichen Substraten ist dies normalerweise Arabinose. Etwas schlechtere Substrate sind *p*-Nitrophenolacetat und Ferulasäuremethylester<sup>5</sup>.

Feruloylsterase sind für eine Vielzahl von Mikroorganismen wie Bakterien, Hefen und Pilze beschrieben worden (RUMBOLD *et al.*, 2004; FAZARY *et al.*, 2007). Hauptsächlich wurden Feruloylsterasen aus Ascomyceten, speziell aus Aspergillen, isoliert und charakterisiert (TOPAKAS *et al.*, 2007). Für vereinzelte Basidiomyceten, *Schizophyllum commune* (MACKENZIE *et al.*, 1988), *Bjerkandera adusta*, *Ganoderma applanatum*, *Phlebia rufa* und *Trametes versicolor* (DINIS *et al.*, 2009), wurde die enzymatische Aktivität Ferulasäureester zu spalten beschrieben. Aber bisher wurde keine von einem Basidiomyceten sekretierte Feruloylsterase isoliert. Einzig wurde kürzlich über eine Genomdatenbanksuche eine cDNA kodierte Esterase aus *Coprinopsis cinerea* identifiziert und heterolog exprimiert, die Ferulasäure aus Arabinoxylanen freisetzen kann (HASHIMOTO *et al.*, 2010). Aber keine der beschriebenen Esterasen ist frei verfügbar.

Daher wurde ein Screening mit verschiedenen Basidiomyceten auf Feruloylsteraseaktivität durchgeführt. Verwendet wurden hauptsächlich Weißfäulepilze, da diese in erster Linie Lignin abbauen. Lignin dient der Stabilität der pflanzlichen Zellwände und ist dazu mit Cellulosen und Hemicellulosen verknüpft. Die Verknüpfung erfolgt dabei über an Cellulose gebundene Ferulasäure. Zur Degradation dieser Strukturen ist eine Mischung aus verschiedensten Lignin-abbauenden Enzymen, wie Ligninperoxidase, Manganperoxidase und Laccasen (ELISASHVILI *et al.*, 2008) nötig. Zusätzlich wird die Sekretion von Cellulasen, Hemicellulasen und Esterasen zur Unterstützung des Abbaus der Biomasse als wichtig angesehen (TABKA *et al.*, 2006; PANAGIOTOU *et al.*, 2007). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Weißfäulepilze Enzyme mit der gesuchten Feruloylsteraseaktivität produzieren.

---

<sup>5</sup> <http://www.brenda-enzymes.org/>

Erste Versuche mit kultivierten Basidiomyceten zeigten, dass die teilweise ebenfalls exprimierten Laccasen erheblich den Aktivitätsassay mit Ferulasäuremethylester als Modellsubstrat für die gesuchten Esterasen beeinflussten. Durch hohe Laccaseaktivitäten kam es zur Oligomerisierung des Ferulasäuremethylesters und der potentiell freigesetzten Ferulasäure, so dass die spezifische Esteraseaktivität nicht mehr detektiert werden konnte.

Als strukturähnliches Substrat wurde daher zuerst Zimtsäuremethylester verwendet (Abb. 13), um eine erste Auswahl aus den getesteten Basidiomyceten zu treffen.

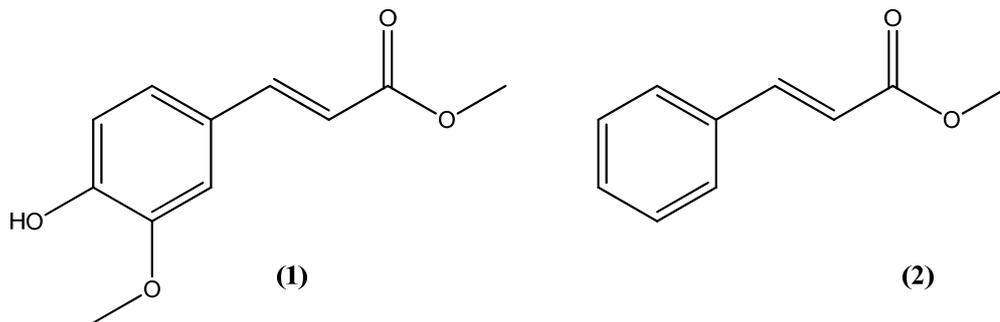


Abb. 13 Ferulasäuremethylester (1) und Zimtsäuremethylester (2)

Zimtsäure besitzt keine phenolische OH-Gruppe und stellt somit kein Substrat für Laccasen dar. Für verschiedene charakterisierte Feruloyl Esterasen wurde beschrieben, dass diese Esterasen auch die Hydrolyse von Zimtsäureestern katalysieren (TOPAKAS *et al.*, 2005a; VAFIADI *et al.*, 2006b).

Von den getesteten Organismen zeigten drei besonders gute Hydrolyseaktivitäten gegenüber Zimtsäuremethylester (Tab. 12) nach Aufschluss des Myzels von bewachsenen SNL-Agarplatten.

Die Organismen *Ganoderma applanatum*, *Grifola frondosa* und *Pleurotus floridanus* wurden ausgewählt und auf ihre Fähigkeit zur Hydrolyse von Ferulasäuremethylester getestet.

Tab. 12 Level der Zimtsäuremethylesterhydrolyse der untersuchten Basidiomyceten; Myzelaufschluss von SNL-Agarplatte und HPLC-Analyse des Hydrolyseansatzes; - nicht nachweisbar, + schwach, ++ gut, +++ sehr gut

Organismus	Kürzel	Hydrolyse von Zimtsäuremethylester
<i>Agaricus arvensis</i>	Aar	-
<i>Armillaria mellea</i>	Ame	+
<i>Bjerkandera adusta</i>	Bad	-
<i>Ganoderma applanatum</i>	Gap	+++
<i>Grifola frondosa</i>	Gfro	++
<i>Hericium erinaceum</i>	Her	+
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Pch	-
<i>Phellinus pini</i>	Ppi	+
<i>Phlebia radiata</i>	Pra	-
<i>Pholiota populnea</i>	Ppo	-
<i>Piptoporus betulinus</i>	Pbe	-
<i>Pleurotus floridanus</i>	Pfl	+++
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Pci	-
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Psan	-
<i>Trametes sp.</i>	Tsp	-
<i>Wolfiporia cocos</i>	Wco	-

### *Pleurotus floridanus*

*Pleurotus floridanus* zeigte dabei eine besonders hohe Laccaseaktivität. In der HPLC-Analyse konnten auf Grund der Oligomerisation Ferulasäure oder Ferulasäuremethylester nicht detektiert werden (Abb. 14), so dass auch keine Aussage über eine Feruloylesteraseaktivität getroffen werden konnte. Das Signal, welches bei circa einer Minute im Chromatogramm sichtbar ist, ist auf Matrixbestandteile aus dem Myzelaufschluss zurückzuführen und trat auch bei Kontrollen ohne Ferulasäuremethylesterzugabe auf.

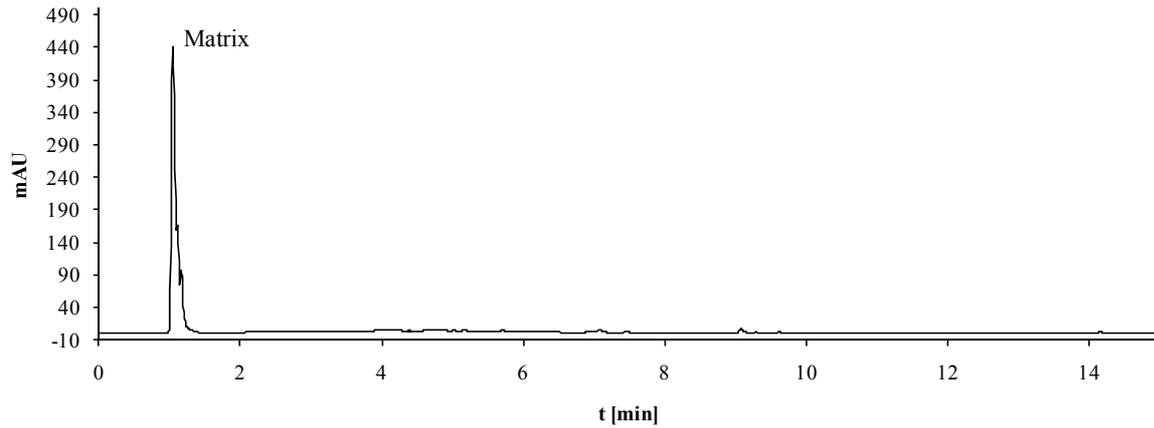


Abb. 14 HPLC Chromatogramm zur Hydrolyse von 1 mM FAM durch Pfl-Myzelaufschluss; 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7; bei 37 °C über Nacht inkubiert; UV bei 280 nm

### *Grifola frondosa*

*Grifola frondosa* zeichnete sich durch ein sehr langsames Kulturwachstum aus und besaß eine geringere Feruloylsteraseaktivität als *Ganoderma applanatum*.

### *Ganoderma applanatum*

Die *Ganoderma* Spezies zeigte ein gutes Wachstum und nur geringe Laccaseaktivität, so dass die Detektion der freigesetzten Ferulasäure möglich war (Abb. 15).

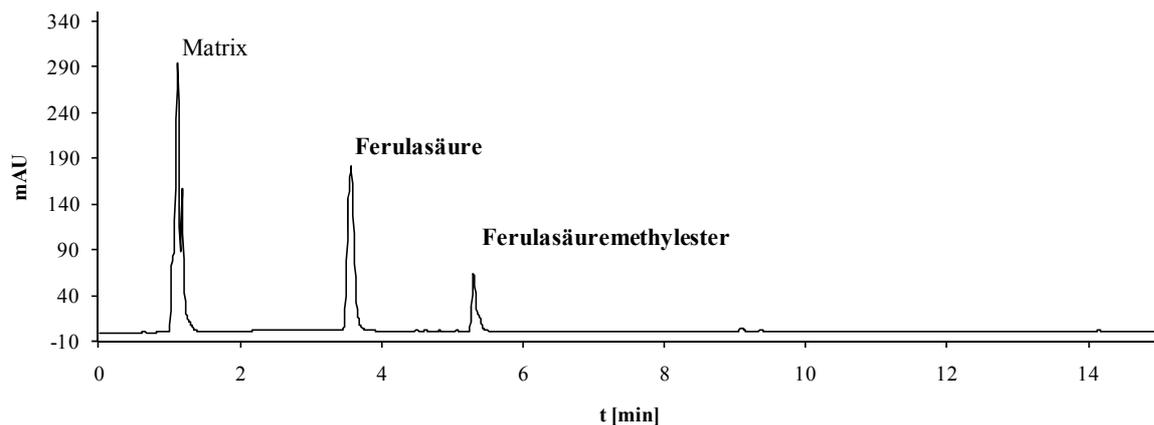


Abb. 15 HPLC Chromatogramm zur Hydrolyse von 1 mM FAM durch Gap-Myzelaufschluss; 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7; bei 37 °C über Nacht inkubiert; UV bei 280 nm

Da *Ganoderma applanatum* erst nach Induktion mit lignocellulosehaltigen Substraten oder mit Kupfer(II)-Ionen eine erhöhte Laccaseproduktion aufweist (SONGULASHVILI *et al.*, 2007; FONSECA *et al.*, 2010), wurde dieser Organismus ausgewählt, um die Ferulasäuresteraseaktivität zu isolieren.

Die Verwendung von synthetischen Substraten wie Methyl ester zur Identifizierung von Feruloyl esteraseaktivitäten stellt dabei einen Kompromiss zwischen Vereinfachung, Reproduzierbarkeit der Aktivitätstests und dem Nachweis der eigentlich gesuchten katalytischen Aktivität dar. Da die natürlichen Substrate von Ferulasäureesterasen an sich Polysaccharide sind, können sowohl falsch positive als auch falsch negative Ergebnisse erzielt werden, da Enzyme oft stark strukturspezifisch aktiv sind. So war eine Feruloyl esterase aus dem *Aspergillus niger* (Stamm NRRL 3) zwar gegenüber dem Methyl ester aktiv, aber eine Freisetzung von Ferulasäure aus Maiskleie fand im Gegensatz zur Esterase aus *Fusarium proliferatum* (Stamm NRRL 26517) nicht statt (SHIN *et al.*, 2006).

Ein anderer Ansatz zur Identifizierung der Aktivität wäre die Verwendung von Substraten, deren Struktur mehr mit denen der natürlichen Substrate übereinstimmt. Anstelle des Modellsubstrates Ferulasäuremethyl ester könnten naturidentische Substrate verwendet werden. Ideal wären ferulasäurehaltige Polysaccharide oder zumindest mit Ferulasäure veresterte Oligosaccharide. Diese sind aber nicht standardisiert und variierend in ihrem Ferulasäuregehalt, wenn sie durch Extraktion oder Isolierung aus natürlichen Rohstoffen gewonnen werden (vgl. Ferulasäuregehalte in Arabinoxylanen Tab. 11). Außerdem wäre mit den gleichen Problemen durch Laccaseaktivitäten zu rechnen. Besonders bei dem Einsatz von komplexen Substraten wie Stroh oder Kleie, die neben Ferulasäure auch Lignin enthalten, ist mit einer gesteigerten Laccaseproduktion durch die Basidiomyceten zu rechnen (FUKUSHIMA *et al.*, 1995; GORSKA *et al.*, 2004). Die Verwendung von chromogenen Substraten könnte dieses Problem umgehen, wenn als Analyt nicht die freigesetzte Ferulasäure, sondern die nach der Hydrolyse freie alkoholische, chromogene Komponente gewählt wird. *p*-Nitrophenol-Derivate wie *p*-Nitrophenyl-5-O-*trans*-feruloyl- $\alpha$ -L-arabinofuranosid können dafür eingesetzt werden (BIELY *et al.*, 2002). Durch Kombination mit einer Arabinofuranosidase ist das dann freigesetzte *p*-Nitrophenol photometrisch detektierbar. Diese Substrate sind aber ebenfalls nicht komplett strukturidentisch gegenüber den natürlichen Substraten und müssen durch mehrstufige Synthesen generiert werden (MASTIHUBOVÁ *et al.*, 2003; MARMUSE *et al.*, 2008). Außerdem sollte vorher festgestellt werden, ob nicht auch bei diesem Analyt eine Beeinträchtigung durch Laccasen auftritt.

### 4.3 Isolierung und Charakterisierung von ferulasäureesterspaltenden Enzym aus *Pleurotus sapidus*

#### 4.3.1 Feruloylsteraseaktivität aus *Pleurotus sapidus*

Neben dem aus dem Screening ausgewählten Organismus wurde *Pleurotus sapidus* auf seine Fähigkeit zur Spaltung von Ferulasäureestern untersucht. Die *Pleurotus* Spezies produzierte in submersen SNL-Kulturen extrazelluläre Esterasen, die durch Zugabe von Tween 80 induziert wurden. Mittels präparativer Schäumung war eine einfache Abtrennung und Anreicherung möglich (LINKE *et al.*, 2009). Dabei wurden mindestens drei, in ihren pI-Werten unterschiedliche Esterasen vom Pilz in das Kulturmedium sekretiert. Durch die präparative Schäumung wurden drei Esterasen in der Schaumfraktion angereichert. Dieses Esterasepräparat war in der Lage, neben Tween 80 auch Ferulasäuremethylester zu hydrolysieren (Abb. 16). Durch ebenfalls in dem Präparat enthaltene Laccasen kommt es zu störenden Nebenreaktionen (vgl. 4.2).

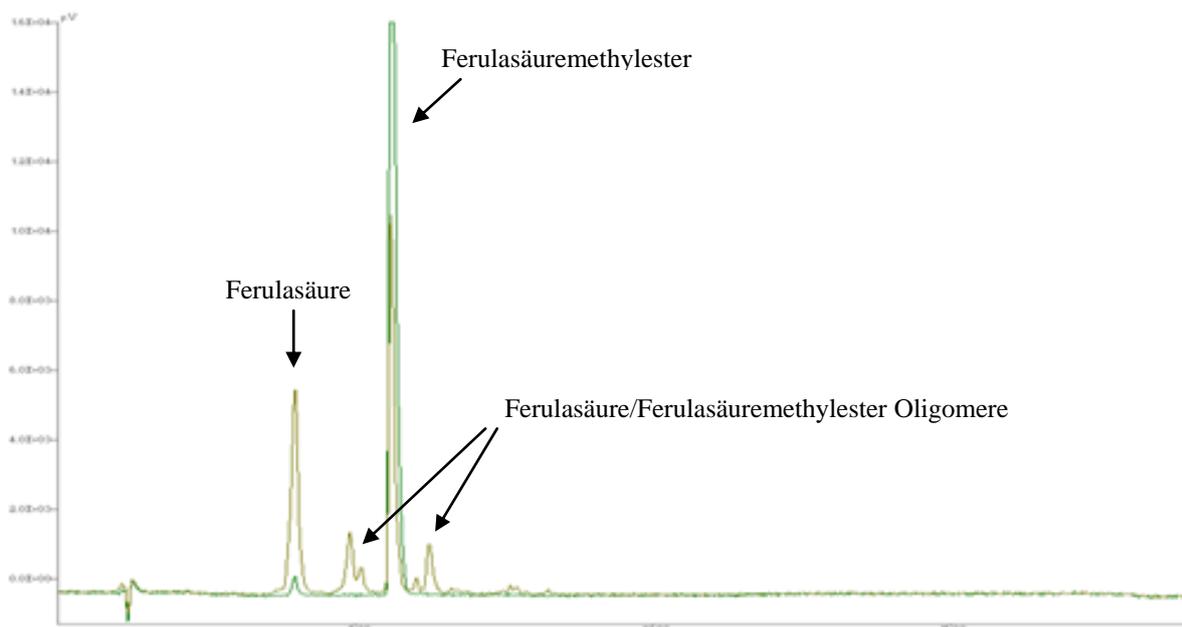


Abb. 16 HPLC Chromatogramm zur Hydrolyse von FAM durch Psa-Esterasepräparat; UV bei 325 nm, 1 mM FAM mit Psa-Schäumungspräparat inkubiert (—), 1 mM FAM Blindwert (—)

Dabei werden die Ferulasäure und deren Methylester durch die Monophenoloxidasen oxidiert und es kommt zur Bildung von Di- Tri- und Oligomeren (KUPRIYANOVICH *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2009). Im HPLC Chromatogramm ist dies an zusätzlichen Substanzpeaks mit größeren Retentionszeiten als die der Monomere zu erkennen (Abb. 16).

Diese ungewollte Nebenreaktion stellt bei einem Einsatz der Esterasepräparate zur Veresterung von Ferulasäure mit Sacchariden ein Hindernis dar, da dadurch das Substrat abgebaut wird und nicht mehr für die eigentliche Veresterung zur Verfügung steht. Auf Grund dessen war es nötig, Esterasepräparate ohne Laccaseaktivität herzustellen, bzw. bei denen der Laccasegehalt so gering war, dass sich die Aktivität durch Zugabe eines Inhibitors wie Natriumazid leicht inhibieren ließ (BOLLAG *et al.*, 1984).

#### **4.3.2 Isolierung der Esterase aus *Pleurotus sapidus***

Durch fraktionierte Schäumung konnten die Esterasen einzeln in den jeweiligen Schäumen angereichert werden. Dabei wurde die Esterase mit einem isoelektrischen Punkt von 5,6 als potentiell Ferulasäureester spaltend identifiziert. Jedoch erwies sich die präparative Schäumung nicht als geeignet, die Laccaseaktivität ausreichend von der Esterase abzutrennen. Weder unterschiedliche pH-Werte der Schäumungsvorlage (Psa-Kulturmedium) noch die Verwendung verschiedener Detergentien brachten den angestrebten Erfolg. Entweder wurde die Esterase im Schaum nicht angereichert oder dies erfolgte zusammen mit der Laccaseaktivität.

Als weitere Trennmethode wurde die Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) getestet. Bei dieser kam es zu einem starken Aktivitätsverlust der Esterase und die Laccase konnte ebenfalls nicht ausreichend gut abgetrennt werden.

##### **4.3.2.1 Ionenaustauschchromatographie (IEX)**

Nachdem die vorher genannten Methoden nicht erfolgreich waren, wurde versucht mittels Ionenaustauschchromatographie die Esterase zu isolieren. Verwendet wurde ein Kationenaustauschermaterial (SP Sepharose). Die Aufgabe des Enzyms erfolgte bei einem pH-Wert von 5,1 und somit unterhalb des pI-Wertes der Esterase (5,6), wodurch das Protein protoniert mit einer kationischen Gesamtladung vorlag und durch das Säulenmaterial gebunden wurde. Entgegen der herkömmlichen Elution des Zielproteins durch einen steigenden Salzgradienten, wurde die Esterase durch einen Wechsel des pH-Wertes auf 7 eluiert. Bei dem Scale-up der Vorversuche von einer 1 mL Säule auf eine 25 mL Säule zeigte sich, dass die Abtrennung der Laccase dabei nicht mehr ausreichend gut funktionierte. Daher wurden die esteraseaktiven Fraktionen der ersten IEX-Trennung refraktioniert, konzentriert und nochmals einer zweiten Trennung mit der 1 mL Säule unterzogen. Es wurde ein Esterasepräparat erhalten, welches nicht vollständig von Laccaseaktivität befreit war, aber durch Zugabe von geringen Mengen an Natriumazid (bis 1,33 mM) inhibiert werden konnte.

### 4.3.3 Charakterisierung der Esteraseaktivität

#### 4.3.3.1 pH-Abhängigkeit der Ferulasäuremethylesterhydrolyse

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden unterschiedliche Puffersysteme verwendet, um einen möglichst breiten pH-Bereich abzudecken. Die Konzentration des jeweiligen Puffers betrug 100 mM. Das Optimum der Hydrolyse des Ferulasäuremethylesters lag bei pH 6 (Abb. 17). Die Esterase war auch im leicht alkalischen bis pH 7,5 noch aktiv, wenn auch in sehr geringerem Maße (7 % Restaktivität). pH-Werte unterhalb des Optimums führten nicht zu einer so starken Aktivitätsverminderung.

Die pH-Optima der bisher charakterisierten Ferulylesterasen aus Ascomyceten lagen größtenteils ebenfalls in diesem pH-Bereich (BENOIT *et al.*, 2008). So besaß die Ferulylesterase aus *Aspergillus awamori* ein pH-Optimum von 6 mit ähnlich starken Aktivitätsverlusten bei höheren oder niedrigeren pH-Werten (FAZARY *et al.*, 2008). Nur für einzelne Ferulylesterasen wurden pH-Optima von 8 beschrieben, so für die bakterielle Esterase aus *Clostridium stercorarium* (DONAGHY *et al.*, 2000).

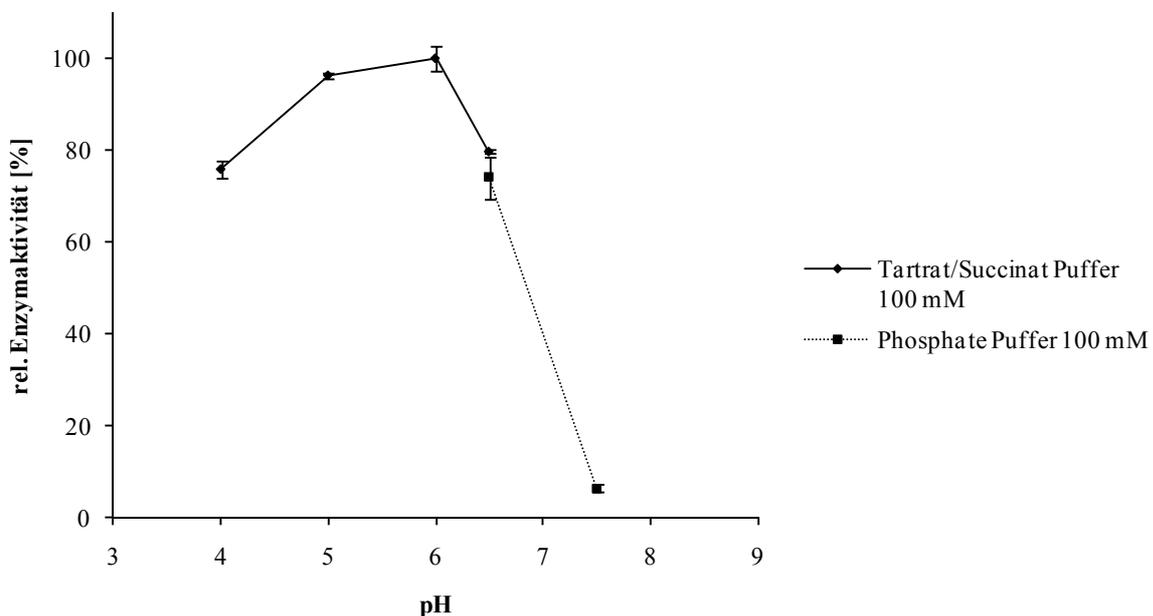


Abb. 17 Relative Enzymaktivitäten der Hydrolyse von FAM durch Psa-Esterase in Abhängigkeit vom pH-Wert; Angabe der relativen Enzymaktivität aus HPLC-Analyse; FAM-Konzentration 1,33 mM; Inkubation bei 37 °C, 6 h

#### 4.3.3.2 Temperatur-Abhängigkeit der Ferulasäuremethylesterhydrolyse

Bei Verwendung des Tartrat/Succinat Puffers lag das Temperaturoptimum der Ferulasäuremethylesterspaltung bei 50 °C (Abb. 18). Bei Temperaturen ab 60 °C wurde das Enzym nahezu vollständig inaktiviert.

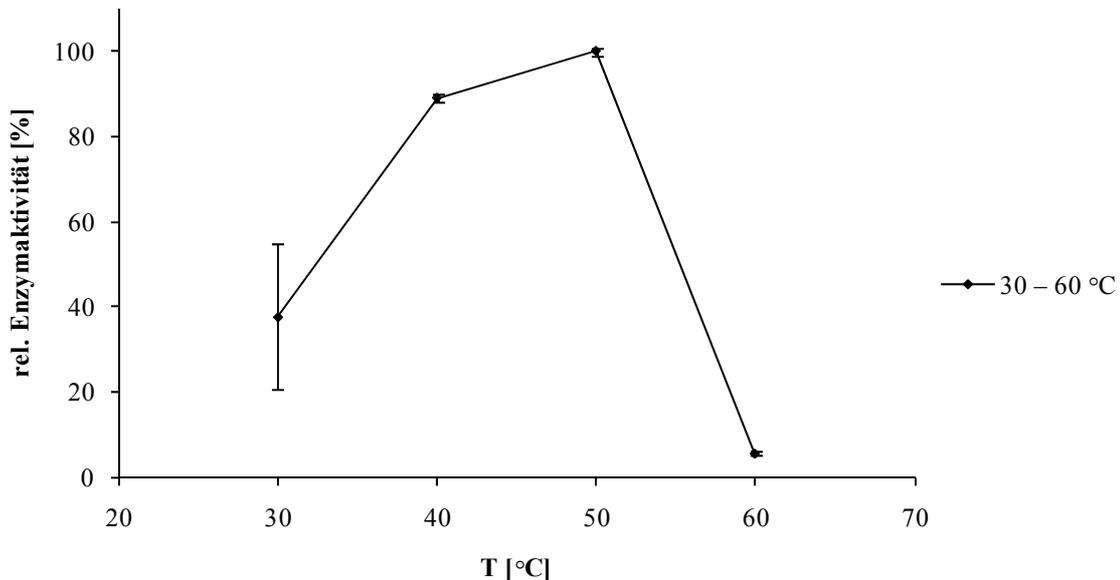


Abb. 18 Relative Enzymaktivität der Hydrolyse von FAM durch Psa-Esterase in Abhängigkeit von der Temperatur, Angabe der relativen Enzymaktivität aus HPLC-Analyse; FAM-Konzentration 0,66 mM; Inkubation in 100 mM Tartrat/Succinat-Puffer pH 6, 6 h

Untersuchungen zur Stabilität der Esterase zeigten, dass diese schon bei Temperaturen ab 40 °C nicht für längere Zeit stabil blieb (Abb. 19). Das Enzympräparat wurde dazu 1 Stunde ohne Substrat bei gegebener Temperatur inkubiert und anschließend die Restaktivität mittels Hydrolyse des Ferulasäureesters getestet.

Der Einsatz der *Pleurotus sapidus* Esterase sollte nicht am Temperaturoptimum erfolgen, da bei längeren Inkubationszeiten nur noch ein Bruchteil der ursprünglichen Enzymaktivität zur Verfügung steht. Nach einstündiger Inkubation bei 50 °C konnte noch eine Restaktivität von 5 % und bei Inkubation bei 40 °C von 48 % gemessen werden. Daher wurden spätere Versuche bei Temperaturen unterhalb 40 °C durchgeführt.

Mit einem Temperaturoptimum von 50 °C lag die Esterase aus *Pleurotus sapidus* im Bereich von bereits beschriebenen Feruloyl-esterasen aus Pilzen von 40 – 60 °C (BENOIT *et al.*, 2008). Esterasen mit höheren Temperaturoptima von 65 °C wurden unter anderem für das Bakterium *Clostridium stercorarium* (DONAGHY *et al.*, 2000) und den Ascomyceten *Fusarium oxysporum* (MOUKOULI *et al.*, 2008) beschrieben. Auch wenn thermophilere Esterasen eine deutlich bessere Temperaturstabilität aufwiesen, z. B. bis 70 °C für sechs Stunden bei

*Clostridium thermocellum* (BLUM *et al.*, 2000), sind Feruloylsterasen bekannt, die ebenso wie die *Pleurotus* Esterase weniger temperaturtolerant waren. Eine Esterase aus dem Ascomyceten *Streptomyces viridosporus* verlor die komplette Aktivität bei einer Inkubation von 1 h bei 50 °C (DONNELLY *et al.*, 1988) und eine aus *Aspergillus nidulans* isolierte Feruloylsterase zeigte nach 30 minütiger Inkubation nur noch ca. 18 % Restaktivität (SHIN *et al.*, 2007).

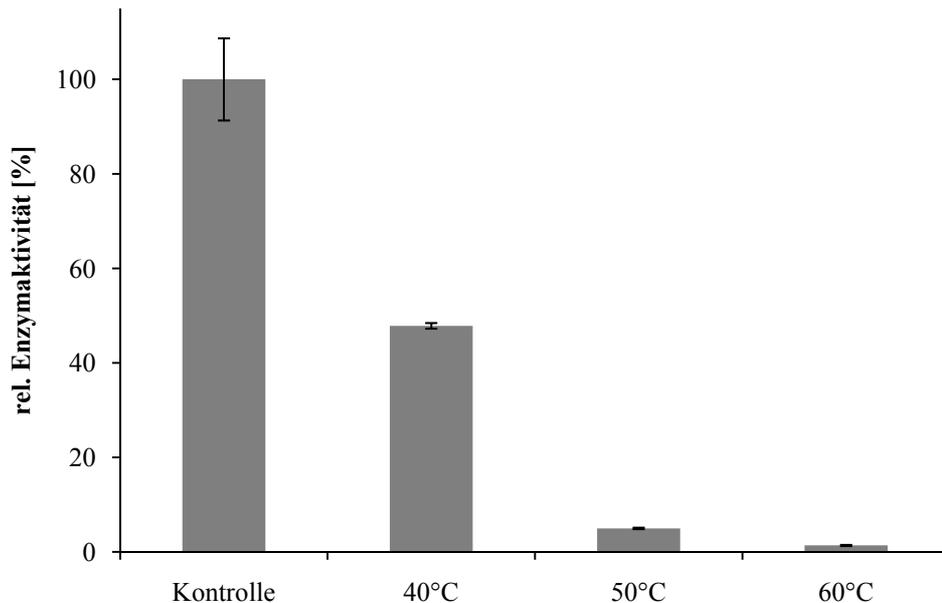


Abb. 19 Temperaturstabilität der Psa-Esterase, Angabe der relativen Enzymaktivität aus HPLC-Analyse nach 1 h Inkubation zum unbehandeltem Enzym bei pH 6 in 100 mM Tartrat/Succinat-Puffer

#### 4.3.3.3 Bestimmung enzymkinetischer Parameter der Ferulasäuremethylesterhydrolyse

Zur Betrachtung der Kinetik der Hydrolyse von Ferulasäuremethylester wurde zuerst der Verlauf der Reaktion über die Zeit untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Hydrolyse des Methylesters bis zu einer Zeit von 8 Stunden linear verläuft (Abb. 20).

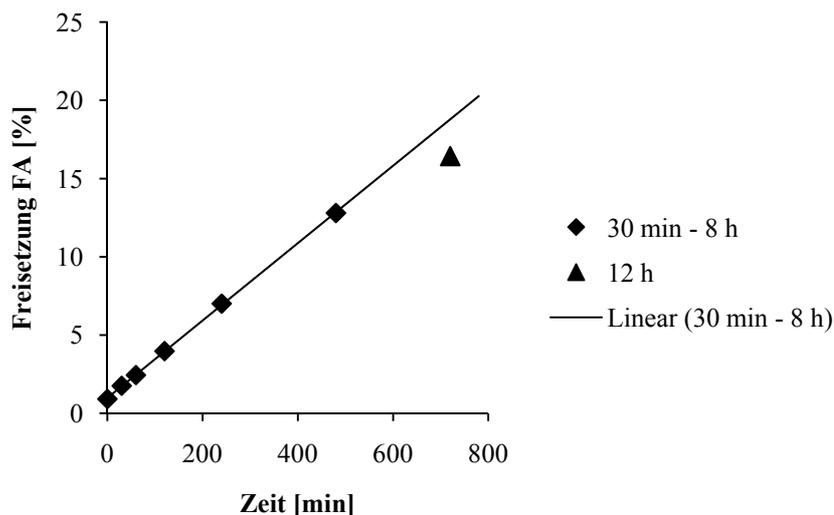


Abb. 20 Kinetik der Hydrolyse von FAM durch Psa-Esterase; Angabe des Umsatzes in % FA-Anteil an Gesamtfläche im HPLC-Chromatogramm; Inkubation bei pH 6 und 37 °C

Anschließend wurde die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes durchgeführt. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an Ferulasäuremethylester in Puffer pH 6 verwendet und als Inkubationsdauer 4 h gewählt. Durch die schlechte Wasserlöslichkeit des Esters war die maximal verwendbare Konzentration an FAM begrenzt und daher ein Erreichen der Enzym-Substrat-Komplex-Sättigungskonzentration nicht möglich. Auf Grund dessen erfolgte eine Berechnung des  $K_m$ -Wertes nach Linearisierungsverfahren. Mit der Lineweaver-Burk-Linearisierung wurde ein  $K_m$ -Wert von 1,95 mM Ferulasäuremethylester bei einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit von  $v_{\max} = 1,77$  U/L berechnet.

Auf eine Erhöhung der Ferulasäuremethylesterkonzentration durch eine Erhöhung des Anteils an organischen Lösungsmittel DMSO wurde bewusst verzichtet (maximal 3 %), um eine Verfälschung der gemessenen Aktivität auszuschließen. In geringen Konzentrationen kann DMSO unter Umständen die Aktivität von Ferulasäureesterasen in Abhängigkeit der jeweiligen Esterase zwar erhöhen, in höheren Konzentrationen tritt aber im Allgemeinen eine Inhibierung ein (FAULDS *et al.*, 2011).

Der ermittelte  $K_m$ -Wert von circa 2 mM lag im Vergleich mit bisher beschriebenen Feruloyl-esterasen in einem Bereich mit etwas geringeren Substrataffinitätswerten gegenüber Ferulasäuremethylester. Für den Ascomyceten *Talaromyces stipitatus* und das Bakterium *Clostridium stercorarium* wurden höhere Substrataffinitäten mit  $K_m$ -Werten von 0,04 mM beschrieben (DONAGHY *et al.*, 2000; VAFIADI *et al.*, 2006b). Dennoch sind auch Esterasen mit ähnlichen oder größeren  $K_m$ -Werten, 2,6 mM für *Penicillium expansum* (DONAGHY *et al.*, 1997) oder 2,1 mM für *Aspergillus niger* (FAULDS *et al.*, 1994), als Feruloyl-esterasen deklariert.

#### 4.3.3.4 Hydrolyse weiterer Ferulasäureester und anderer Substrate

Neben der Fähigkeit zur Hydrolyse von Ferulasäuremethylester wurde untersucht, ob die Esterase andere, natürliche Ferulasäureester hydrolysiert. Zum Einsatz kamen dabei aus Maiskleie isolierte Ferulasäurarabinosylester (ALLERDINGS *et al.*, 2006).

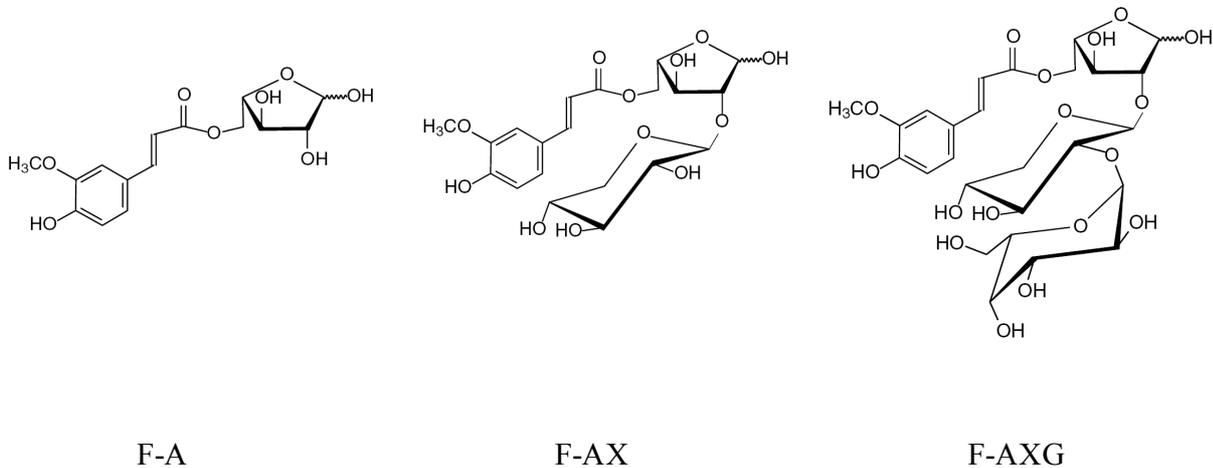


Abb. 21 Feruloylierte Saccharide; F-A: 5-O-*trans*-Feruloyl-L-arabinofuranose, F-AX:  $\beta$ -D-Xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose, F-AXG:  $\alpha$ -L-Galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose, isoliert von ALLERDINGS *et al.* (2006)

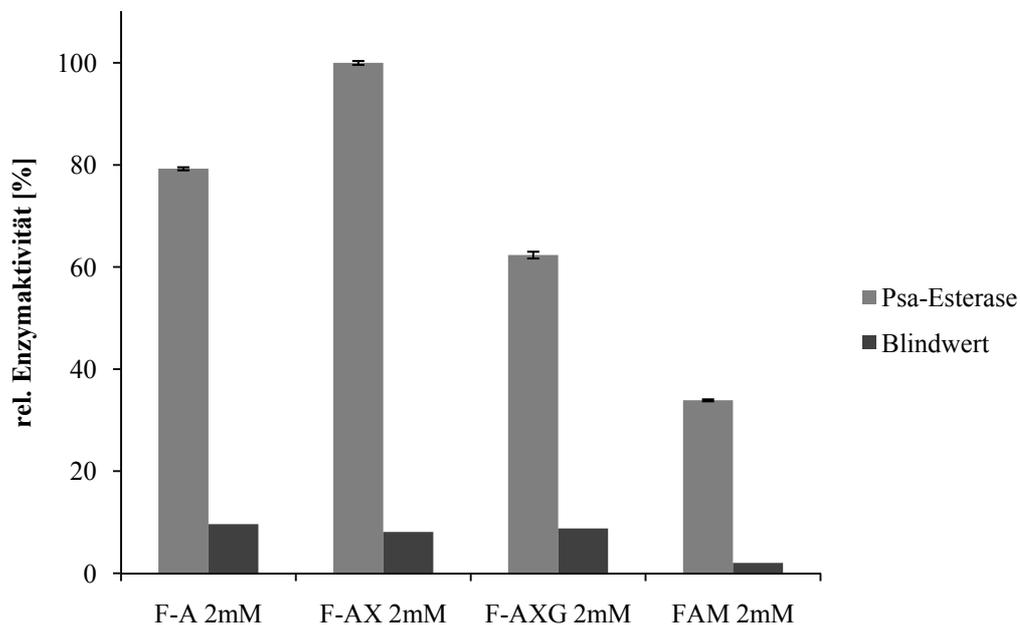


Abb. 22 Hydrolyse unterschiedlicher Ferulasäureester, Angabe der relativen Enzymaktivität gegenüber 2 mM Substratlösungen in 100 mM Tartrat/Succinat-Puffer pH 6 bei 37 °C, 8 h

Die Esterase hydrolysierte die Arabinosylester der Ferulasäure (Abb. 21) bei gleicher Substratkonzentration schneller als den Methylester (Abb. 22). Außerdem war das Enzym in der Lage die synthetische Substrate *p*-Nitrophenylbutanoat und Tween 80 zu hydrolysieren. Tween 80, auch Polysorbat 80 oder Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonooleat, besteht aus

Sorbitol, 20 daran als Polymere gebundenen Ethylenoxiden und veresterter Ölsäure (Abb. 23).

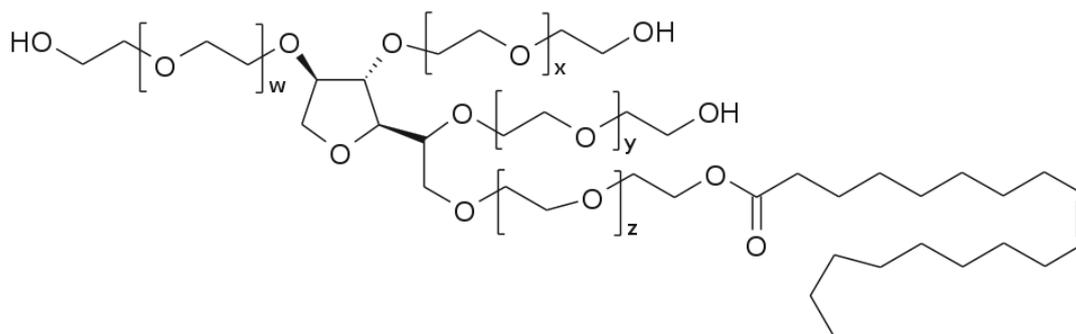


Abb. 23 Struktur von Tween 80,  $w + x + y + z = 20$

Die Hydrolyse der langkettigen Fettsäure aus Tween 80 spricht dafür, dass es sich bei dem Enzym aus *Pleurotus sapidus* eher um eine Lipase handelt. Eine definitive Aussage dazu kann auf Grundlage der vorliegenden Daten aber nicht getroffen werden. Lipasen und Esterasen gehören zur selben Enzymklasse der Hydrolasen und besitzen viele Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Struktur- und biochemischen Eigenschaften (BORNSCHEUER *et al.*, 2006). Lipasen hydrolysieren bevorzugt langkettige Fettsäureester, Esterasen dagegen vorrangig kurzkettige Ester. Lipasen sind dabei Grenzflächen aktiv und katalysieren so die Hydrolyse von wasserunlöslichen Substraten. Das hier untersuchte Enzym war aber auch in rein wässrigen Lösungen ohne organische Phase aktiv. Weiterhin konnte im Gegensatz zur Tween 80 Spaltung nahezu keine Hydrolyse des *p*-Nitrophenylpalmitates festgestellt werden. Bei der Zuordnung könnte die Proteinstruktur des Enzyms helfen. Die beiden Enzymkategorien besitzen zwar die gleiche katalytische Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure (oder Glutaminsäure), aber die meisten Lipasen weisen in ihrer 3D-Struktur einen Deckel (lid) auf, der das katalytische Zentrum bei Abwesenheit einer Grenzfläche verdeckt.

#### 4.3.3.5 Erhöhung der Enzymkonzentration

Bei dem Versuch, aufgereinigtes Enzympräparat mittels Centricons (MWCO 10.000 Dalton) zu konzentrieren, kam es zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Dadurch war ein Einsatz von hohen Enzymkonzentrationen in kleinen Volumina nicht möglich. Lyophilisierung als Alternative führte zu hohen Verlustraten von 56 %. Die Ursache des Aktivitätsverlusts bei der Verwendung der Centricons kann in der Adsorption des Proteins an der Membran liegen. So wurde das Enzym auch durch Cellulose-Material adsorbiert. Dies wurde bei der Durchführung von isoelektrischen Fokussierungen mit anschließendem Tween 80 Overlay-Aktivitätsassay beobachtet. Bei Verwendung von Cellulose-Applikationsstreifen wurde im Gegensatz zur Verwendung von aufgelegten Silikonstreifen keine Aktivität mehr detektiert.

Bei einer Ferulasäureesterase aus *Penicillium funiculosum* wurde bereits beschrieben, dass Esterasen stark durch Cellulose gebunden werden können; nur 9 % der eingesetzten Aktivität verblieben in Lösung (KROON *et al.*, 2000).

#### 4.4 Isolierung und Charakterisierung des ferulasäureesterspaltenden Enzyms aus *Ganoderma applanatum*

##### 4.4.1 Untersuchung der Kultivierungsparameter

Als Flüssigkulturmedium wurde anfänglich die Standardnährlösung (SNL) verwendet. Bessere Ergebnisse bezüglich der Feruloylsteraseaktivität erzielte aber die Verwendung des sogenannten *Ganoderma* Complete Medium (GCM) (CHOUITER *et al.*, 2008) (Abb. 24). Daher wurde für folgende Kultivierungen des *Ganoderma applanatum* GCM als Nährmedium verwendet.

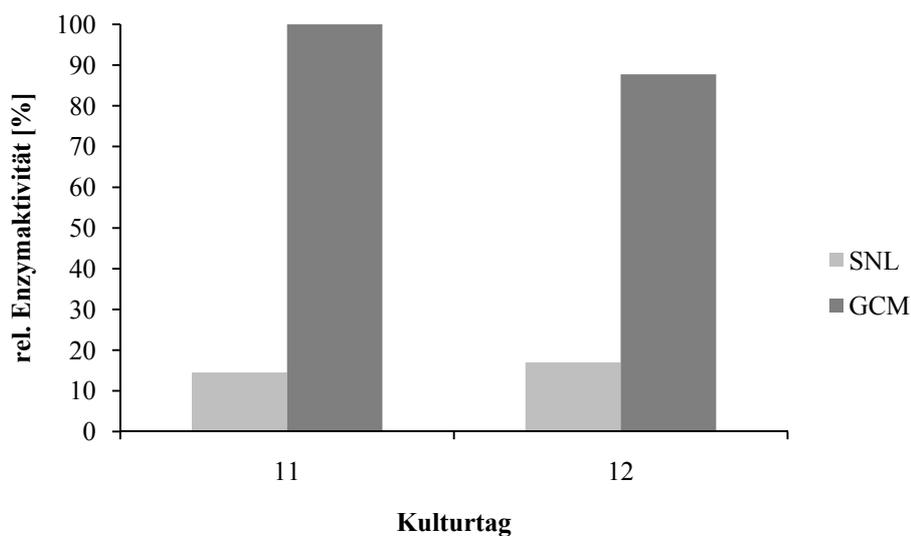
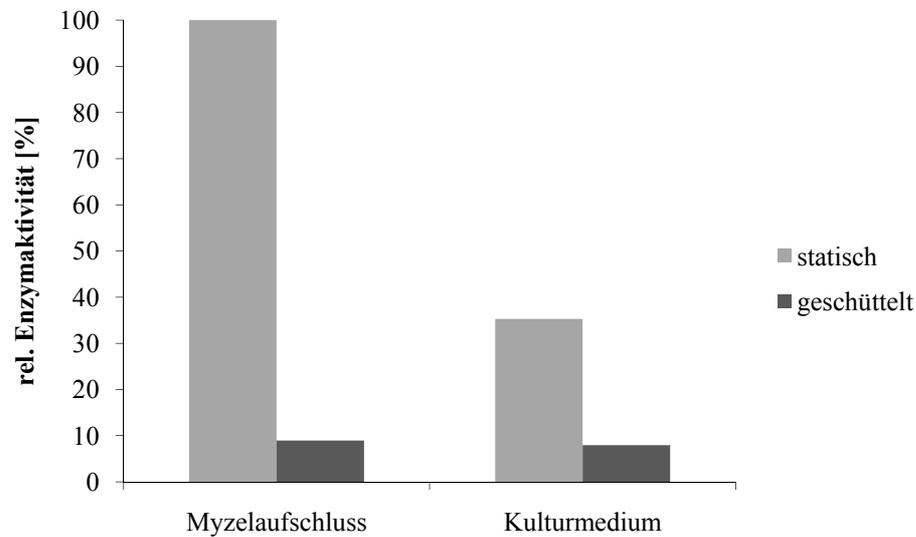


Abb. 24 Feruloylsteraseaktivität in Abhängigkeit vom Medium, Angabe der relativen Enzymaktivität aus HPLC-Analyse; 1 Teil Kulturüberstand + 3 Teile FAM-Lösung, Endkonzentration: 1 mM FAM-Lösung in 100 mM Tris-Puffer pH 7, Inkubation: 40 °C über Nacht

Der Pilz konnte sowohl in einer geschüttelten als auch in einer statischen Submers-Kultur geführt werden. Bei beiden Arten der Kultivierung fand ausreichend Myzelwachstum statt. Untersuchungen zur Produktion von Feruloylsterase zeigten, dass eine statische Kultivierung besser geeignet war. Obwohl bei geschüttelten Kulturen keine Wachstumshemmung oder veränderte Morphologie zu erkennen war, zeigte der Kulturüberstand aus statischen Kulturen eine deutlich höhere Esteraseaktivität gegenüber Ferulasäuremethylester (Abb. 25). Daher wurde bei folgenden Kultivierungen die statische Inkubation angewendet. Dabei bildet sich

nach ausreichender Dauer eine geschlossene Myzelschicht auf der Oberfläche der Flüssigkultur aus.



**Abb. 25** Feruloyl-esteraseaktivität in Abhängigkeit der Submerskultivierungsart, Angabe der relativen Aktivität aus HPLC-Analyse; 1 Teil Enzymlösung + 3 Teile FAM-Lösung, Endkonzentration: 1 mM FAM-Lösung pH 7, Inkubation: 40 °C über Nacht

Dass Scherbelastung während der Kultivierung einen Einfluss auf das Wachstum und die Enzymaktivitäten hat, ist nicht ungewöhnlich und wurde auch bei anderen Basidiomyceten beschrieben. Bei der durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* sekretierten Ligninase kam es durch hohe Scherraten zum Verlust der Enzymaktivität ohne Beeinflussung der Physiologie (VENKATADRI *et al.*, 1990). Ebenso zeigte die Produktion einer Manganperoxidase desselben Organismus eine starke Abhängigkeit von der Bewegungsrate (JIMÉNEZ-TOBON *et al.*, 1997) und wurde bei Kultivierung in pneumatischen Bioreaktoren ohne Scherbelastung stark gesteigert (BONNARME *et al.*, 1993). *Cyathus stercoreus* zeigte bei statischer Kultivierung eine bis zu zehnfach höhere Laccaseproduktion als in geschüttelter Kultur (SETHURAMAN *et al.*, 1999). Statische Kultivierungen entsprechen eher den natürlichen Wachstumsbedingungen der Basidiomyceten, wobei der Sauerstoffgehalt des Kulturmediums als kritischer Faktor betrachtet werden sollte. Daher könnte eine aktive Belüftung ohne Scherung zu einer Steigerung der Wachstumsrate und Enzymproduktion führen. Der zum hier untersuchten Pilz artverwandte *Ganoderma lucidum* zeigte bei der Kultivierung im Bioreaktor mit kontrollierter Sauerstoffrate ein schnelleres Myzelwachstum als ohne (FAZENDA *et al.*, 2010).

#### 4.4.2 Isolierung der Esterase aus *Ganoderma applanatum*

##### 4.4.2.1 Konzentrierung

Mittels Aufschluss des Myzels durch mechanische Zerkleinerung in wässrigem Puffer konnte die Ferulylesteraseaktivität isoliert werden. Diese Methode erwies sich aber für eine weitere und vor allem im größeren Maßstab angesetzte Aufreinigung als nicht besonders praktikabel. Durch die Zerstörung des Myzels und Bildung vielzähliger Myzel- und Zellbruchstücke war eine Konzentrierung der Aufschlusslösung kaum möglich. Bei Verwendung von Centricon-Einheiten kam es bereits nach kurzer Zeit zur Blockierung der Filtrationsmembran. Auch eine Zentrifugation über einen längeren Zeitraum bei hohen Umdrehungszahlen konnte keine Abhilfe leisten, da nicht alle Partikel pelletiert und entfernt wurden. Außerdem behinderten lösliche Polysaccharide auf Grund ihrer hohen Molmasse die Filtration. Dazu gehören eine Vielzahl von heterologen Exopolysacchariden und auch Zellwandkomponenten wie  $\beta$ -Glucane (WESSELS *et al.*, 1972; SEVIOUR *et al.*, 1992).

Daher wurde untersucht, ob ein Aufschluss des Myzels unbedingt nötig ist. Es zeigte sich, dass Esteraseaktivität ebenfalls im Kulturmedium vorhanden war, wenn auch im Vergleich zum Myzelaufschluss in geringerem Maße (Abb. 25). Daher handelte es sich nicht um ein ausschließlich intrazelluläres Enzym. Vielmehr könnte das Enzym mit den Exopolysacchariden assoziiert sein, was die höhere Aktivität im Myzelaufschluss erklären würde. Für andere Pilzenzyme wie  $\beta$ -Glucosidase wurde eine Immobilisierung in der die Hyphen umgebenden extrazellulären Polysaccharidschicht beschrieben (EVANS *et al.*, 1991). Auch bei einer Lignin-Peroxidase aus *Phanerochaete chrysosporium* wurde diese Assoziation nachgewiesen (RUEL *et al.*, 1991). Durch Einsatz von Cellulasen und Glucosidasen könnte die Ausbeute an isolierbarem Enzym erhöht werden, wenn dadurch die Polysaccharide abgebaut werden und somit mehr gebundene Esterase freigesetzt wird.

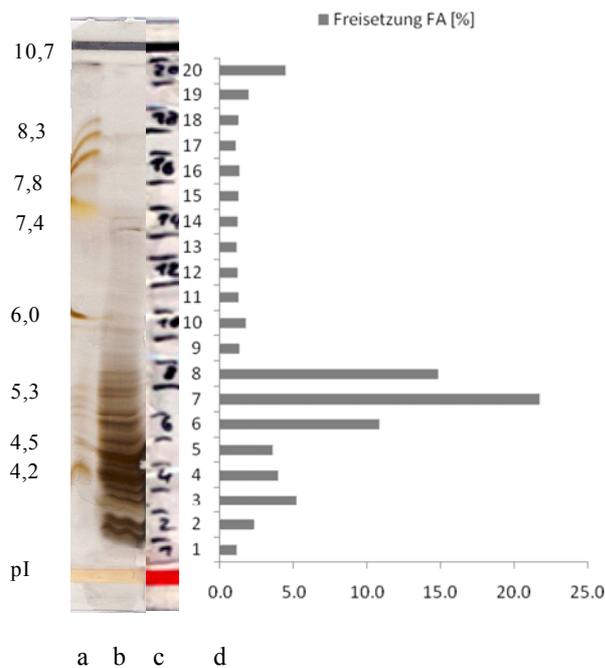
Der Kulturüberstand ließ sich im Gegensatz zum Myzelaufschluss mittels Centricons mit einem MWCO von 10.000 Dalton aufkonzentrieren, sofern vorher restliches Myzel durch Zentrifugation abgetrennt wurde. So konnte der Kulturüberstand um den Faktor 100 konzentriert werden. Am Ende der Konzentrierung wurde zusätzlich mit Wasser gewaschen, um die Ionenstärke zu minimieren, die nachfolgende Aufreinigungsschritte beeinflusst hätte.

##### 4.4.2.2 Ionenaustauschchromatographie (IEX)

Zur Abtrennung der Ferulylesterase aus dem Kulturüberstand wurde die Ionenaustauschchromatographie (IEX) verwendet. Zuvor wurde der isoelektrische Punkt mittels analytischer

Isoelektrischer Fokussierung (IEF) bestimmt, um Aussagen über die Gesamtladung der Esterase bei unterschiedlichen pH-Werten treffen zu können.

Der konzentrierte Kulturüberstand enthielt eine Vielzahl an Proteinen. Durch Zerteilung des IEF-Gels in kleine Stücke von 0,5 cm und Analyse der Esteraseaktivität mittels HPLC konnte ein isoelektrischer Punkt von ca. 5 bestimmt werden (Abb. 26).

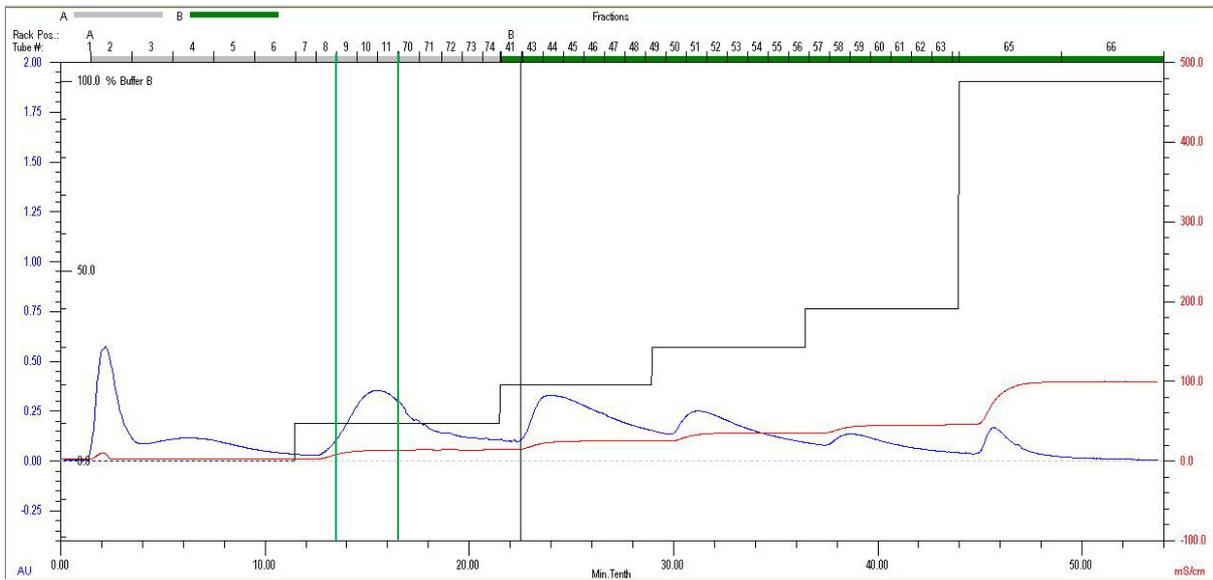


**Abb. 26** IEF-Gel des Gap Kulturüberstandes mit Aktivitätsanalyse; a-b IEF-Gel nach Silberfärbung: a: Marker, b: Esteraselösung; c Einteilung des IEF-Gel zur Aktivitätsanalyse; d Feruloylsteraseaktivität der Gelstücke, Angabe des Umsatzes in % FA-Anteil an Gesamtfläche im HPLC-Chromatogramm, Inkubation der Gelstücke in 100  $\mu$ L 1,33 mM FAM-Lösung in Tartrat/Succinat-Puffer pH 6 bei 40 °C, über Nacht

Mit diesem pI besitzt das Enzym bei einem pH-Wert von 7 eine negative Gesamtladung. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um mittels Anionenaustauscher die Esterase aus dem Kulturüberstand abzutrennen. Auf Grund der negativen Ladung wurde das Enzym durch das Austauschermaterial zurück gehalten und konnte mittels ansteigendem Salzgradienten von der Säule wieder eluiert werden.

Das Konzentrat des Kulturüberstandes wurde vor Verwendung zur IEX filtriert (0,45  $\mu$ m Spritzenfilter PTFE) und mit Laufpuffer 1:10 verdünnt. Der pH-Wert wurde mit möglichst wenig 1 M NaOH auf 6,8 – 7,0 eingestellt, da eine zu große Konzentration an gelösten Ionen die Retention des Zielproteins behinderte und ein Teil der Aktivität bereits im Durchbruch von der Säule eluierte. Als IEX-Material kamen Q-Sepharose und DEAE Sepharose Fast Flow (beide GE Healthcare) zum Einsatz. Beide waren geeignet, bei den gegebenen Bedingungen eine Abtrennung der Esterase zu erzielen. Die Esterase konnte bereits mit einem

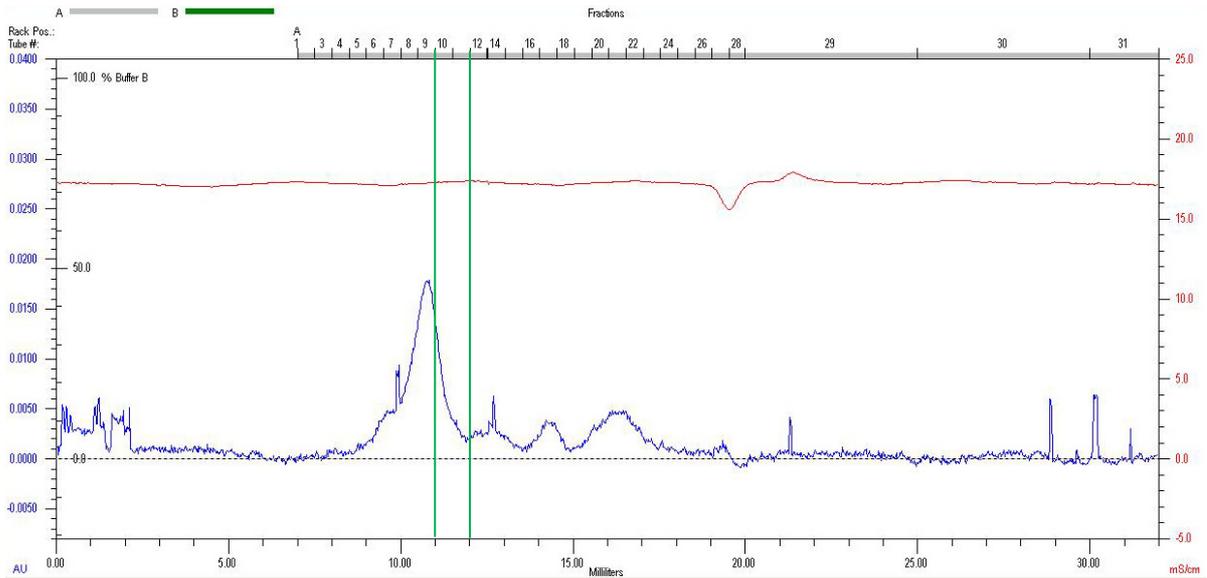
Natriumchlorid-Gehalt von 50 mM im Elutionspuffer bei unverändertem pH Wert eluiert werden (Abb. 27).



**Abb. 27** IEX des Gap Kulturüberstandkonzentrates mit Q Sepharose; UV-Absorption bei 280 nm (—), Leitfähigkeit (—), 1 M NaCl/Tris Puffer (—), Fraktionen mit Hauptferuloylaktivität (—); Applikation: 1 mL Probe (1:10); Fluss: 1 mL/min

#### 4.4.2.3 Size-Exclusion-Chromatography (SEC)

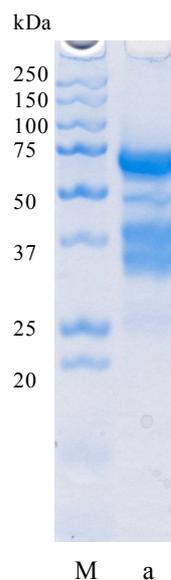
Die Ferulylesteraseaktivität enthaltenen Fraktionen der IEX wurden vereinigt und mittels Centricons (10.000 MWCO) unter Erhalt der Aktivität konzentriert. Als Elutionspuffer für die SEC wurde ein 200 mM Tris-Puffer pH 7,1 verwendet; somit war ein Umpuffern der Esteraselösung nicht nötig. Die Esteraseaktivität konnte dabei in einem engen Elutionsbereich detektiert werden (Abb. 28). Die Molmasse dieses Bereichs wurde über Vergleich mit Standardproteinen zwischen 40 – 50 kDa berechnet.



**Abb. 28** SEC der Gap-IEX-Lösung mit Superdex 75; UV-Absorption bei 280 nm (—), Leitfähigkeit (—), Fraktionen mit Hauptferuloylaktivität (—); Applikation: 250  $\mu$ L; Fluss: 0,4 mL/min, 200 mM Tris-Puffer pH 7,1

#### 4.4.2.4 SDS-PAGE

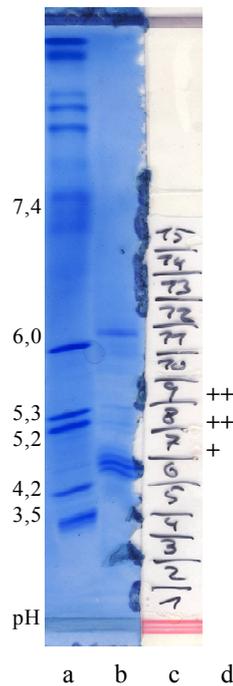
Für eine Sequenzierung der Esterase und genauere Bestimmung der Molmasse war ein weiterer Trennschritt nötig. Dazu wurden Fraktionen mit Aktivität abermals aufkonzentriert und zur SDS-PAGE eingesetzt. Eine erste Aufreinigungsprozedur, bei der die IEX (vgl. 4.4.2.2) mit 100 mM NaCl als erste Gradientenstufe durchgeführt wurde, enthielt mehrere Proteinbanden im Bereich von 40 – 50 kDa (Abb. 29).



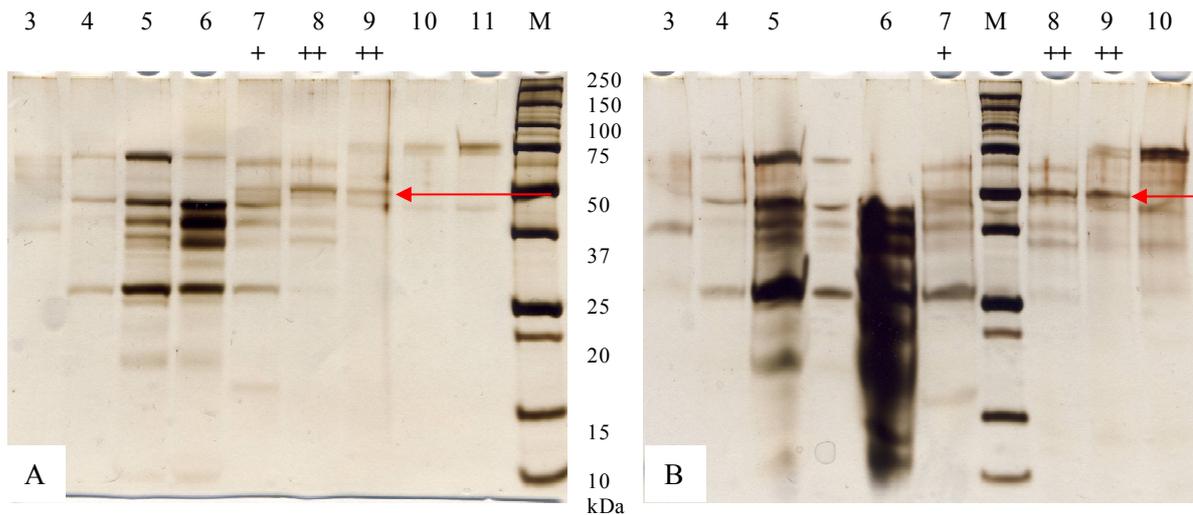
**Abb. 29** SDS-PAGE Gap-Feruloyl-esterase Reinigung nach IEX und SEC, Coomassie-Färbung; M: Marker; a: erstes Gap-Präparat nach IEX und SEC

Da die Esterase durch Zugabe des SDS-Ladepuffers aufgrund des enthaltenen SDS und dessen Anlagerung ihre Aktivität verlor und daher im Gel durch Aktivitätsfärbung nicht mehr nachweisbar war, wurde zur Identifizierung der Enzymbande in Ermangelung einer direkten Nachweismethode der Feruloyl-esteraseaktivität im SDS-PAGE-Gel auf die Methodik der 2D-Elektrophorese zurückgegriffen.

Dazu wurde das SEC-Präparat zuerst zur IEF eingesetzt und anschließend das Gel in Stücke geteilt (vgl. 4.4.2.2) welche einerseits auf Esteraseaktivität untersucht (Abb. 30) und andererseits zur SDS-PAGE verwendet wurden (Abb. 31).



**Abb. 30** IEF-Gel Gap SEC-Präparat mit Aktivitätsanalyse; a-b IEF-Gel nach Coomassie-Färbung: a: Marker, b: Esteraselösung; c Einteilung des IEF-Gel zur Aktivitätsanalyse; d Feruloyl-esteraseaktivität der Gelstücke



**Abb. 31** SDS-PAGE der IEF-Stücke des Gap SEC Präparates, Silberfärbung; Angabe der Gelstücknr. (mit Ferulylesteraseaktivität), **A:** Auftragung des Ladepuffers nach Denaturierung, **B:** Aufgabe der kompletten Gelstücke nach Denaturierung

Zur SDS-PAGE wurde sowohl jeweils der Ladepuffer nach der Denaturierung der IEF-Gelstücke als auch die kompletten Gelstücke verwendet. Dabei zeigte sich, dass nach dem Denaturierungsschritt noch ein Großteil der Proteine in den IEF-Gelstücken verblieben war. Durch Vergleich des Esteraseaktivitätsmusters mit den Proteinbanden der einzelnen Gelstücke konnte die entsprechende Enzymbande mit einer Molmasse von 50 kDa identifiziert werden (Pfeil ← in Abb. 31).

Bei wiederholt durchgeführter Aufreinigung von Kulturüberstand, bei der zur IEX (vgl. 4.4.2.2) 50 mM NaCl als erster Stufengradient verwendet wurde und nur die Fraktionen mit den Hauptaktivitäten vereinigt wurden, konnte ein deutlich reineres Esterase-Präparat erhalten werden (Abb. 32). Die Größe des Proteins wurde mittels Vision Cap Software über den Vergleich mit den Banden der Standardproteine des Markers zu 52 kDa berechnet.

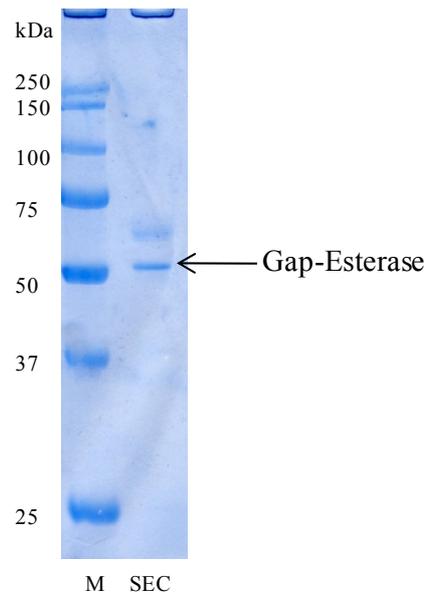


Abb. 32 SDS-PAGE der *Ganoderma applanatum* Esterase nach optimierter Reinigung, Coomassie-Färbung; M: Marker, SEC: Gap-Esterasepräparat nach SEC-Reinigungsschritt; berechnete Molmasse der denaturierten Bande 52 kDa

#### 4.4.2.5 Bilanzierung der Aufreinigung

Durch die Kombination der verschiedenen Aufreinigungsschritte konnte die Esterase mit einer spezifischen Aktivität von  $4,70 \text{ mU mg}^{-1}$  isoliert werden. Dies entsprach einem Reinigungsfaktor bezogen auf den Kulturüberstand von 4,7 (Tab. 13). Die größten Verluste an Enzymaktivität ohne einen Gewinn an Reinheit traten dabei bei der Konzentrierung des Kulturüberstandes auf. Bei der zukünftigen Aufarbeitung der Esterase sollte auf den Konzentrierungsschritt verzichtet werden, um diese Verluste zu vermeiden. Durch ausreichende Verdünnung des Kulturüberstandes und die Wahl eines entsprechend großen Bettvolumens der IEX-Säule sollte die Isolierung der Esterase wie unter den hier beschriebenen Bedingungen mit besseren Ausbeuten möglich sein. Dabei sollte die Ionenstärke der zur IEX eingesetzten Enzymlösung besonders beachtet werden, da die Retention der Esterase bei einem zu hohem Gehalt an Salzen (Leitfähigkeit  $\geq 10 \text{ mS/cm}$ ) behindert wird und ein Großteil der Zielaktivität im Durchbruch eluiert (vgl. 4.4.2.2).

**Tab. 13** Aufreinigung der Esterase aus *Ganoderma applanatum*; Proteinkonzentration: Bradford-Methode, BSA als Standardprotein; Feruloylsteraseaktivität: HPLC-Analyse; Ausbeute: Bilanzierung der Aktivität auf das verwendete Gesamtvolumen

Reinigungsstufe	Proteinkonzentration [mg mL <sup>-1</sup> ]	Feruloylsterase- aktivität [mU mL <sup>-1</sup> ]	spezifische Aktivität [mU mg <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
Kulturüberstand	0,27	0,27	1,01	100,0	1,0
Kulturüberstand Konzentrat	3,03	1,84	0,61	46,0	0,6
IEX	0,06	0,21	3,49	20,9	3,5
SEC	0,20	0,94	4,70	7,5	4,7

#### 4.4.3 Sequenzierung der Esterase mittels ESI-MS/MS

Die Proteinbande der SDS-PAGE bei 52 kDa (Abb. 32) wurde ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse der Aminosäuresequenz genutzt. Nach Trypsinverdau konnten folgende Aminosäure-Sequenzen mittels ESI-MS/MS ermittelt werden („L“ = „L“ oder „I“).

- Sequenz 1: CNAGGSFACASLLTSQGR  
 Sequenz 2: VTLDGQSAGGSSVELHLTANVGR  
 Sequenz 3: SPVWPAYTAQGK  
 Sequenz 4: EYLVSFGGDPSK  
 Sequenz 5: AADVSVLAR  
 Sequenz 6: FTVATGESDVR  
 Sequenz 7: DLFHQALGQSVYR  
 Sequenz 8: DLVVYNFTQYK

Diese Partialsequenzinformationen wurden genutzt, um mittels Suche in geeigneten Datenbanken (NCBI: p-BLAST mit Einschränkung des Organismus: Fungi, Protein Basic Local Alignment Search Tool) Homologien zu bekannten Proteinsequenzen zu finden.

Innerhalb der 23 Aminosäuren der Sequenz 2 wurde dabei eine mutmaßliche konservierte Domäne der Esterase-Lipase Superfamily identifiziert. Esterasen und Lipasen besitzen eine

katalytische Triade, die aus den drei Aminosäuresequenzen Serin, Histidin und Asparaginsäure besteht. Serin ist dabei normalerweise in dem Sequenzmotiv G-x-S-x-G eingebettet (BRENNER, 1988). Dieses Motiv fand sich auch in der hier ermittelten Partialsequenz wieder (Abb. 33).

Die höchste Homologie zur Sequenz 2 hatte eine Esterase aus *Coprinopsis cinerea* (EstA protein, *Coprinopsis cinerea okayama7#130*, Accession number<sup>6</sup> XP\_001836539).

```

#
Ganoderma applanatum Seq. 2      ----VTLDGQSAGSSVELHLT--ANVGR----- 23
Coprinopsis cinerea             NPNRVTINGESAGSSVELHLV--ADAGERLFSGAIAQSVYRTPPLPSPEQ 283
Moniliophthora perniciosa      DPDRVTIDGHSAGSSIELHLVTGLDTGERLFTAIAQSIYRVPVPTKEQ 256
Schizophyllum commune         DPDQVTINGESAGGASIELHLV--ATEEEGLFHGAIAQSVYRTPPLPTPEE 256
Laccaria bicolor               DPTKVTINGESAGSSVGLHLV--AEEGEVLFRAAIVQSLYRTPPLPSPEE 270
                                **:.*.***:*: ***.

```

**Abb. 33** Ausschnitt des Alignments der *Ganoderma applanatum* Partialsequenz 2 und verschiedener Esterasen aus Pilzen; rot: konserviertes Esterasemotiv mit Serinrest (#) der katalytischen Triade; *Coprinopsis cinerea okayama7#130*: Esterase/Lipase EstA, Accession No.: XP\_001836539.2, *Moniliophthora perniciosa* FA553: hypothetisches Protein: Esterase/Lipase, Accession No.: XP\_002388241.1, *Schizophyllum commune* H4-8: hypothetisches Protein: Esterase/Lipase, Carboxylesterase; Accession No.: XP\_003038157.1, *Laccaria bicolor* S238N-H82: vorhergesagtes Protein: Esterase/Lipase, Carboxylesterase; Accession No.: XP\_001885355.1; ClustalW

Sequenz 5 besaß eine gute Homologie zu einem hypothetischen Protein aus *Schizophyllum commune* H4-8 mit vermuteter Esterase/Lipase Eigenschaft (Accession number XP\_003038157). Die anderen Sequenzen weisen teilweise ebenfalls Homologien zu bekannten und hypothetischen Esterasen auf. Für Sequenz 4 werden unter der Einschränkung des Organismus auf Fungi ausschließlich Homologien zu Esterasen/Lipasen gefunden (vgl. Tab. 14). Zwei als hypothetische Esterase/Lipase annotierte Proteine tauchten bei dem Datenbankvergleich der Homologien wiederholt auf. Durch Alignments der einzelnen Partialsequenzen mit diesen Proteinen wurde festgestellt, dass die Sequenzen 4, 2 und 7 eine zusammenhängende große Peptidsequenz innerhalb der *Ganoderma* Esterase darstellt. Die Partialsequenz 5 ist nach einer Lücke von 35 Aminosäuren ebenfalls in beiden Proteinen vorhanden (Abb. 34).

<sup>6</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**Tab. 14 Homologien der Partialsequenzen der *Ganoderma applanatum* Esterase zu bekannten Proteinen; fett: wiederholt auftauchende Proteine**

Accession	Organismus	Protein	Sequenzlänge	E-Value
Sequenz 1: CNAGGSFACASLLTSQGR				
XP_003188958.1	<i>Aspergillus niger</i>	hypothetisches Protein	93	2,2
Sequenz 2: VTLDGQSAGGSSVELHLTANVGR				
XP_001836539.2	<i>Coprinopsis cinerea</i>	EstA, Esterase	595	2·10 <sup>-6</sup>
XP_002388241.1	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	MPER_12759, hypothetische Esterase	397	2·10 <sup>-5</sup>
<b>XP_003038157.1</b>	<b><i>Schizophyllum commune</i></b>	<b>SCHCODRAFT_49173, hypothetische Esterase</b>	<b>543</b>	<b>3·10<sup>-4</sup></b>
<b>XP_001885355.1</b>	<b><i>Laccaria bicolor</i></b>	<b>hypothetische Esterase</b>	<b>547</b>	<b>4·10<sup>-4</sup></b>
Sequenz 3: SPVWPAYTAQGK				
XP_001832630.2	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Lipase I	554	8,8
Sequenz 4: EYLVSFGGDPSK				
CAH17527.1	<i>Pleurotus sapidus</i>	Carotinoïdesterlipase Precursor	546	8,8
XP_774135.1	<i>Cryptococcus neoformans</i>	CNBG4350, hypothetische Esterase	539	12
<b>XP_001885355.1</b>	<b><i>Laccaria bicolor</i></b>	<b>hypothetische Esterase</b>	<b>547</b>	<b>16</b>
Sequenz 5: AADVSVLAR				
<b>XP_003038157.1</b>	<b><i>Schizophyllum commune</i></b>	<b>SCHCODRAFT_49173, hypothetische Esterase</b>	<b>543</b>	<b>0,76</b>
Sequenz 6: FTVATGESDVR				
keine signifikanten Homologien				
Sequenz 7: DLFHQALGQSVYR				
<b>XP_003038157.1</b>	<b><i>Schizophyllum commune</i></b>	<b>SCHCODRAFT_49173, hypothetische Esterase</b>	<b>543</b>	<b>9,6</b>
Sequenz 8: DLVVYNFTQYK				
keine signifikanten Homologien				



*Ganoderma* Esterase die Bestimmung der kompletten Proteinsequenz nötig. Ausgehend von den hier identifizierten Partialpeptidsequenzen könnte die gesamte Gensequenz bestimmt werden. Dazu müssten zuerst Primer abgeleitet werden und über einen cDNA basierten Ansatz das kodierende Gen amplifiziert werden.

#### 4.4.4 Charakterisierung der Feruloylsteraseaktivität aus *Ganoderma applanatum*

##### 4.4.4.1 pH-Abhängigkeit der Ferulasäuremethylesterhydrolyse

Das pH-Optimum der Hydrolyse von Ferulasäuremethylester lag im pH-Bereich von 6. Bei geringeren und höheren pH-Werten nahm die Enzymaktivität deutlich ab. (Abb. 36).

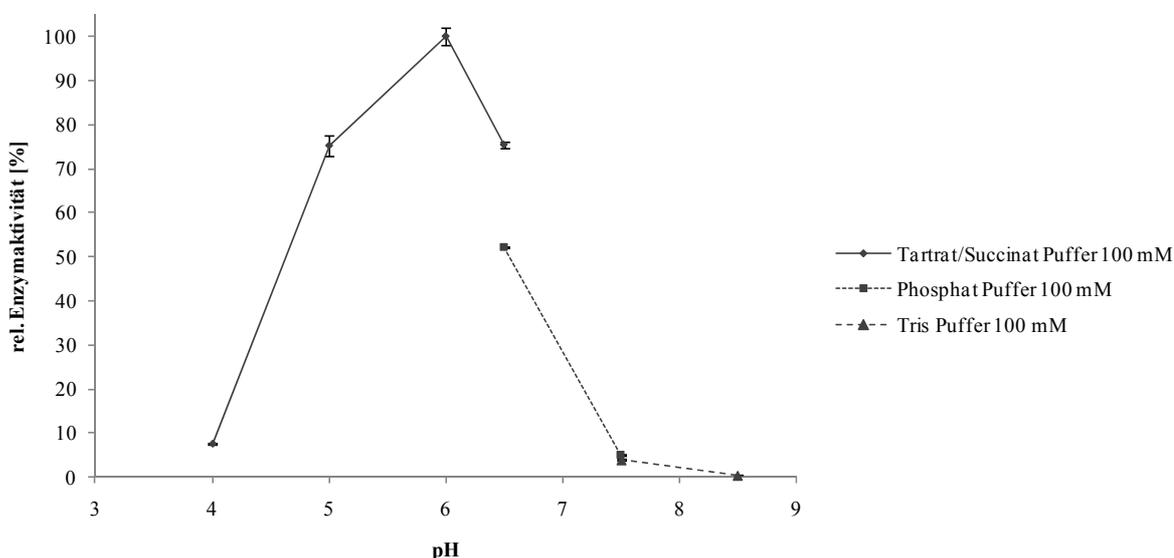


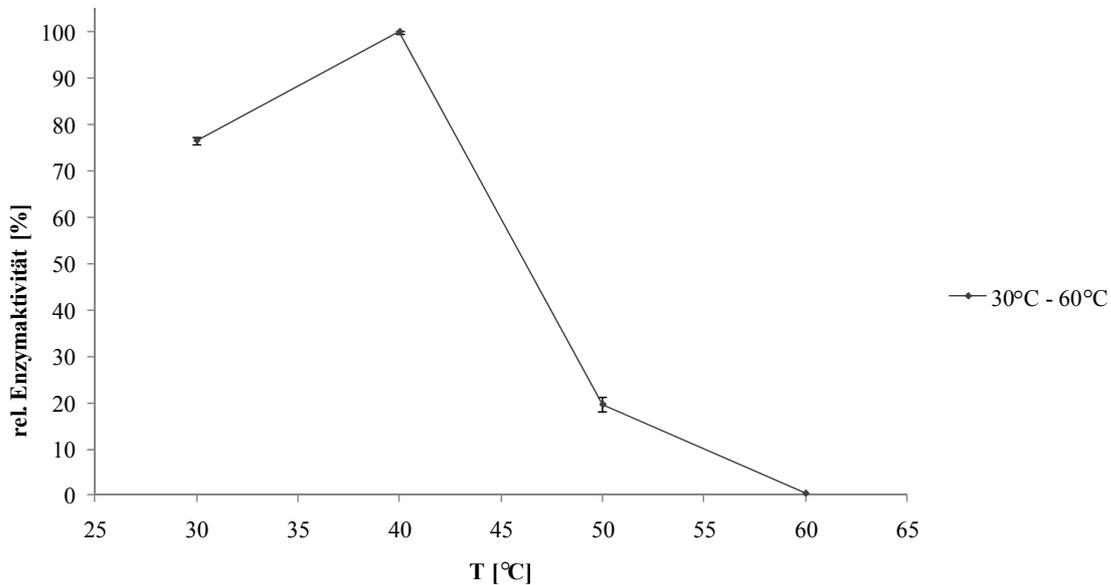
Abb. 36 Relative Enzymaktivität der FAM-Hydrolyse durch *Ganoderma applanatum* Esterase in Abhängigkeit vom pH-Wert; Angabe der relativen Enzymaktivität aus HPLC-Analyse; FAM-Konzentration 1,6 mM; Inkubation bei 40 °C, 3 h

Ab einem pH-Wert von < 4 wurde die Esterase komplett inhibiert, ebenso ist im Vergleich zum Blindwert keine nennenswerte Spaltung mehr ab pH 7,5 zu erkennen.

Das pH-Optimum war ähnlich zu dem der Esterase aus *Pleurotus sapidus* (4.3.3.1) und stellt keinen außergewöhnlichen Wert gegenüber bereits charakterisierten Feruloylsterasen aus Ascomyceten dar (BENOIT *et al.*, 2008). Im Gegensatz zur *Pleurotus* Esterase, die bei einem pH-Wert von 4 noch circa 60 % der Aktivität besaß, wurde die *Ganoderma* Esterase bei diesem pH-Wert inhibiert. Ihr Wirkungsbereich hatte damit eine kleinere pH-Spanne. Bei einer aus *Fusarium proliferatum* isolierten Feruloylsterase wurde der gleiche inhibierende Effekt eines sauren pH-Wertes beobachtet (SHIN *et al.*, 2006) ebenso bei der Feruloylsterase des *Lactobacillus acidophilus* (WANG *et al.*, 2004).

#### 4.4.4.2 Temperatur-Abhängigkeit der Ferulasäuremethylesterhydrolyse

Das Temperaturoptimum der Hydrolyse von Ferulasäuremethylester lag bei Verwendung des 100 mM Tartrat/Succinat-Puffers pH 6 bei 40 °C (Abb. 37). Bei höheren Temperaturen war die Aktivität stark vermindert und ging ab 60 °C vollständig verloren.



**Abb. 37** Relative Enzymaktivität der Hydrolyse von FAM durch Gap-Esterase in Abhängigkeit von der Temperatur, Angabe der relativen Enzymaktivität aus HPLC-Analyse; FAM-Konzentration 1,6 mM; Inkubation bei pH 6, 4 h

Bei der Betrachtung des Temperaturoptimums wurde auch die Temperaturstabilität der Esterase untersucht. Verglichen wurde dabei die ursprüngliche Aktivität mit der noch vorhandenen Restaktivität nach Inkubation der Esterase ohne Substrat bei einer gegebenen Temperatur für eine Stunde (Abb. 38). Der Aktivitätstest selbst wurde beim Temperaturoptimum von 40 °C durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass die Esterase bei höheren Temperaturen nicht stabil bleibt und sich thermisch leicht inaktivieren ließ.

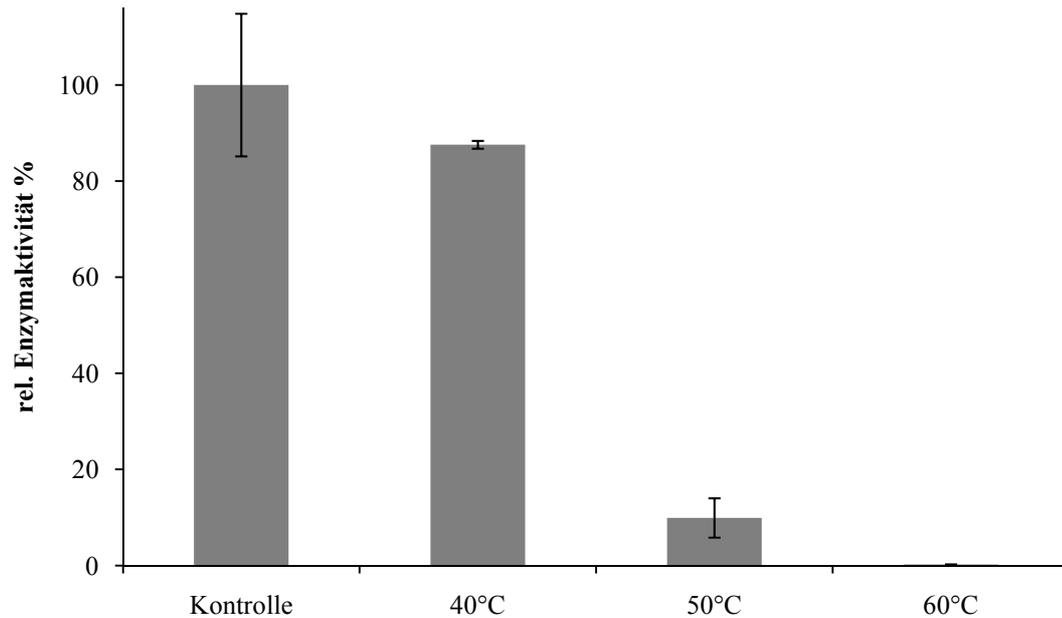


Abb. 38 Temperaturstabilität der *Ganoderma applanatum* Esterase, Angabe der relativen Enzymaktivität nach 1 h Inkubation im Vergleich zu unbehandeltem Enzym bei pH 6 in 100 mM Tartrat/Succinat-Puffer

Bei 40 °C war die Esterase relativ stabil und zeigte eine Restaktivität von circa 90 %. Diese Temperaturstabilität war deutlich besser als die der *Pleurotus* Esterase (4.3.3.2), die nur noch eine Restaktivität von 50 % nach einstündiger Inkuabtion aufwies. Dadurch konnte die *Ganoderma* Esterase ohne große Verluste der Aktivität für Reaktionen am Temperatur-optimum eingesetzt werden.

#### 4.4.4.3 Bestimmung enzymkinetischer Parameter der Ferulasäuremethylesterhydrolyse

Für die Hydrolyse von Ferulasäuremethylester wurde eine Bestimmung des  $K_m$ -Wertes durchgeführt. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an FAM in 100 mM Tartrat/Succinat-Puffer pH 6 verwendet. Durch die schlechte Wasserlöslichkeit des Esters war die maximal verwendbare Konzentration an FAM begrenzt und daher ein Erreichen der Enzym-Substrat-Komplex-Sättigungskonzentration nicht möglich. Auf Grund dessen erfolgte eine Berechnung des  $K_m$ -Wertes nach Linearisierungsverfahren. Mit der Lineweaver-Burk-Linearisierung wurde ein  $K_m$ -Wert von 3,5 mM Ferulasäuremethylester bei einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit von  $v_{\max} = 75,6$  U/L berechnet.

Die Substrataffinität bei diesem  $K_m$ -Wert war im Vergleich mit der *Pleurotus* Esterase (2 mM, 4.3.3.3) deutlich geringer und lag über den bisherigen in der Literatur beschriebenen Ferulasäureesterasen (Übersicht bei BENOIT *et al.*, 2008; z. B.: 2,6 mM *Penicillium expansum* (DONAGHY *et al.*, 1997)). Der  $v_{\max}$ -Wert der *Ganoderma* Esterase war circa um den Faktor 40 größer als 2 U/L der *Pleurotus* Esterase. Damit war die Substrataffinität und somit die

Bindung des Substrates an das Enzym zwar geringer, die Umsetzung zum Produkt lief aber deutlich schneller ab.

#### 4.4.4.4 Hydrolyse weiterer Ferulasäureester und anderer Substrate

Neben der Fähigkeit zur Hydrolyse von Ferulasäuremethylester wurde untersucht, ob die Esterase andere, natürliche Ferulasäureester hydrolysiert. Zum Einsatz kamen dabei aus Maiskleie isolierte Ferulasäurarabinsylester (vgl.4.3.3.4) und Zuckerrübenpektin als ferulasäurehaltiges Polysaccharid.

Im Vergleich zur Hydrolyse des Methylesters nahm bei gleichen Substratkonzentrationen die Aktivität mit steigender Saccharidkette ab (Abb. 39).

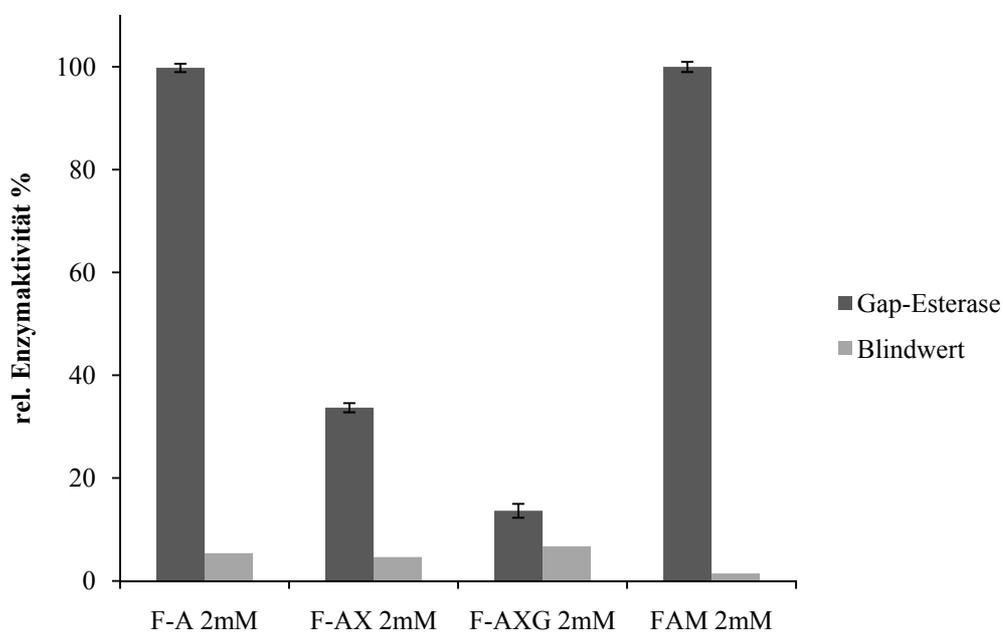
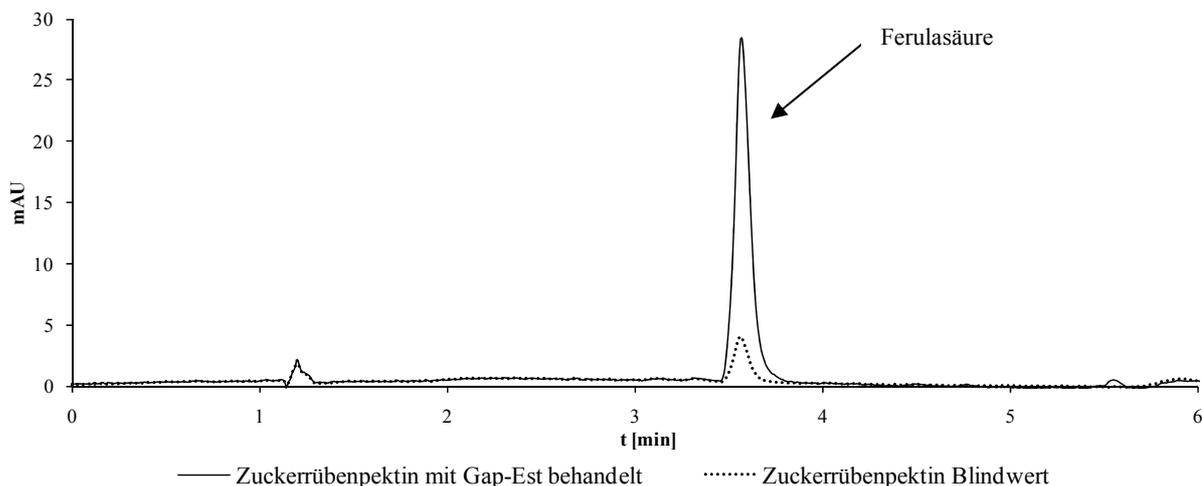


Abb. 39 Hydrolyse unterschiedlicher Ferulasäureester, Angabe der relativen Enzymaktivität gegenüber 2 mM Substratlösungen in 100 mM Tartrat/Succinat-Puffer pH 6 bei 40 °C

Bei der enzymatischen Hydrolyse der Ferulasäureester in Zuckerrübenpektin bestand die Schwierigkeit, dass das Polysaccharid nicht so leicht wasserlöslich ist wie Mono- und Oligosaccharide. Bei Verwendung einer 2,5 %igen Zuckerrübenpektinsuspension in Puffer pH 6 konnte unter Zugabe von Esterase die Freisetzung von Ferulasäure nachgewiesen werden (Abb. 40). Dazu war es nötig, nach der Inkubation mit der Esterase die Ferulasäure nach Ansäuern der Suspension mit Pentan/Ether auszuschütteln, da die Emulsion als solche nicht zur Analyse mittels HPLC eingesetzt werden konnte.

Die aus *Ganoderma applanatum* isolierte Esterase besaß damit ein Substratspektrum, welches dem von bisher charakterisierten Feruloyl-esterasen und der Definition nach der „International

Union of Biochemistry and Molecular Biology“ (IUBMB) entsprach, nämlich die Freisetzung von Ferulasäure aus komplexen natürlichen Polysacchariden und Hydrolyse von synthetischen Estern wie Ferulasäuremethylester (Übersichten bei RUMBOLD *et al.* 2004 und FAZARY *et al.* 2007).



**Abb. 40** Ferulasäurefreisetzung aus Zuckerrübenpektin durch Gap-Esterase; HPLC Chromatogramm bei 325 nm des resuspendierten Pentan/Ether-Extraktes; Inkubation von 200  $\mu$ L 2,5 % Zuckerrübenpektinlösung mit 10  $\mu$ L Gap-Esterasepräparat bei 40 °C über Nacht; Konversion von 23 mol-% des Ferulasäuregehaltes des Zuckerrübenpektins (Betapec RU 301: 0,43 % Ferulasäure)

Die *Ganoderma* Esterase war außerdem in der Lage, die synthetischen Substrate *p*-Nitrophenylbutanoat und -palmitat zu spalten. Im Gegensatz zur Esterase aus *Pleurotus sapidus* (vgl. 4.3.3.4) stellte Tween 80 aber kein Substrat dar und wurde nicht hydrolysiert.

#### 4.5 Enzymatische Synthese von Ferulasäure-Saccharid-Estern

Nach der Isolierung und Charakterisierung der Ferulylesteraseaktivitäten bestand das Ziel der Nutzung der Enzyme darin, sie nicht zur Esterspaltung, sondern zur Veresterung von Ferulasäure und Sacchariden einzusetzen. Dadurch wäre eine Möglichkeit der Verknüpfung von Phenolkomponenten mit Sacchariden geschaffen, um anschließend eine Quervernetzung und oxidative Gelierung unter Einsatz von Laccasen durchzuführen. Zur enzymatischen Synthese der Ferulasäure-Saccharid-Ester wurden unterschiedliche Methoden zur reversen Hydrolyse und Umesterung von Ferulasäuremethylester getestet.

Die Estersynthese ist prinzipiell möglich, da die Esterhydrolyse reversibel ist und es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt. In wässrigen Medien ist das Reaktionsgleichgewicht nahezu vollständig auf die Seite der Hydrolyseprodukte verschoben, da es sich bei der Estersynthese um eine Kondensationsreaktion unter Wasserabspaltung handelt. Daher muss der Anteil des Wassers im Reaktionsansatz reduziert werden, um nach den Prinzipien des

Massenwirkungsgesetzes die Estersynthese zu ermöglichen. Enzyme können für diese Synthese eingesetzt werden, da sie an der Reaktion nur als Biokatalysator beteiligt sind und somit Hin- und Rückreaktion gleichermaßen beschleunigen.

#### 4.5.1 Versuche zur Umesterung von Ferulasäuremethylester und Sacchariden in organischen Lösungsmitteln

Mit der aus *Pleurotus sapidus* isolierten Esterase wurden Versuche zur Umesterung von Ferulasäuremethylester und Glucose, bzw. Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid in einem ternären Lösungsmittelsystem durchgeführt. Das Lösungsmittelsystem bestand aus einer Mikroemulsion von Hexan, *tert*-Butanol und Wasser (47,2/50,8/2,0; v/v/v) (VAFIADI *et al.*, 2006a). Diese zeigten aber keine neuen Veresterungsprodukte. Auch eine Variation des Wasseranteils bis 5 % führte zu keinem Ergebnis, wie es von VAFIADI *et al.* (2006a) für die Esterase aus *Sporotrichum thermophile* beschrieben wurde.

Eine Analyse zur Kompatibilität der *Pleurotus* Esterase mit organischen Lösungsmitteln zeigte, dass der Großteil der Aktivität bei Mischung mit diesen verloren ging. Eine Restaktivität war bei den nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln *tert*-Butylmethylether (MBTE) und Toluol vorhanden, wenn diese in einem zweiphasigen System mit Wasser verwendet wurden (Tab. 15).

**Tab. 15** Hydrolyseaktivität der Esterasen in organischen Lösungsmitteln; Angabe der relativen Enzymaktivität aus HPLC-Analyse der freigesetzten Ferulasäure; 1 Teil Enzymlösung + 1 Teil 2 mM FAM in Lösungsmittel; Inkubation bei 40 °C über Nacht; pH 6;

Lösungsmittel (50 %)	rel. Enzymaktivität [%]	
	Psa	Gap
H <sub>2</sub> O (100 mM Tartrate/Succinat-Puffer pH 6)	100	100
Acetonitril	2	9
Hexan	5	9
Toluol	57	16
MTBE	85	26

Daher wurde versucht, den Ansatz des ternären Lösungsmittelsystems, d.h. sehr geringer Wasseranteil zur Verschiebung der Gleichgewichtslage der Reaktion, auf die Verwendung der beiden Lösungsmittel zu übertragen. Der Ferulasäuremethylester wurde in MTBE bzw.

Toluol gelöst und das Enzym mit dem gelösten Zucker (Arabinose, Glucose, Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranose) als wässrige Komponente zugegeben. Dabei konnten ebenfalls keine neuen Veresterungsprodukte identifiziert werden.

Nach der Isolierung der Esterase aus *Ganoderma applanatum* wurden diese Versuche auch mit diesem Enzym unter Einsatz von Ferulasäure und Ferulasäuremethylester und den Monosacchariden Arabinose, Glucose und  $\alpha$ -D-Methylglycopyranose durchgeführt. Auch hierbei blieb die Bildung der angestrebten Veresterungsprodukte aus.

#### 4.5.2 Umesterung von Ferulasäuremethylester und Monosacchariden

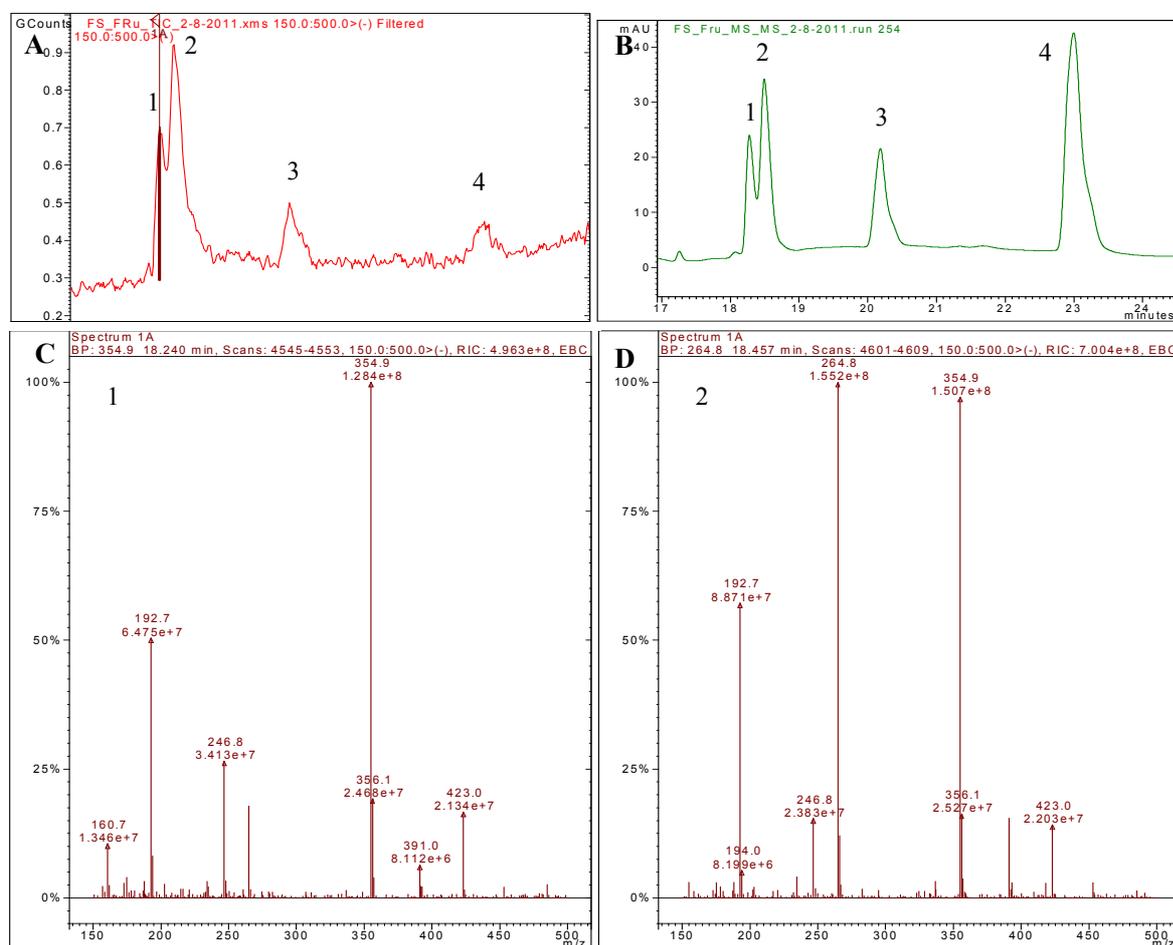
Bisher beschriebene Umesterungen von Ferulasäureestern mit Sacchariden wurden in organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelmischungen durchgeführt (TOPAKAS *et al.*, 2005b; MASTIHUBOVÁ *et al.*, 2006; COUTO *et al.*, 2010). Bei enzymatischen Synthesen von anderen Ferulasäureestern diente die Alkoholkomponente auch gleichzeitig als Lösungsmittel, sofern auf den Einsatz organischer Lösungsmittel verzichtet wurde. So wurden Umesterungen von Triglyceriden mit Ferulasäuremethylester direkt in Sojabohnenöl (LASZLO *et al.*, 2003) oder die Veresterung von Glycerol mit Ferulasäure in Glycerol durchgeführt (TSUCHIYAMA *et al.*, 2007; MATSUO *et al.*, 2008). Dies ist bei der Veresterung von Ferulasäure mit Zuckern nicht gegeben, da diese als Feststoffe vorliegen.

Dass die Veresterung von Monosacchariden auch in einem rein wässrigen System möglich ist, wurde für den Einsatz von sehr hohen Konzentrationen an Zuckermonomeren beschrieben (TSUCHIYAMA *et al.*, 2006). Dabei wurde ein kommerzielles Esterasepräparat eines *Aspergillus niger* verwendet und die dabei gebildeten Ester nicht näher charakterisiert.

Da die eigenen Versuche zur Veresterung von Monosacchariden in organischen Lösungsmitteln erfolglos war und mit zunehmenden Oligomerisierungsgrad der Saccharide mit einem Problem der Löslichkeit in unpolaren Lösungsmitteln zu rechnen ist, wurde versucht, die Umesterung in einem wässrigen System durchzuführen. Dazu wurden gesättigte Lösungen von Monosacchariden in Tartrat/Succinat Puffer pH 6 hergestellt. Ferulasäure bzw. Ferulasäuremethylester wurde in DMSO gelöst und die Reaktion durch Zugabe der Enzymlösung gestartet. In einem der ersten Versuche mit Arabinose, Fructose und Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranosid konnte unter Verwendung der Esterase aus *Ganoderma applanatum* und Ferulasäuremethylester mit Fructose die Bildung von zwei neuen Substanzen beobachtet werden.

Diese eluierten während der HPLC-Analyse vor der Ferulasäure. Durch Analyse des Reaktionsansatzes mittels HPLC-MS konnten die Molekülmassen der vermuteten Ferulasäurefructosylester bestätigt werden. Die berechnete molare Masse eines Esters mit der Summenformel  $C_{16}H_{20}O_9$  beträgt  $356,325 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Für beide Substanzen wurden identische Molekülmassen von  $356 \text{ m/z}$  gemessen (im ESI negativ Modus  $355 \text{ m/z}$ ) (Abb. 41).

Bei Verwendung der Esterase aus *Pleurotus sapidus* konnte ebenfalls bei Fructose die Bildung der beiden neuen Substanzen beobachtet werden, wenn auch nur in einer sehr geringen Menge, was auf eine geringere Enzymaktivität schließen ließ. Wegen der unter 4.3.3.5 beschriebenen Schwierigkeiten der Konzentrierung der *Pleurotus* Esterase wurde für weitere Versuche die Esterase aus *Ganoderma applanatum* verwendet.



**Abb. 41 HPLC-MS Daten der Umesterung von Ferulasäuremethylester und Fructose mit *Ganoderma applanatum* Esterase; A: TIC-Signal 150 – 500  $m/z$ ; B: UV-Chromatogramm 254 nm; C und D: Massenspektren der Feruloylfructosepeaks; 1 und 2: Feruloylfructose; 3: Ferulasäure; 4: Ferulasäuremethylester**

Für die Monosaccharide Glucose und Galactose konnten ebenfalls neue Substanzen mit ähnlichen Retentionszeiten im HPLC-Chromatogramm analog den Ferulasäurefructosylestern identifiziert werden (Tab. 16). Für diese wurden ebenfalls identische Molekülmassen von  $356 \text{ m/z}$  mittels HPLC-MS bestimmt.

Die Esterase aus *Ganoderma applanatum* katalysiert die enzymatische Veresterung von Ferulasäure mit Monosacchariden ohne organische Lösungsmittel. Die Bildung von zwei Estern mit geringfügig unterschiedlichen Retentionszeiten bei der Umesterung wurde auch von TSUCHIYAMA *et al.* 2006 beobachtet. Dabei könnte es sich um Ester der Anomere handeln. Andererseits könnte die Ferulasäureeinheit auch über unterschiedliche Sauerstoffatome der Monosaccharide gebunden sein.

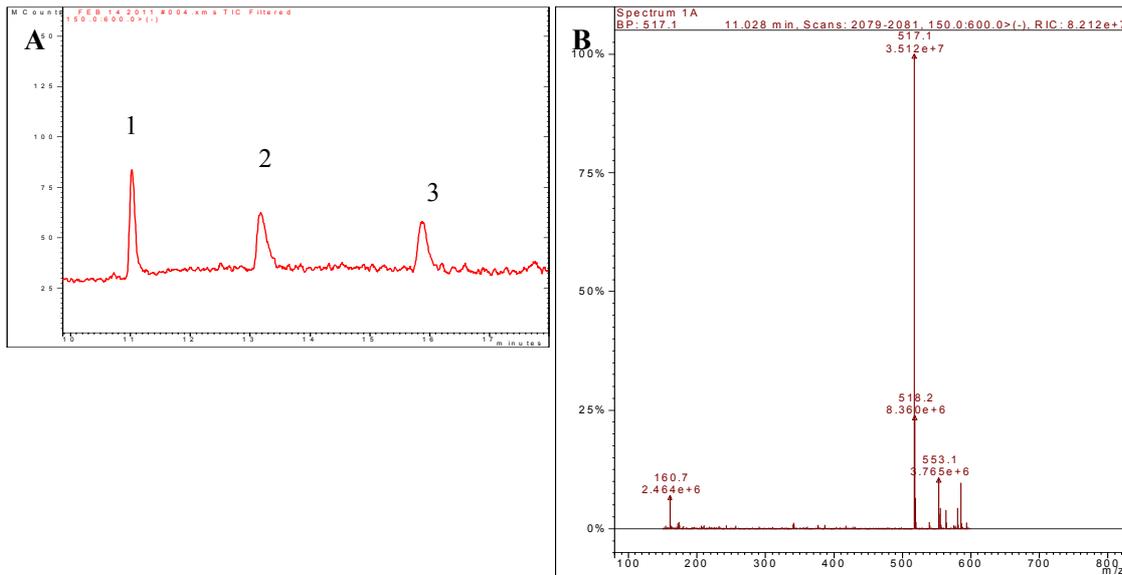
**Tab. 16 Retentionszeiten der Feruloylmonosaccharide (HPLC-Methode vgl. 3.13 und Tab. 9)**

Substrat	Retentionszeit [min]
Fructoseester	2,6 2,9
Glucoseester	2,8 2,9
Galactoseester	2,9
Ferulasäuremethylester	5,3*
Ferulasäure	3,6*

\*Retentionszeiten als Referenz angegeben

#### 4.5.3 Umesterung von Ferulasäuremethylester und Disacchariden

Analog zu den Umesterungsansätzen mit Monosacchariden wurden auch Versuche mit Disacchariden durchgeführt. Mit den Disacchariden Lactose, Maltose und Saccharose konnten wie bei den Monosacchariden neue Substanzen im HPLC-Chromatogramm detektiert werden. Zur exemplarischen Bestätigung der Veresterung konnte durch HPLC-MS Analyse die Molekülmasse des Ferulasäuresaccharosylesters mit 518 m/z bestimmt werden (im ESI negativ Modus 517 m/z; Abb. 42). Die berechnete molare Masse eines Esters mit der Summenformel  $C_{22}H_{30}O_{14}$  beträgt  $518,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .



**Abb. 42 HPLC-MS Daten der Umesterung von Ferulasäuremethylester und Saccharose mit *Ganoderma applanatum* Esterase; A: TIC-Signal 150 – 600 m/z; B: Massenspektrum des Feruloysaccharosepeaks; 1: Feruloysaccharose; 2: Ferulasäure; 3: Ferulasäuremethylester**

Die Bildung der Ester war abhängig von der Löslichkeit des Saccharides. Im Ansatz mit der schlechter löslichen Lactose wurde vorrangig die Hydrolyse des Ferulasäuremethylesters beobachtet. Hier kam es in sehr geringem Umfang zur Bildung des Lactoseesters.

Dabei besteht zwischen der Umesterungsreaktion und der Hydrolyse eine Konkurrenz, die vorrangig durch den Wassergehalt der Lösung beeinflusst wird. Die Katalyse der Esterspaltung und Esterbildung läuft in mehreren Schritten ab. Zuerst kommt es zur Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes. Die Hydroxylgruppe des Serinrestes der katalytischen Triade greift anschließend die Carbonylgruppe des Substrates an und es kommt zur Freisetzung des Acyl-Enzym-Komplexes und der alkoholischen Komponente (Eq. 1 Abb. 43). Im weiteren Verlauf reagiert der Acyl-Enzym-Komplex mit einem Nucleophil unter Deacetylierung des Komplexes zum freien Enzym und neuem Ester (Eq. 2 Abb. 43). Das Nucleophil kann dabei der eingesetzte Alkohol (hier die Saccharide) als auch Wasser sein. Ein höherer Wassergehalt verschiebt somit die Gleichgewichtslage der beiden konkurrierenden Reaktionen hin zu den Hydrolyseprodukten.

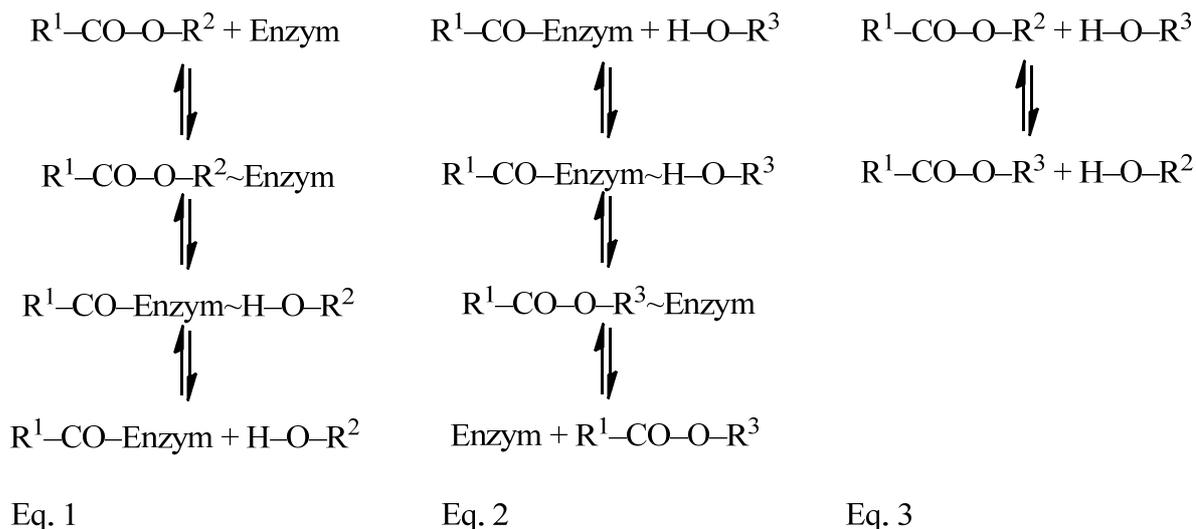


Abb. 43 Mechanismus der Esterase katalysierten Reaktion; Darstellung der Gleichgewichte der Teilreaktionen Eq. 1 und Eq. 2, sowie des Gesamtgleichgewichtes Eq. 3; hier: R<sup>1</sup>: Feruloylrest, R<sup>2</sup>: Methylgruppe, R<sup>3</sup>: H oder Saccharidrest; modifiziert nach (GAIS *et al.*, 2002)

Bei der enzymatischen Umesterung kann dennoch nicht komplett auf Wasser verzichtet werden, da die meisten Enzyme für die Aufrechterhaltung ihrer tertiären Struktur und somit ihrer katalytischen Aktivität ein Mindestmaß an Hydratwasser benötigen. Weiterhin ist für die verwendeten Saccharide und potentiellen Polysaccharide Wasser das bevorzugte Lösungsmittel.

Für Saccharide ebenfalls gute Lösungsmittel sind aprotische polare Lösungsmittel wie DMSO oder DMF. Für diese wurde gezeigt, dass eine Veresterung von Disacchariden oder Cyclodextrinen mit Fettsäuren durch Peptidasen, die ebenfalls zu den Hydrolasen gehören, in DMSO möglich ist (PEDERSEN *et al.*, 2002; PEDERSEN *et al.*, 2005). Diese Möglichkeit der Umsetzung konnte hier nicht verfolgt werden, da die *Ganoderma* Esterase wie die meisten Esterasen durch erhöhte Konzentrationen an DMSO inaktiviert wird (Abb. 44).

In zukünftige Untersuchungen könnte versucht werden, die Esterase für den Einsatz in DMSO zu stabilisieren. Für die Lipase aus *Candida rugosa*, die in reinem DMSO ebenfalls keine Enzymaktivität besitzt, wurde gezeigt, dass nach einer Verkapselung mit einem Polyacrylamidnanogel die Umesterung von Vinyldecanoat und Dextran in wasserfreiem DMSO möglich ist (GE *et al.*, 2009).

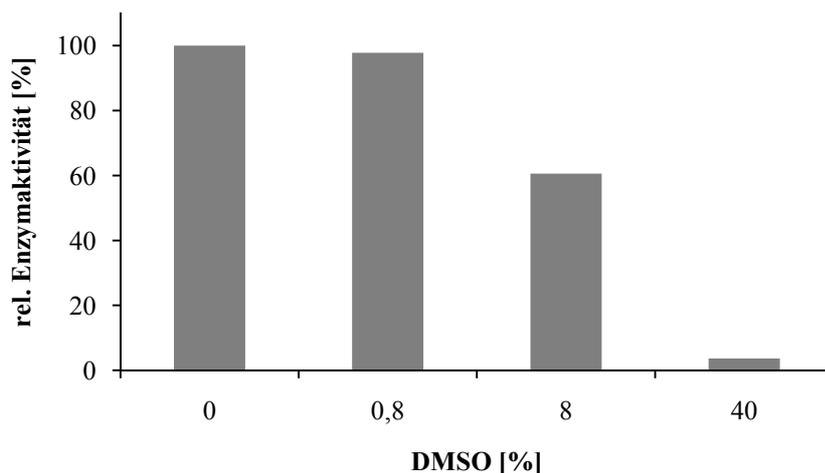


Abb. 44 Hydrolyse von Ferulasäuremethylester durch *Ganoderma applanatum* Esterase in Abhängigkeit der DMSO-Konzentration, Angabe der relativen Enzymaktivität aus HPLC-Analyse; FAM-Konzentration: 0,5 mM, Inkubation: pH 6, 40 °C, 2 h

#### 4.5.4 Parameter der Umesterung mit Esterase aus *Ganoderma applanatum*

Am Beispiel der Umesterung von Ferulasäuremethylester und Galactose mit der Esterase aus *Ganoderma applanatum* wurden verschiedene Reaktionsparameter im wässrigen System untersucht.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Reaktion wurde deutlich, dass eine Erhöhung der Temperatur vorrangig zu einer verstärkten Hydrolyse des als Substrat eingesetzten Ferulasäuremethylesters führt (Abb. 45). Bei längerer Inkubationsdauer nahm der Anteil an gebildetem Galactoseester bei Temperaturen ab 30 °C nur noch geringfügig zu. Das Verhältnis der Bildungsrate von Galactoseester zur Freisetzung von Ferulasäure verschlechterte sich deutlich bei höheren Temperaturen mit zunehmender Inkubationszeit.

Zur Betrachtung der Kinetik der Umesterungsreaktion wurden der Verlauf der Bildung von Galactoseester und die Freisetzung von Ferulasäure über die Zeit analysiert. Dabei wurde das Reaktionsgemisch aus Galactose, Ferulasäuremethylester und Enzymlösung bei 37 °C inkubiert. Aliquote wurden zu unterschiedlichen Zeiten entnommen und mittels HPLC analysiert (Abb. 46). Zu Beginn der Inkubation wurde bis zu einer Zeit von circa acht Stunden mehr Galactoseester gebildet als durch Hydrolyse an Ferulasäure freigesetzt wird. Danach kommt es vorrangig zur Hydrolyse. Nach circa 15 Stunden Inkubationsdauer ist noch eine Zunahme an Galactoseester zu erkennen. Die Konversion des Ferulasäuremethylesters zum Galactoseester betrug maximal 11,5 %. Längere Inkubation führte zum partiellen Abbau des Galactoseesters.

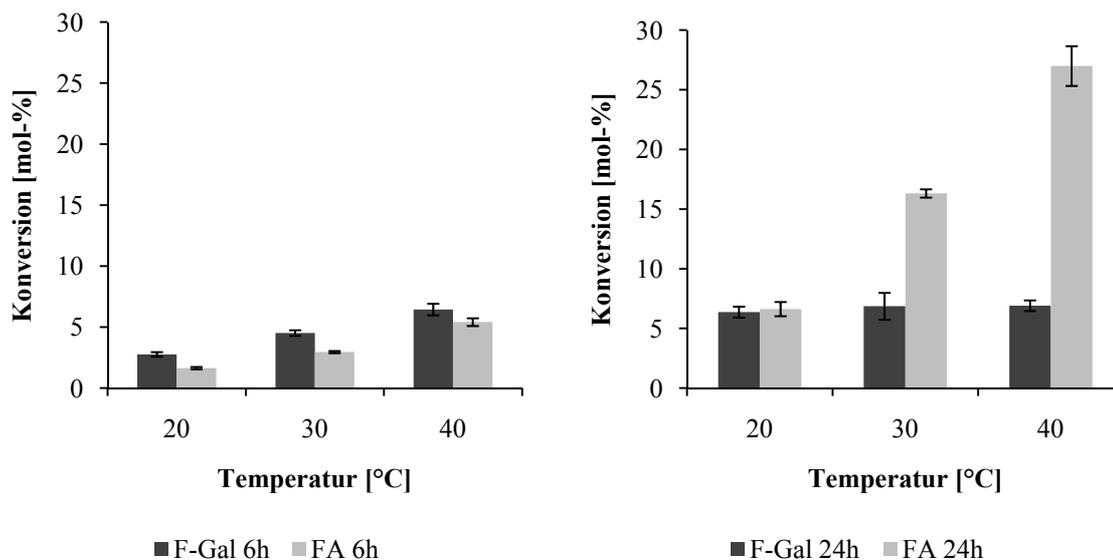


Abb. 45 Umesterung von Galactose und Ferulasäuremethylester mit *Ganoderma applanatum* Esterase in Abhängigkeit der Temperatur bei pH 6; links nach 6 Stunden, rechts nach 24 Stunden; Angabe der Konversion [mol-%] aus HPLC-Analyse bei 325 nm bezogen auf eingesetzten Ferulasäuremethylester

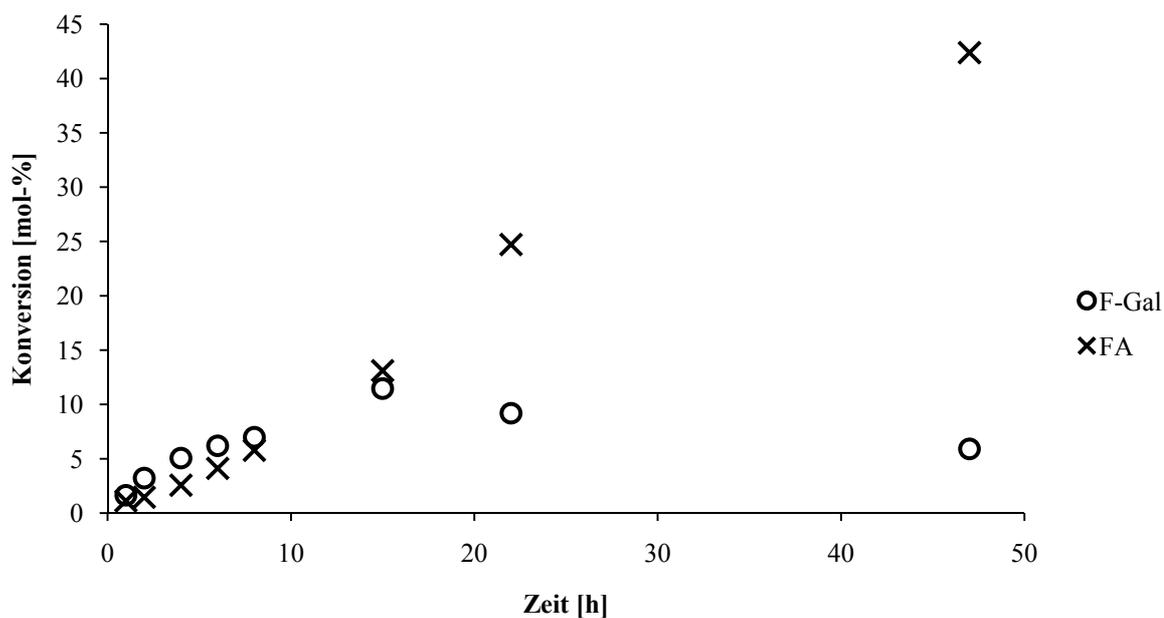
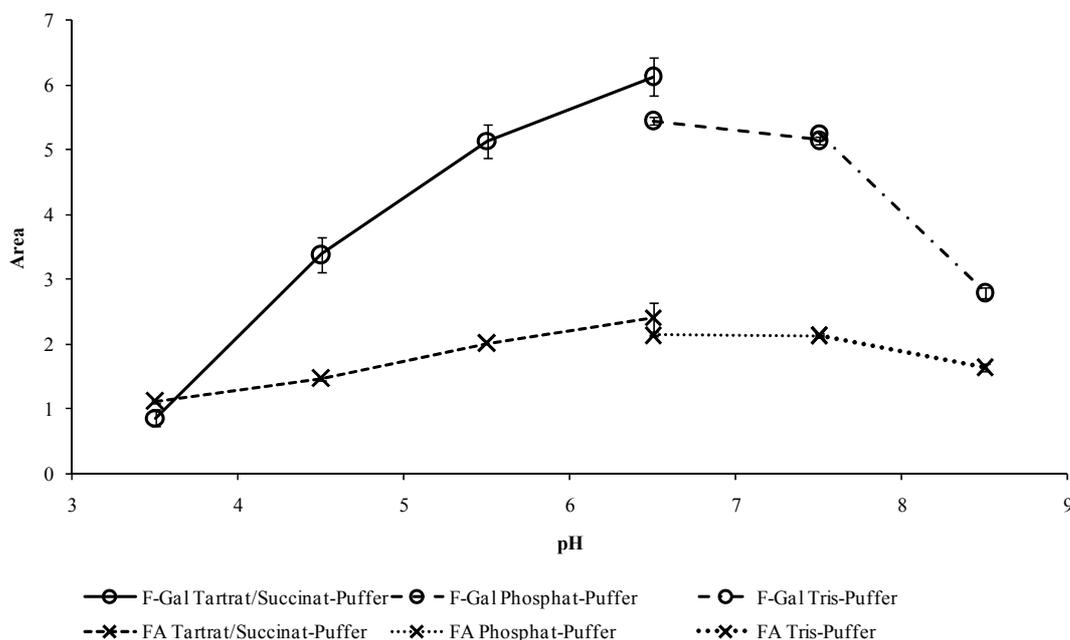


Abb. 46 Kinetik der Umesterung von Galactose und Ferulasäuremethylester bei 37 °C und pH 6 mit *Ganoderma applanatum* Esterase; von entnommenen Aliquoten Angabe der Konversion [mol-%] aus HPLC-Analyse bei 325 nm bezogen auf eingesetzten Ferulasäuremethylester

Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Umesterung wurde über sechs Stunden bei 37 °C durchgeführt. Das Maximum der Enzymaktivität der Synthese des Galactoseesters war ähnlich dem Maximum der Hydrolyse des Methylesters (vgl. 4.4.4.1) und lag bei pH 6,5 mit einer Konversionsrate von 6 mol-% bezogen auf die eingesetzte Menge an Ferulasäuremethylester (Abb. 47). Im Gegensatz dazu kam es im Umesterungsansatz bei

höheren pH-Werten nicht zu einem starken Einbruch der Enzymaktivität. Das optimale Verhältnis zwischen der Bildung von Galactoseester und Hydrolyse zu Ferulasäure wurde bei einem pH-Wert von 5,5 – 6,5 erhalten.



**Abb. 47 Umesterung von Galactose und Ferulasäuremethylester mit *Ganoderma applanatum* Esterase in Abhängigkeit des pH-Wertes; Inkubation 6 h bei 37 °C; Angabe der Konversion [mol-%] aus HPLC-Analyse bei 325 nm bezogen auf eingesetzten Ferulasäuremethylester**

Die Umesterungsansätze wurden mit gesättigten Lösungen der Saccharide durchgeführt. Bei höherem Wasseranteil zeigte sich, dass vorrangig Hydrolyse stattfand (z. B. beim Umesterungsansatz mit Lactose). Um herauszufinden, ob eine Umesterung auch bei niedrigeren Saccharid-konzentrationen möglich ist, wurde die Wasseraktivität durch andere Gelöststoffe, die nicht als Reaktionspartner in Frage kamen, abgesenkt. Dazu wurde eine gesättigte Lösung von Natriumsulfat hergestellt und darin anschließend Galactose in unterschiedlichen Gehalten gelöst und zur Umesterung eingesetzt. Es zeigte sich, dass dies keinen Einfluss auf das Verhältnis von Umesterung zu Hydrolyse hatte (Tab. 17).

**Tab. 17 Verhältnis Feruloylgalactose zu Ferulasäure bei unterschiedlichen Galactosegehalten nach Inkubation mit *Ganoderma applanatum* Esterase**

	Verhältnis F-Gal/FA	
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Ansatz	H <sub>2</sub> O Ansatz
50% Galactoselsg.	1,8	1,9
20% Galactoselsg.	0,6	0,8
10% Galactoselsg.	0,3	0,3

Mit steigendem Wasseranteil nahm das Ausmaß der Umesterung ab und das der Hydrolyse zu. Es kam zu einer Aktivitätssteigerung der Esterase unter Verwendung der Natriumsulfatlösung im Vergleich zur rein wässrigen Lösung, aber nicht zu einer merklichen Steigerung der Umesterung bei niedrigeren Galactosegehalten (Abb. 48).

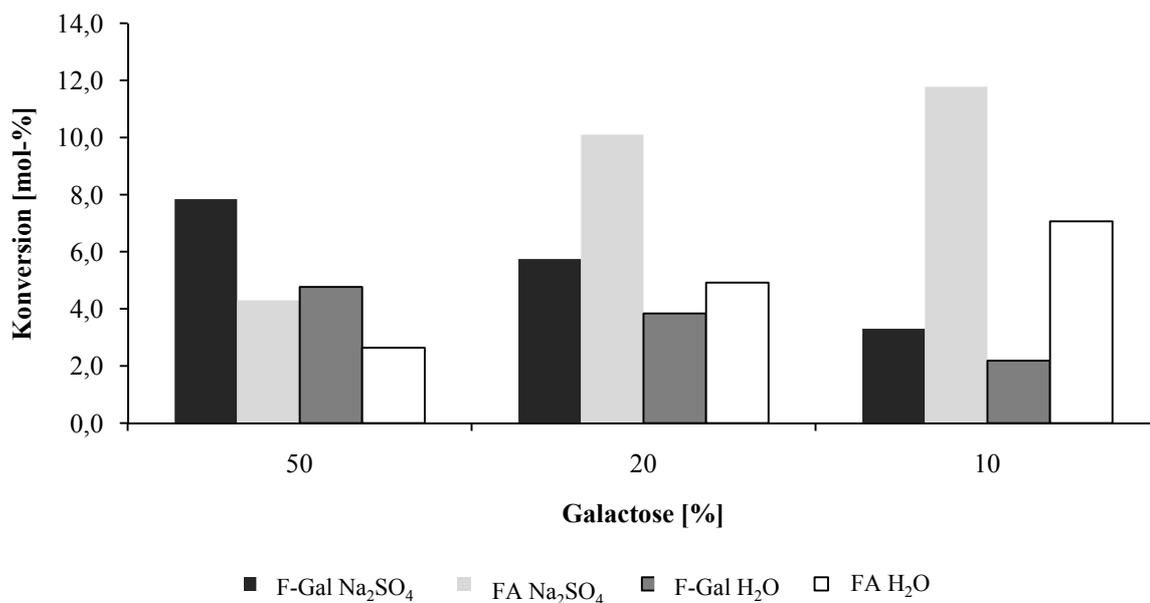


Abb. 48 Einfluss von Gelöststoffen auf die Umesterung von Galactose und Ferulasäuremethylester mit *Ganoderma applanatum* Esterase bei 37 °C und pH 6, nach 6 h; Angabe der Konversion [mol-%] aus HPLC-Analyse bei 325 nm bezogen auf eingesetzten Ferulasäuremethylester

Verbesserungen der Ausbeute der Umesterungsreaktion könnten vorrangig durch eine Kontrolle des Wassergehaltes erzielt werden (GOLDBERG *et al.*, 1990). Dies könnte, wie unter 4.5.3 erwähnt, durch eine Umesterung in DMSO erreicht werden, wenn dazu die Esterase vorher stabilisiert wird. Durch Immobilisierungsverfahren wie Adsorption auf einem Trägermaterial, Gefriertrocknung oder Copolymerisierung in Gelen könnte eine Stabilisierung erreicht werden.

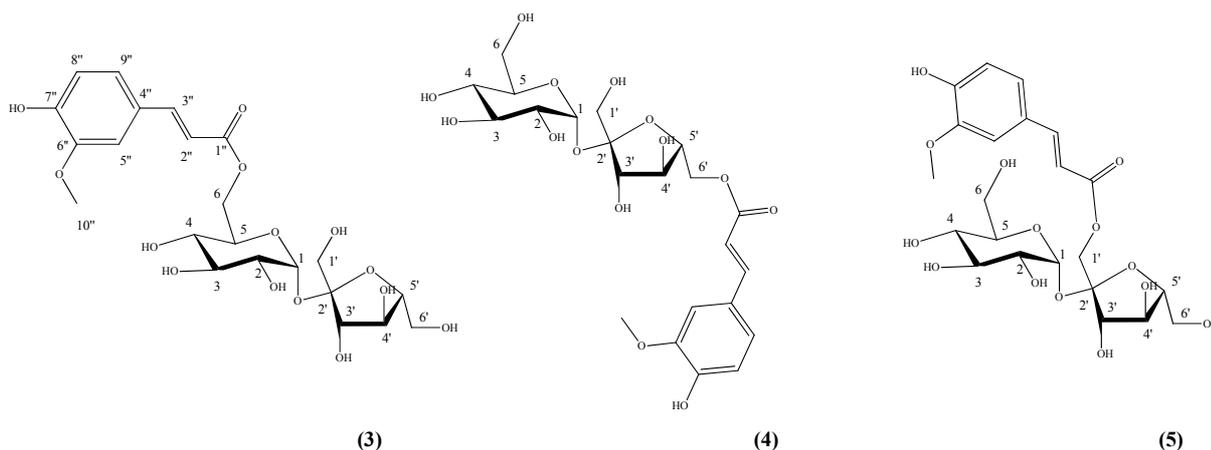
Eine andere Möglichkeit wäre die Umesterung in einem lösungsmittelfreien System. Für die Estersynthese mittels Lipasen wurde gezeigt, dass auf Zugabe eines Lösungsmittels verzichtet werden konnte (KARRA-CHAABOUNI *et al.*, 1996), wobei dabei die alkoholische Komponente als flüssige Phase diente.

Aber auch der Einsatz der Substrate als Feststoffe oder in eutektischen Mischungen mit nur minimalen Mengen an wässriger Phase, in der die Esterase enthalten ist, ist denkbar (HOBBS *et al.*, 2007). So war die enzymatische Synthese von Peptiden in Systemen möglich, bei denen nur sehr geringe Mengen an Wasser durch Kristallwasser von Salzen bereitgestellt wurde (KUHLE *et al.*, 1995). Für die Lipase B aus *Candida antarctica* wurden Umesterungen

mit Festphasensynthesen von Zuckerestern beschrieben, wenn geringe Mengen eines organischen Adjuvants verwendet wurden (CAO *et al.*, 1999).

#### 4.5.5 Strukturaufklärung des enzymatisch synthetisierten Saccharoseferulates

Anhand der Daten der Massenspektrometrie konnte die erfolgreiche Bildung des Saccharoseferulates durch Umesterung von Ferulasäuremethylester und Saccharose mittels der isolierten Esterase aus *Ganoderma applanatum* gezeigt werden (4.5.3). Mit diesen Daten war aber keine Aussage über die Verknüpfungstelle am Saccharosemolekül möglich. Da nur ein Signalpeak in den HPLC-Analysen detektiert wurde, wurde davon ausgegangen, dass die Esterase selektiv die Bildung eines einzigen Saccharoseesters katalysierte. Auf Grund der Struktur von Saccharose wurden die drei primären OH-Gruppen zunächst als potentielle Verknüpfungsstellen vermutet. Somit kamen drei mögliche Saccharoseester in Frage (Abb. 49).



**Abb. 49** Potentielle Saccharoseferulate der enzymatischen Umesterung mit der *Ganoderma* Esterase, (3) Veresterung am C6-Atom der Glucose-Einheit; (4) Veresterung am C6'-Atom der Fructose-Einheit; (5) Veresterung am C1'-Atom der Fructose-Einheit

Zur eindeutigen Identifizierung der Feruloylsaccharose wurde eine präparative enzymatische Synthese durchgeführt, um die Struktur des Produktes mittels NMR-Analysen eindeutig zu bestimmen. Die Umesterung erfolgte dabei am Optimum bei pH 6. Auf die Zugabe von weiteren Gelöststoffen wurde verzichtet, da die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass dadurch das Bildungsverhältnis von Saccharidester und freier Ferulasäure nicht verändert wird (4.5.4). Um eine verstärkte Hydrolyse zu vermeiden, wurde die Synthese bei Raumtemperatur durchgeführt.

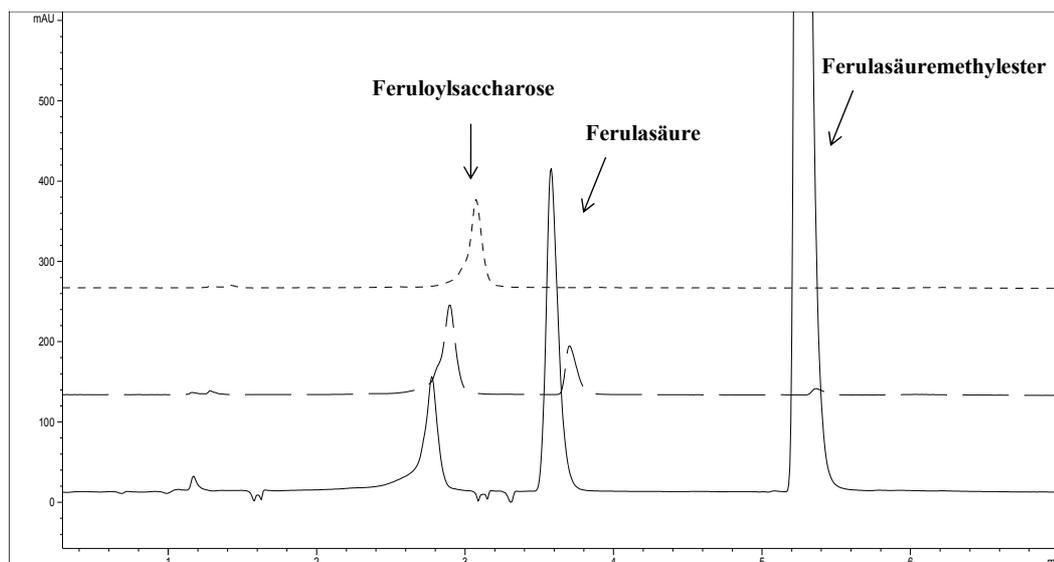


Abb. 50 HPLC-Chromatogramm der Aufreinigung von Feruloilsaccharose bei 325 nm; Ansatz vor Aufreinigung (—); Ansatz Pentan/Ether extrahiert, noch mit Ferulasäurekontamination (- - -), Ansatz Pentan/Ether extrahiert, ohne Ferulasäurekontamination (.....)

Der nicht umgesetzte Ferulasäuremethylester und die freigesetzte Ferulasäure konnte durch die Pentan/Ether-Extraktion des angesäuerten Syntheseansatzes restlos entfernt werden (Abb. 50), so dass die Abtrennung der im Überschuss vorhandenen Saccharose durch Fest-Phasen-Extraktion und spülen mit Wasser möglich war. Der Ester konnte mit Acetonitril von der C18-Phase der SPE-Kartusche eluiert und nach Eindampfen und Resolubilisierung in Deuteriumoxid für die NMR-Experimente eingesetzt werden.

### Eindimensionale NMR

Zuerst wurden eindimensionale  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Spektren aufgezeichnet. Diese zeigten deutliche Signale der Atomkerne der Ferulasäure. Die Signale des  $^1\text{H}$ -NMR mit den großen chemischen Verschiebungen zwischen  $\delta = 6,34$  ppm und  $\delta = 7,56$  ppm ließen sich den Protonen des konjugierten  $\pi$ -Systems der Ferulasäure zuordnen. Die transolefinischen Protonen waren bei  $\delta = 6,34$  ppm (1 H, *d*,  $J = 16,0$  Hz) und  $\delta = 7,56$  ppm [1 H, *d*,  $J = 16,0$  Hz] zu erkennen. Die chemischen Verschiebungen dazwischen entsprachen den Protonen des 1,2,4-trisubstituierten aromatischen Ringes [ $\delta = 7,16$  ppm (Nr. 5'': 1 H, *d*,  $J = 1,6$  Hz),  $\delta = 7,07$  ppm (Nr. 9'': 1 H, *dd*,  $J = 8,2$  1,5 Hz),  $\delta = 6,83$  ppm (Nr. 8'': 1 H, *d*,  $J = 1,6$  Hz)]. Die drei Protonen der Methoxygruppe waren als Singulett bei  $\delta = 3,78$  ppm erkennbar. Die Signale mit den kleineren chemischen Verschiebungen entsprachen den Protonen der Glucose- und Fructoseeinheit der Saccharose, wobei das Duplett-Signal bei  $\delta = 5,31$  ppm mit der kleinen Kopplungskonstante ( $J = 3,9$  Hz) durch das Proton am C-1 der Glucoseeinheit hervorgerufen wurde.

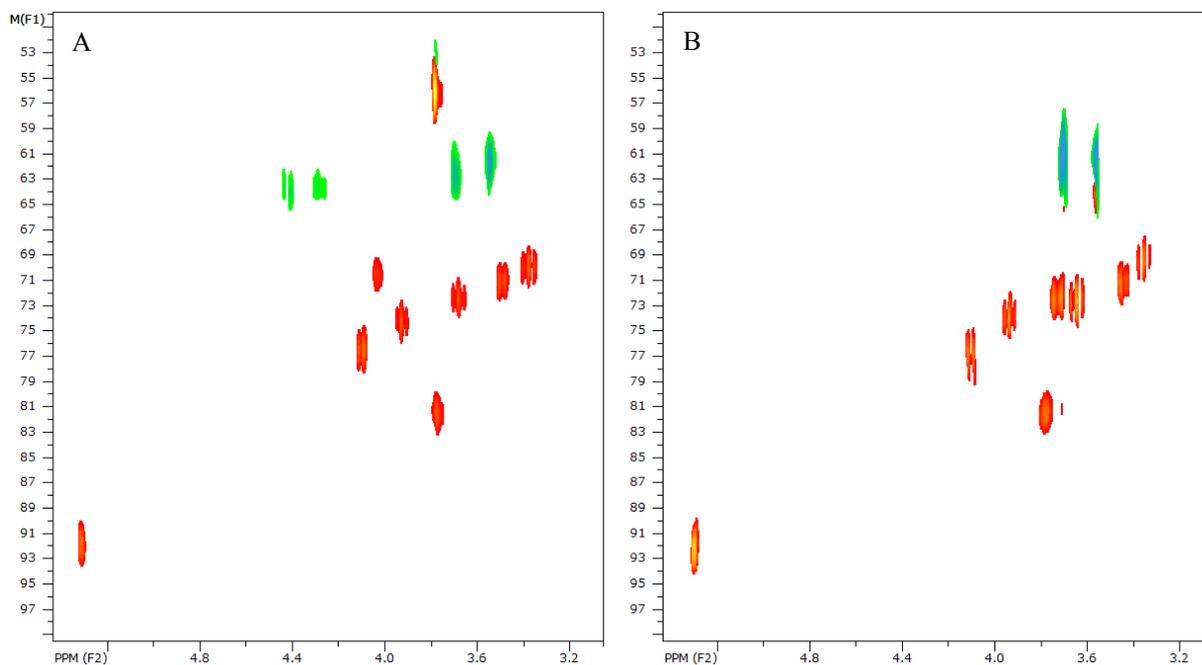
Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum wurden die zehn Signale der Ferulasäureeinheit durch die Atomkerne der Doppelbindung, des aromatischen Ringes, des Carbonylkohlenstoffes ( $\delta = 169,2 - 111,2$  ppm) und der Methoxygruppe ( $\delta = 55,8$  ppm) erzeugt. Weiterhin waren die zwölf Signale der zwei Hexosen ( $\delta = 103,6 - 61,4$  ppm) zu erkennen.

Die Interpretation der eindimensionalen NMR-Spektren bestätigte somit die Bildung und die Grundstruktur der Feruloysaccharose. Zur Identifizierung der Esterbindungstelle wurden zweidimensionale NMR-Experimente durchgeführt.

### Zweidimensionale NMR

Bei HSQC-Spektren werden Signale von direkt mit einander verbundenen, verschiedenartigen Kernen, hier  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ , aufgezeichnet. Kohlenstoffkerne mit einem oder drei gebundenen Wasserstoffkernen ergeben dabei ein positives, mit zwei gebundenen Wasserstoffkernen ein negatives und ohne gebundenen Wasserstoffkern kein Signal.

Im Vergleich der Spektren der Feruloysaccharose und unbehandelter Saccharose (Abb. 51) war deutlich die große Änderung der chemischen Verschiebung und starke Aufspaltung der Protonensignale einer  $\text{CH}_2$ -Gruppe erkennbar ( $\delta = 3,70$  ppm auf  $\delta = 4,42$  ppm und  $4,28$  ppm).



**Abb. 51** HSQC-NMR-Spektrenausschnitte der glucosyl- und fructosyl-Signale; A: Feruloysaccharose; B: Saccharose; zusätzliches Signal bei A  $\delta = 3,78/55,8$  ppm durch  $\text{CH}_3$ -Gruppe der Ferulasäure verursacht; positive Signale gelb/rot; negative Signale grün/blau

Das wies darauf hin, dass die Esterbindung an der OH-Gruppe dieses Kohlenstoffes erfolgte. Die Betrachtung des HMBC-Spektrums bestätigte dies. Bei HMBC-Experimenten werden die Korrelationen über mehrere Bindungen zwischen  $^{13}\text{C}$  und  $^1\text{H}$ -Kernen sichtbar. Es zeigte sich,

dass die Protonen der fraglichen CH<sub>2</sub>-Gruppe ( $\delta = 4,42$  und  $4,28$  ppm) jeweils ein Kreuzsignal mit dem Carbonylkohlenstoff ( $\delta = 169,2$  ppm) der Ferulasäure ausbildete. Somit wurde einer der drei postulierten Ester (Abb. 49) synthetisiert.

Bei genauer Analyse der Multiplizität der <sup>1</sup>H-Signale der CH<sub>2</sub>-Gruppe zeigte sich, dass es sich bei beiden Protonensignalen jeweils um ein Duplett vom Duplett handelte (Abb. 52). Daher konnte die Feruloylsaccharose mit der Veresterung am C1' der Fructoseeinheit (Abb. 49 (5)) ausgeschlossen werden. Denn die Protonen am C1' können nicht diese Kopplung aufweisen, da es sich beim benachbarten C2' um ein quartäres Kohlenstoffatom ohne gebundene Protonen handelt.

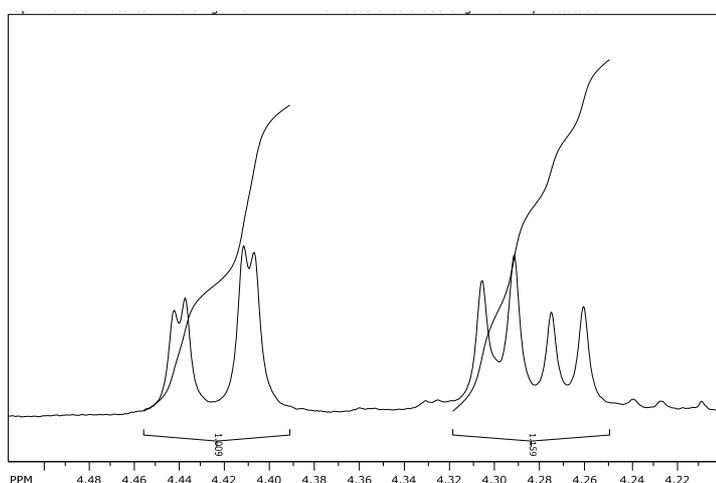


Abb. 52 Ausschnitt aus 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR Spektrum der Feruloylsaccharose mit Signalen der CH<sub>2</sub>-Gruppe der Esterbindung

Zur Unterscheidung, ob es sich bei dem synthetisierten Ester um eine Veresterung am C6 der Glucoseeinheit oder eine Veresterung am C6' der Fructoseeinheit handelte, wurde ein 2D- und ein selektives 1D-TOCSY-Experiment durchgeführt.

Beim 2D-TOCSY werden Kreuzsignale von miteinander korrelierenden Protonen erhalten, die demselben koppelnden Spin-System angehören. Die Auswertung zeigte, dass das Proton am C1 dem gleichen Spinsystem angehörte wie die Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe mit der Esterbindung. Es traten bei den chemischen Verschiebungen  $\delta = 3,38$  ppm,  $3,69$  ppm und  $4,03$  ppm jeweils Kreuzsignale mit den Signalen des Protons am C1 ( $\delta = 5,31$  ppm) und der Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe ( $\delta = 4,42$  und  $4,28$  ppm) auf.

Eindeutig konnte die Zugehörigkeit zum selben Spin-System durch das 1D-TOCSY-Experiment nachgewiesen werden. Dabei wird ein ausgewähltes, bekanntes Proton selektiv angeregt. Innerhalb des Spin-Systems wird dann die Polarisierung auf alle anderen Protonen übertragen. So können alle <sup>1</sup>H-Signale eines koppelnden Spin-Systems aufgezeichnet werden. Es wurden sowohl das Proton am C1, als auch die beiden Protonen der CH<sub>2</sub>-Gruppe angeregt,

und in allen drei erhaltenen Spektren konnten die jeweiligen Signale aufgezeichnet werden. Daher handelte es sich bei dem synthetisierten Ester um 6-O-Feruloyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranosid.

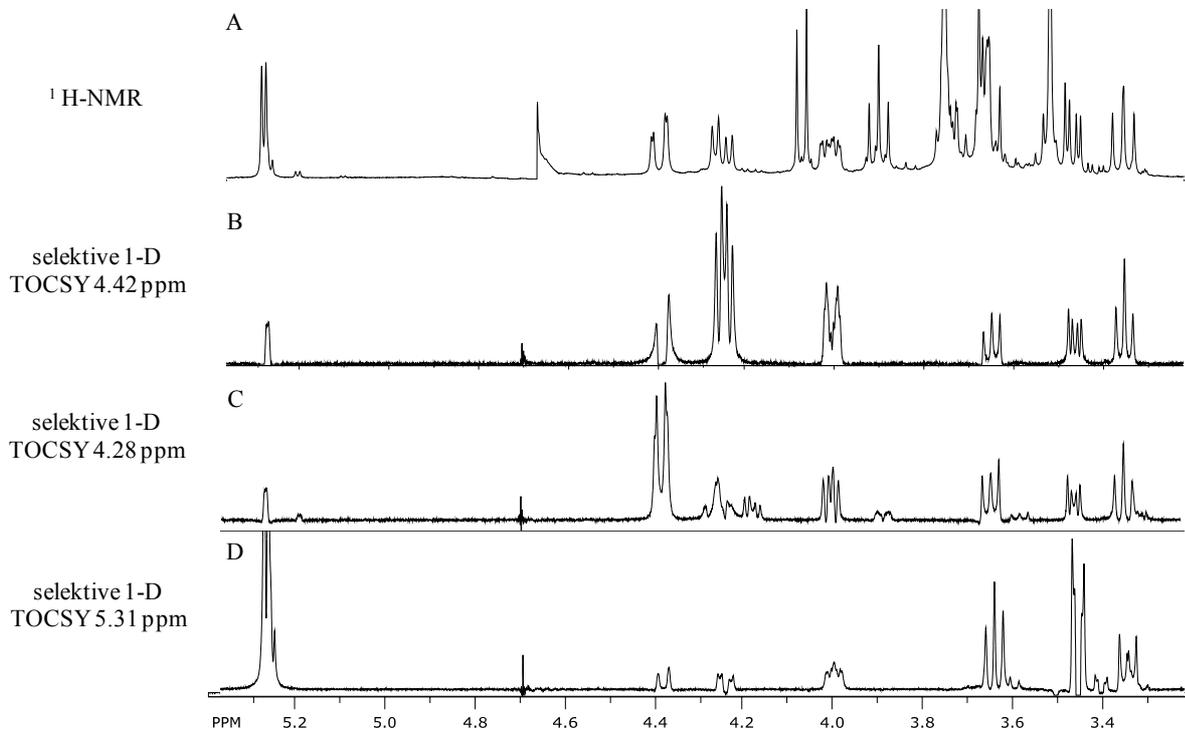


Abb. 53  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrenauschnitte des 6-O-Feruloyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranosid; A: 400 MHz  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, nur glucosyl- und fructosyl-Signalauschnitt; B–D: 500 MHz  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren mit Anregung der selektiven Resonanzen

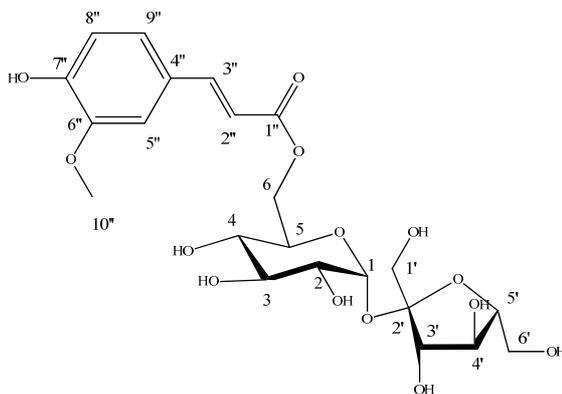


Abb. 54 Struktur des synthetisierten 6-O-Feruloyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-fructofuranosid

Tab. 18 chemische Verschiebung ( $\delta$ ) der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale der 6-O-Feruloylsaccharose

	$^1\text{H}$ -NMR $\delta$ [ppm]; Multiplizität; J [Hz]	$^{13}\text{C}$ -NMR $\delta$ [ppm]
Glucose		
1	5,31 (1H; <i>d</i> ; 3,9)	91,8
2	3,49 (1H; <i>dd</i> ; 10,0; 3,9)	70,9
3	3,69 (1H; <sup>a</sup> )	72,3
4	3,38 (1H; <i>t</i> ; 9,7)	69,7
5	4,03 (1H; <sup>a</sup> )	70,4
6	4,42 (1H; <i>dd</i> ; 12,3; 1,9) 4,28 (1H; <i>dd</i> ; 12,3; 5,7)	63,6
Fructose		
1'	3,55 (2H; <i>d</i> ; 1,0)	61,4
2'		103,6
3'	4,10 (1H; <i>d</i> ; 8,8)	76,3
4'	3,93 (1H; <i>t</i> ; 8,6)	74,2
5'	3,76 (1H; <sup>a</sup> )	81,3
6'	3,69 (2H; <sup>a</sup> )	62,7
6-Feruloyl		
1''		169,2
2''	6,34 (1H; <i>d</i> ; 16,0)	114,1
3''	7,56 (1H; <i>d</i> ; 16,0)	146,4
4''		126,8
5''	7,16 (1H; <i>d</i> ; 1,6)	111,2
6''		147,6
7''		147,8
8''	6,83 (1H; <i>d</i> ; 8,2)	115,6
9''	7,07 (1H; <i>dd</i> ; 8,2; 1,5)	123,4
10''	3,78 (3H; <i>s</i> )	55,8

<sup>a</sup> Multiplizität Aufgrund von Signalüberlagerungen nicht bestimmt

Dies ist die erste beschriebene Synthese dieses Saccharoseesters überhaupt. Bisher wurde 6-O-Feruloylsaccharose in Pflanzen, bzw. Pflanzenteilen wie *Beta vulgaris* (BOKERN *et al.*, 1991), *Polygala arillata* (KOBAYASHI *et al.*, 2000) oder Reiskleie (TIAN *et al.*, 2004) nachgewiesen und daraus isoliert. Dabei wurde der Fokus auf die möglicherweise medizinisch wirksamen antioxidativen Eigenschaften von Ferulasäurederivaten gelegt. Die NMR-Daten des hier synthetisierten Esters sind mit denen in der Literatur angegebenen übereinstimmend.

Die enzymatische Synthese von strukturähnlichen Ferulasäureestern wurde bisher nur für Arabinose und Arabinobiose dokumentiert (TOPAKAS *et al.*, 2005b; VAFIADI *et al.*, 2006a). Die Umsetzung erfolgte in Mikroemulsionen, bei denen organische Lösungsmittel die kontinuierliche Phase darstellten. Der Wassergehalt betrug dabei maximal 5 %. Die Umesterung in einem rein wässrigen System wurde nur für Monosaccharide mit dem kommerziellen Esterasepräparat „Amano PL“ beschrieben (TSUCHIYAMA *et al.*, 2006). Dabei fand keine Isolierung und Strukturanalyse der synthetisierten Saccharidester statt. Außerdem

konnte unter Verwendung des durch *Aspergillus niger* produzierten Enzympräparates keine Veresterung von Disacchariden wie Maltose und Saccharose beobachtet werden.

Generell ist die Synthese des 6-O-Feruloylsaccharoseesters durch die aus *Ganoderma applanatum* isolierte Esterase die erste Beschreibung einer Estersynthese unter Verwendung einer aus Basidiomyceten isolierten Esterase.

Der Einsatz zur Veresterung von Ferulasäure an Polysaccharide bedarf fortführender Studien. Die Bindungsstelle am C6 der Glucoseeinheit bietet dabei die potentielle Möglichkeit der Veresterung an Polysacchariden, wenn bei deren Monomerbausteinen diese Position zugänglich ist. Eine Möglichkeit wäre beispielsweise die Modifikation von Stärke oder Galactomannanen und anschließende Quervernetzung durch Laccasebehandlung (vgl. 4.1), wobei sich die Eigenschaften der entstehenden Netzwerke durch die Anzahl an eingebundenen phenolischen Resten steuern ließen. Die prinzipielle Möglichkeit der Variation der Geleigenschaften, wie Gelierungsdauer und Speichermodul, wurde anhand Tyramin modifizierter Dextran/Hyaluronsäure-Hybrid-Polysaccharide unter Verwendung der Meerrettichperoxidase durch den Grad der Substitution mit Tyraminresten gezeigt (JIN *et al.*, 2010).

## 5 Ausblick

Es wurde die Fähigkeit der Laccase Lcc1 zur oxidativen Quervernetzung von Polysacchariden und Proteinen gezeigt. Die Laccase sollte neben der Verwendung zur Quervernetzung von Polysacchariden zur Gelbildung oder Teigverbesserung auch zum *Crosslinking* von Proteinen eingesetzt werden. Durch die Fähigkeit zur Oxidation von Aminosäureseitenketten wäre die Laccase-Behandlung von Milchprodukten zur Stabilisierung und Festigung vorstellbar.

Mit der aus *Pleurotus sapidus* isolierten Esterase sollten fortführende Studien zum Einsatz zur reversen Hydrolyse von Ferulasäureestern durchgeführt werden. Aufgrund der dargestellten guten Substratspezifität gegenüber den Feruloylarabinoseestern wäre die Esterase dafür gut geeignet, wenn eine Lösung für das Problem der Enzymkonzentrierung gefunden wird. Ein Ansatz wäre die rekombinante Produktion.

Für die Esterase aus *Ganoderma applanatum* sollte aufbauend auf den bestimmten Partialpeptidsequenzen die gesamte Gensequenz ermittelt werden. Dadurch wäre eine genauere Einordnung in die Esterase/Lipase Familie durchführbar und die grundlegende Möglichkeit zur heterologen Expression gegeben. Außerdem wären Untersuchungen bezüglich der Induktion der Esteraseproduktion sinnvoll. Dies würde die Isolierung

---

erleichtern und die Ausbeute an aktivem Enzym erhöhen. Mit diesem wären anschließende Studien zur reversen Hydrolyse und Modifikation von Oligo- und Polysacchariden möglich. Ein Einsatz in eutektischen Systemen, auch unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln wie DMSO, ist nach Stabilisierung der Esterase denkbar.

## 6 Literaturverzeichnis

Allerdings E, Ralph J, Steinhart H, Bunzel M (2006): Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran. *Phytochemistry*, 67 (12), 1276-1286.

Baldrian P (2006): Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30 (2), 215-242.

Barberousse H, Roiseux O, Robert C, Paquot M, Deroanne C, Blecker C (2008): Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. *J. Sci. Food Agric.*, 88 (9), 1494-1511.

Benoit I, Navarro D, Marnet N, Rakotomanomana N, Lesage-Meessen L, Sigoillot J-C, Asther M, Asther M (2006): Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydr. Res.*, 341 (11), 1820-1827.

Benoit I, Danchin E, Bleichrodt R-J, De Vries R (2008): Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnol. Lett.*, 30 (3), 387-396.

Biely P, Mastihubová M, Van Zyl W H, Prior B A (2002): Differentiation of feruloyl esterases on synthetic substrates in [alpha]-arabinofuranosidase-coupled and ultraviolet-spectrophotometric assays. *Anal. Biochem.*, 311 (1), 68-75.

Blum D L, Kataeva I A, Li X-L, Ljungdahl L G (2000): Feruloyl Esterase Activity of the *Clostridium thermocellum* Cellulosome Can Be Attributed to Previously Unknown Domains of XynY and XynZ. *J. Bacteriol.*, 182 (5), 1346-1351.

Bokern M, Heuer S, Wray V, Witte L, Macek T, Vanek T, Strack D (1991): Ferulic acid conjugates and betacyanins from cell cultures of *Beta vulgaris*. *Phytochemistry*, 30 (10), 3261-3265.

Bollag J-M, Leonowicz A (1984): Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48 (4), 849-854.

Bönisch M P, Huss M, Lauber S, Kulozik U (2007): Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. *Food Hydrocoll.*, 21 (4), 585-595.

Bonnarme P, Delattre M, Drouet H, Corrieu G, Asther M (1993): Toward a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated vessels: Evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 41 (4), 440-450.

Bornscheuer U T, Kazlauskas R J (2006). *Hydrolases in Organic Synthesis, Regio- and Stereoselective Biotransformations*. 2nd, Weinheim, Wiley-VCH.

Brenner S (1988): The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature*, 334 (6182), 528-530.

Cao L, Bornscheuer U T, Schmid R D (1999): Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 6 (3), 279-285.

Carvajal-Millan E, Landillon V, Morel M-H, Rouau X, Doublier J-L, Micard V (2005): Arabinoxylan Gels: Impact of the Feruloylation Degree on Their Structure and Properties. *Biomacromolecules*, 6 (1), 309-317.

Chouiter R, Roy I, Bucke C (2008): Optimisation of [beta]-glucuronidase production from a newly isolated *Ganoderma applanatum*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 50 (2-4), 114-120.

Couto J, Karboune S, Mathew R (2010): Regioselective synthesis of feruloylated glycosides using the feruloyl esterases expressed in selected commercial multi-enzymatic preparations as biocatalysts. *Biocatal. Biotransform.*, 28 (4), 235-244.

De Guzman D (2008): Hydrocolloids price under pressure. *ICIS Chemical Business*, 273 (4), 38-39.

Dinis M J, Bezerra R M F, Nunes F, Dias A, Guedes C V, Ferreira L M M, Cone J W, Marques G S M, Barros A R N, Rodrigues M A M (2009): Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.*, 100 (20), 4829-4835.

Donaghy J, McKay M (1997): Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum*. *J. Appl. Microbiol.*, 83 (6), 718-726.

Donaghy J A, Bronnenmeier K, Soto-Kelly P F, McKay M (2000): Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*. *J. Appl. Microbiol.*, 88 (3), 458-466.

Dondero M, Figueroa V, Morales X, Curotto E (2006): Transglutaminase effects on gelation capacity of thermally induced beef protein gels. *Food Chem.*, 99 (3), 546-554.

Donnelly P K, Crawford D L (1988): Production by *Streptomyces viridosporus* T7A of an Enzyme Which Cleaves Aromatic Acids from Lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (9), 2237-2244.

Duran N, Esposito E (2000): Potential applications of oxidative enzymes and phenol oxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal., B*, 28 (2), 83-99.

Eigel W N, Butler J E, Ernstrom C A, Farrell H M, Harwalkar V R, Jenness R, Whitney R M (1984): Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision1. *J. Dairy Sci.*, 67 (8), 1599-1631.

Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Kharziani T, Kvesitadze G (2008): *Lentinus edodes* and *Pleurotus species* lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresour. Technol.*, 99 (3), 457-462.

Ercili Cura D, Lantto R, Lille M, Andberg M, Kruus K, Buchert J (2009): Laccase-aided protein modification: Effects on the structural properties of acidified sodium caseinate gels. *Int. Dairy J.*, 19 (12), 737-745.

Evans C S, Gallagher I M, Atkey P T, Wood D A (1991): Localisation of degradative enzymes in white-rot decay of lignocellulose. *Biodegradation*, 2 (2), 93-106.

Faulds C B, Williamson G (1994): Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology*, 140 (4), 779-787.

Faulds C B, Pérez-Boada M, Martínez Á T (2011): Influence of organic co-solvents on the activity and substrate specificity of feruloyl esterases. *Bioresour. Technol.*, 102 (8), 4962-4967.

Fazary A E, Ju Y-H (2007): Feruloyl Esterases as Biotechnological Tools: Current and Future Perspectives. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 39 (11), 811-828.

Fazary A E, Ju Y H (2008): Production, partial purification and characterization of feruloyl esterase by *Aspergillus awamori* in submerged fermentation. *Biotechnol. J.*, 3 (9-10), 1264-1275.

- Fazenda M L, Harvey L M, Mcneil B (2010): Effects of dissolved oxygen on fungal morphology and process rheology during fed-batch processing of *Ganoderma lucidum*. J. Microbiol. Biotechnol., 20 (4), 844-851.
- Figueroa-Espinoza M-C, Morel M-H L N, Rouau X (1998): Effect of Lysine, Tyrosine, Cysteine, and Glutathione on the Oxidative Cross-Linking of Feruloylated Arabinoxylans by a Fungal Laccase. J. Agric. Food Chem., 46 (7), 2583-2589.
- Figueroa-Espinoza M-C, Morel M-H, Surget A, Rouau X (1999): Oxidative crosslinking of wheat arabinoxylans by manganese peroxidase. Comparison with laccase and horseradish peroxidase. Effect of cysteine and tyrosine on gelation. J. Sci. Food Agric., 79 (3), 460-463.
- Flander L, Rouau X, Morel M-H, Autio K, Seppanen-Laakso T, Kruus K, Buchert J (2008): Effects of laccase and xylanase on the chemical and rheological properties of oat and wheat doughs. J. Agric. Food Chem., 56 (14), 5732-5742.
- Fonseca M I, Shimizu E, Zapata P D, Villalba L L (2010): Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). Enzyme. Microb. Technol., 46 (6), 534-539.
- Fukushima Y, Kirk T K (1995): Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. Appl. Environ. Microbiol., 61 (3), 872-876.
- Gais H-J, Theil F (2002). Hydrolysis and Formation of Carboxylic Acid Esters. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Drauz K and Waldmann H. Weinheim, Wiley-VCH. 2: 335-578.
- Ge J, Lu D, Wang J, Liu Z (2009): Lipase Nanogel Catalyzed Transesterification in Anhydrous Dimethyl Sulfoxide. Biomacromolecules, 10 (6), 1612-1618.
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G (2010): Laccases: a never-ending story. Cell. Mol. Life Sci., 67 (3), 369-385.
- Giuliani S, Piana C, Setti L, Hochkoeppler A, Pifferi P G, Williamson G, Faulds C B (2001): Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. Biotechnol. Lett., 23 (4), 325-330.
- Goldberg M, Thomas D, Legoy M-D (1990): Water activity as a key parameter of synthesis reactions: The example of lipase in biphasic (liquid/solid) media. Enzyme. Microb. Technol., 12 (12), 976-981.

Gorska E B, Russel S, Czakaj J, Krakowiak A, Ryszka L (2004): Use of straw as an inductor of laccase production by white-rot fungi in liquid medium. Pr. Inst. Lab. Badaw. Przem. Spozyw., 59 83-93.

Hammer G F (1998): Mikrobielle Transglutaminase und Diphosphat bei feinzerkleinerter Brühwurst. Fleischwirtschaft, 78 (11), 1155-1162.

Hashimoto K, Kaneko S, Yoshida M (2010): Extracellular Carbohydrate Esterase from the Basidiomycete *Coprinopsis cinerea* Released Ferulic and Acetic Acids from Xylan. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74 (8), 1722-1724.

Hermoso J A, Sanz-Aparicio J, Molina R, Juge N, González R, Faulds C B (2004): The Crystal Structure of Feruloyl Esterase A from *Aspergillus niger* Suggests Evolutive Functional Convergence in Feruloyl Esterase Family. J. Mol. Biol., 338 (3), 495-506.

Herskovits T T, Sister M S (1968): Studies of the location of tyrosyl and tryptophanyl residues in protein. II. Applications of model data to solvent perturbation studies of proteins rich in both tyrosine and tryptophan. Biochemistry, 7 (7), 2533-2542.

Hobbs H R, Thomas N R (2007): Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and under Solvent-Free Conditions. Chem. Rev., 107 (6), 2786-2820.

Hoseney R C, Faubion J M (1981): A Mechanism for the Oxidative Gelation of Wheat Flour Water-Soluble Pentosans. Cereal Chem., 58 (5), 421 - 423.

Husain Q (2006): Potential applications of the oxidoreductive enzymes in the decolorization and detoxification of textile and other synthetic dyes from polluted water: a review. Crit. Rev. Biotechnol., 26 (4), 201-221.

Jiménez-Tobon G A, Penninckx M J, Lejeune R (1997): The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture. Enzyme. Microb. Technol., 21 (7), 537-542.

Jin R, Moreira Teixeira L S, Dijkstra P J, Van Blitterswijk C A, Karperien M, Feijen J (2010): Enzymatically-crosslinked injectable hydrogels based on biomimetic dextran-hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering. Biomaterials, 31 (11), 3103-3113.

Karra-Chaabouni M, Pulvin S, Touraud D, Thomas D (1996): Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases. Biotechnol. Lett., 18 (9), 1083-1088.

- Kobayashi W, Miyase T, Suzuki S, Noguchi H, Chen X-M (2000): Oligosaccharide Esters from the Roots of *Polygala arillata*. *J. Nat. Prod.*, 63 (8), 1066-1069.
- Kroon P A, Williamson G, Fish N M, Archer D B, Belshaw N J (2000): A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *Eur. J. Biochem.*, 267 (23), 6740-6752.
- Kuhl P, Elchhorn U, Jakubke H D (1995): Enzymic peptide synthesis in microaqueous, solvent-free systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 45 (3), 276-278.
- Kupriyanovich Y, Medvedeva S, Rokhin A, Kanitskaya L (2007): Regioselectivity of ferulic acid polymerization catalyzed by oxidases. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 33 (5), 516-522.
- Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y (2001): Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Rev. Int.*, 17 (2), 221 - 246.
- Kurisawa M, Chung J E, Yang Y Y, Gao S J, Uyama H (2005): Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid-tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chem. Commun.*, (34), 4312-4314.
- Kuuva T, Lantto R, Reinikainen T, Buchert J, Autio K (2003): Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocoll.*, 17 (5), 679-684.
- Labat E, Morel M H, Rouau X (2000): Effects of Laccase and Ferulic Acid on Wheat Flour Doughs. *Cereal Chem.*, 77 (6), 823-828.
- Labat E, Morel M H, Rouau X (2001): Effect of laccase and manganese peroxidase on wheat gluten and pentosans during mixing. *Food Hydrocoll.*, 15 (1), 47-52.
- Lantto R, Puolanne E, Kalkkinen N, Buchert J, Autio K (2005): Enzyme-Aided Modification of Chicken-Breast Myofibril Proteins: Effect of Laccase and Transglutaminase on Gelation and Thermal Stability. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (23), 9231-9237.
- Laszlo J A, Compton D L, Eller F J, Taylor S L, Isbell T A (2003): Packed-bed bioreactor synthesis of feruloylated monoacyl- and diacylglycerols: clean production of a "green" sunscreen. *Green Chem.*, 5 (4), 382-386.

Lauber S, Henle T, Klostermeyer H (2000): Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *Eur. Food Res. Technol.*, 210 (5), 305-309.

Lee F, Chung J E, Kurisawa M (2008): An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid-tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate. *Soft Matter*, 4 (4), 880-887.

Linke D, Nimtz M, Berger R, Zorn H (2009): Separation of Extracellular Esterases from Pellet Cultures of the Basidiomycete *Pleurotus sapidus* by Foam Fractionation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86 (5), 437-444.

Mackenzie C R, Bilous D (1988): Ferulic Acid Esterase Activity from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (5), 1170-1173.

Marmuse L, Asther M, Fabre E, Navarro D, Lesage-Meessen L, Asther M, O'donohue M, Fort S, Driguez H (2008): New chromogenic substrates for feruloyl esterases. *Org. Biomol. Chem.*, 6 (7), 1208-1214.

Mastihubová M, Szemesová J, Biely P (2003): Two efficient ways to 2-O- and 5-O-feruloylated 4-nitrophenyl [ $\alpha$ ]-L-arabinofuranosides as substrates for differentiation of feruloyl esterases. *Tetrahedron Lett.*, 44 (8), 1671-1673.

Mastihubová M, Mastihuba V, Bilanicová D, Boreková M (2006): Commercial enzyme preparations catalyse feruloylation of glycosides. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 38 (1), 54-57.

Matsuo T, Kobayashi T, Kimura Y, Tsuchiyama M, Oh T, Sakamoto T, Adachi S (2008): Synthesis of glyceryl ferulate by immobilized ferulic acid esterase. *Biotechnol. Lett.*, 30 (12), 2151-2156.

Mattinen M-L, Kruus K, Buchert J, Nielsen J H, Andersen H J, Steffensen C L (2005): Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides. *FEBS J.*, 272 (14), 3640-3650.

Mattinen M-L, Hellman M, Permi P, Autio K, Kalkkinen N, Buchert J (2006): Effect of Protein Structure on Laccase-Catalyzed Protein Oligomerization. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (23), 8883-8890.

Mayer a M, Staples R C (2002): Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60 (6), 551-565.

Mcauley K E, Svendsen A, Patkar S A, Wilson K S (2004): Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60 (5), 878-887.

Messerschmidt A (1997). *Multi-Copper Oxidases*. Singapore, World Scientific.

Mezger T G (2010). *Das Rheologie Handbuch*. 3. überarb. Aufl., Hannover, Vincentz Network.

Micard V, Thibault J F (1999): Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins. *Carbohydr. Polym.*, 39 (3), 265-273.

Moukoui M, Topakas E, Christakopoulos P (2008): Cloning, characterization and functional expression of an alkalitolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 79 (2), 245-254.

Ng A, Greenshields R N, Waldron K W (1997): Oxidative cross-linking of corn bran hemicellulose: formation of ferulic acid dehydrodimers. *Carbohydr. Res.*, 303 (4), 459-462.

Norsker M, Jensen M, Adler-Nissen J (2000): Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocoll.*, 14 (3), 237-243.

Ogushi Y, Sakai S, Kawakami K (2007): Synthesis of enzymatically-gellable carboxymethylcellulose for biomedical applications. *J. Biosci. Bioeng.*, 104 (1), 30-33.

Oosterveld A, Grabber J H, Beldman G, Ralph J, Voragen a G J (1997): Formation of ferulic acid dehydrodimers through oxidative cross-linking of sugar beet pectin. *Carbohydr. Res.*, 300 (2), 179-181.

Panagiotou G, Olavarria R, Olsson L (2007): *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. *J. Biotechnol.*, 130 (3), 219-228.

Parker M L, Ng A, Waldron K W (2005): The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. *Avalon*) grains. *J. Sci. Food Agric.*, 85 (15), 2539-2547.

Pedersen N R, Halling P J, Pedersen L H, Wimmer R, Matthiesen R, Veltman O R (2002): Efficient transesterification of sucrose catalysed by the metalloprotease thermolysin in dimethylsulfoxide. *FEBS Lett.*, 519 (1-3), 181-184.

- Pedersen N R, Kristensen J B, Bauw G, Ravoo B J, Darcy R, Larsen K L, Pedersen L H (2005): Thermolysin catalyses the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16 (3), 615-622.
- Phillips G O, Williams P A, Editors (2000). *Handbook of Hydrocolloids*. Cambridge, UK, Woodhead Publ Ltd.
- Rodgers C J, Blanford C F, Giddens S R, Skamnioti P, Armstrong F A, Gurr S J (2009): Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends Biotechnol.*, 28 (2), 63-72.
- Rombouts F M, Thibault J-F (1986): Feruloylated pectic substances from sugar-beet pulp. *Carbohydr. Res.*, 154 (1), 177-187.
- Rosazza J P N, Huang Z, Dostal L, Volm T, Rousseau B (1995): Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 15 (6), 457-471.
- Ruel K, Joseleau J-P (1991): Involvement of an Extracellular Glucan Sheath during Degradation of Populus Wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (2), 374-384.
- Rumbold K, Gübitz G, Prior Bernard A (2004). *Microbial Feruloyl Esterases. Lignocellulose Biodegradation*. Washington, DC, USA, American Chemical Society. 889: 255-270.
- Sakai S, Kawakami K (2007): Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically cross-linkable alginate. *Acta Biomater.*, 3 (4), 495-501.
- Sakai S, Hirose K, Taguchi K, Ogushi Y, Kawakami K (2009): An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 30 (20), 3371-3377.
- Sancho A I, Faulds C B, Bartolomé B, Williamson G (1999): Characterisation of feruloyl esterase activity in barley. *J. Sci. Food Agric.*, 79 (3), 447-449.
- Schmidt G, Linke D, Krings U, Köhler P, Berger R G (2009). Speisepilze als neue Quelle für Oxidoreduktasen zur Backwarenherstellung. Erfolgsmodell Industrielle Gemeinschaftsforschung, Forschungskreis der Ernährungsindustrie, Bonn: 99-100.
- Schmidt G, Krings U, Nimtze M, Berger R G (2011): submitted: A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus*.

Seisun D (2010). Introduction. Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents. Imeson A. West-Sussex, UK, Wiley-Blackwell: 1-10.

Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, Hopia A, Autio K (2006): Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *J. Cereal Sci.*, 43 (2), 152-159.

Selinheimo E, Autio K, Kruus K, Buchert J (2007): Elucidating the Mechanism of Laccase and Tyrosinase in Wheat Bread Making. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (15), 6357-6365.

Sethuraman A, Akin D E, Eriksson K E L (1999): Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52 (5), 689-697.

Seviour R J, Stasinopoulos S J, Auer D P F, Gibbs P A (1992): Production of Pullulan and other Exopolysaccharides by Filamentous Fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 12 (3), 279-298.

Shalaby A R (1996): Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.*, 29 (7), 675-690.

Shin H-D, Chen R R (2006): Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme. Microb. Technol.*, 38 (3-4), 478-485.

Shin H-D, Chen R (2007): A type B feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* with broad pH applicability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73 (6), 1323-1330.

Solomon E I, Sundaram U M, Machonkin T E (1996): Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.*, 96 (7), 2563-2606.

Songulashvili G, Elisashvili V, Wasser S P, Nevo E, Hadar Y (2007): Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme. Microb. Technol.*, 41 (1-2), 57-61.

Sprecher E (1959): Über die Guttation bei Pilzen. *Planta*, 53 (6), 565-574.

Steffensen C L, Andersen M L, Degn P E, Nielsen J H (2008): Cross-Linking Proteins by Laccase-Catalyzed Oxidation: Importance Relative to Other Modifications. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (24), 12002-12010.

- Sun A, Faulds C B, Bamforth C W (2005): Barley Contains Two Cationic Acetylxyylan Esterases and One Anionic Feruloyl Esterase. *Cereal Chem.*, 82 (6), 621-625.
- Tabka M G, Herpoël-Gimbert I, Monod F, Asther M, Sigoillot J C (2006): Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme. Microb. Technol.*, 39 (4), 897-902.
- Tharanathan R N (2005): Starch – Value Addition by Modification. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 45 (5), 371 - 384.
- Thurston C F (1994): The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140 (1), 19-26.
- Tian S, Nakamura K, Kayahara H (2004): Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (15), 4808-4813.
- Topakas E, Christakopoulos P, Faulds C B (2005a): Comparison of mesophilic and thermophilic feruloyl esterases: Characterization of their substrate specificity for methyl phenylalkanoates. *J. Biotechnol.*, 115 (4), 355-366.
- Topakas E, Vafiadi C, Stamatis H, Christakopoulos P (2005b): *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme. Microb. Technol.*, 36 (5-6), 729-736.
- Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P (2007): Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochem.*, 42 (4), 497-509.
- Towle G A, Christensen O (1973). *Pectin. Industrial gums* 2nd ed. Whistler R. New York, Academic Press.
- Townend R, Herskovits T T, Timasheff S N, Gorbunoff M J (1969): State of amino acid residues in beta-lactoglobulin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 129 (2), 567-580.
- Tsuchiyama M, Sakamoto T, Fujita T, Murata S, Kawasaki H (2006): Esterification of ferulic acid with polyols using a ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1760 (7), 1071-1079.
- Tsuchiyama M, Sakamoto T, Tanimori S, Murata S, Kawasaki H (2007): Enzymatic Synthesis of Hydroxycinnamic Acid Glycerol Esters Using Type A Feruloyl Esterase from *Aspergillus niger*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (10), 2606-2609.

Vafiadi C, Topakas E, Christakopoulos P (2006a): Regioselective esterase-catalyzed feruloylation of L-arabinobiose. *Carbohydr. Res.*, 341 (12), 1992-1997.

Vafiadi C, Topakas E, Christakopoulos P, Faulds C B (2006b): The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: Determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsFaeC. *J. Biotechnol.*, 125 (2), 210-221.

Venkatadri R, Irvine R L (1990): Effect of Agitation on Ligninase Activity and Ligninase Production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (9), 2684-2691.

Wang X, Geng X, Egashira Y, Sanada H (2004): Purification and Characterization of a Feruloyl Esterase from the Intestinal Bacterium *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (4), 2367-2372.

Wessels J G H, Kreger D R, Marchant R, Regensburg B A, De Vries O M H (1972): Chemical and morphological characterization of the hyphal wall surface of the basidiomycete *Schizophyllum Commune*. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 273 (2), 346-358.

Widsten P, Kandelbauer A (2008): Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microb. Technol.*, 42 (4), 293-307.

Will R K, Löchner U, Yokose K (2007). Chemical Industries Newsletter  
A monthly compilation of SRIC report abstracts and news. CEH Marketing Research Report Abstracts, SRI Consulting, IHS Inc.

Will R K, Löchner U, Yokose K (2010). Hydrocolloids. Chemical Economics Handbook, SRI Consulting, IHS, Inc.

Wong D (2006): Feruloyl esterase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 133 (2), 87-112.

Wurzburg O B, Ed. (1986). Modified starches: Properties and uses. Boca Raton, FL USA, CRC Press.

Xu F (1996): Oxidation of Phenols, Anilines, and Benzenethiols by Fungal Laccases: Correlation between Activity and Redox Potentials as Well as Halide Inhibition. *Biochemistry*, 35 (23), 7608-7614.

Xu F (1997): Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.*, 272 (2), 924-928.

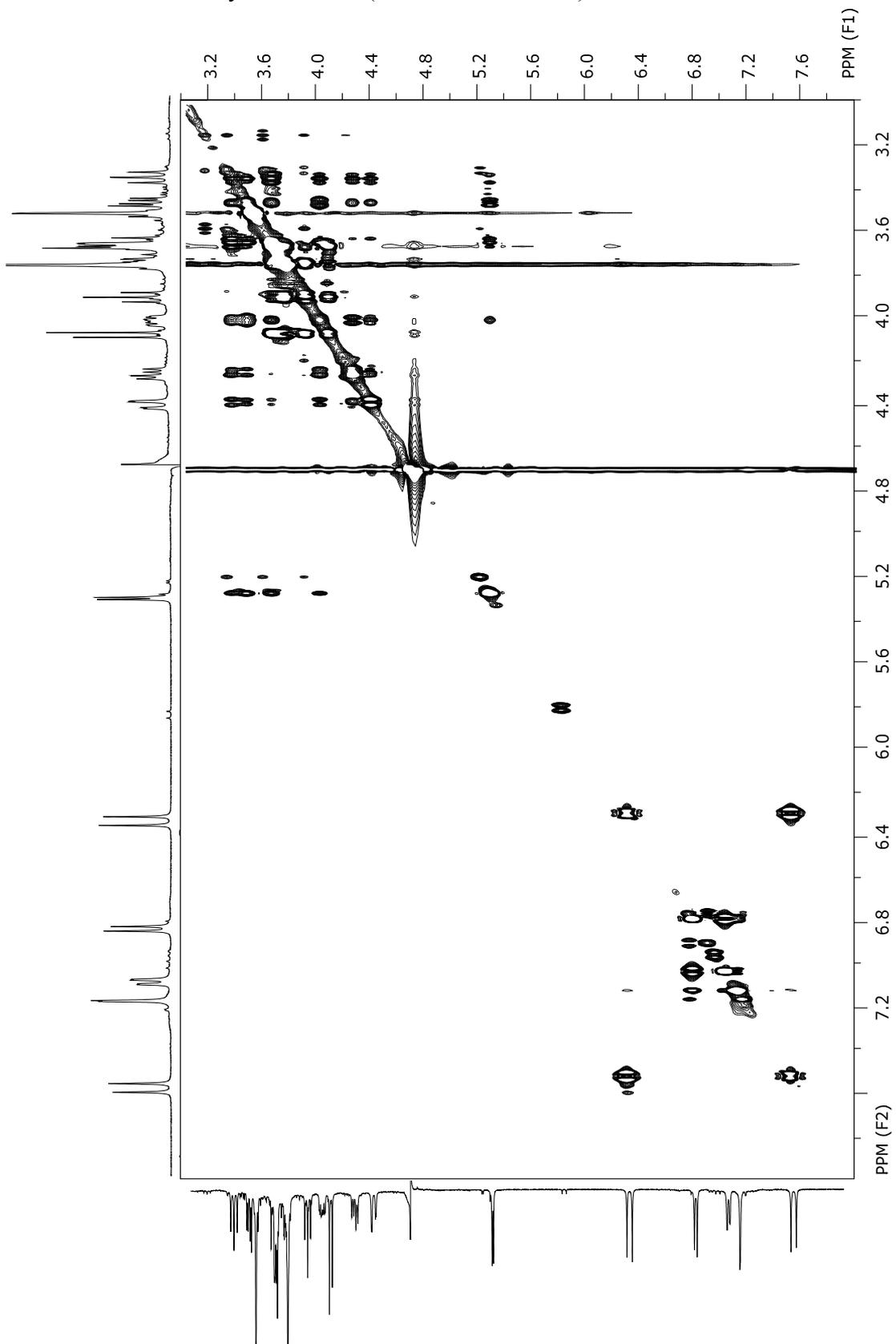
Yoshida H (1883): LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. Journal of the Chemical Society, Transactions, 43 472-486.

Yu P, Maenz D D, Mckinnon J J, Racz V J, Christensen D A (2002): Release of Ferulic Acid from Oat Hulls by *Aspergillus* Ferulic Acid Esterase and *Trichoderma* Xylanase. J. Agric. Food Chem., 50 (6), 1625-1630.

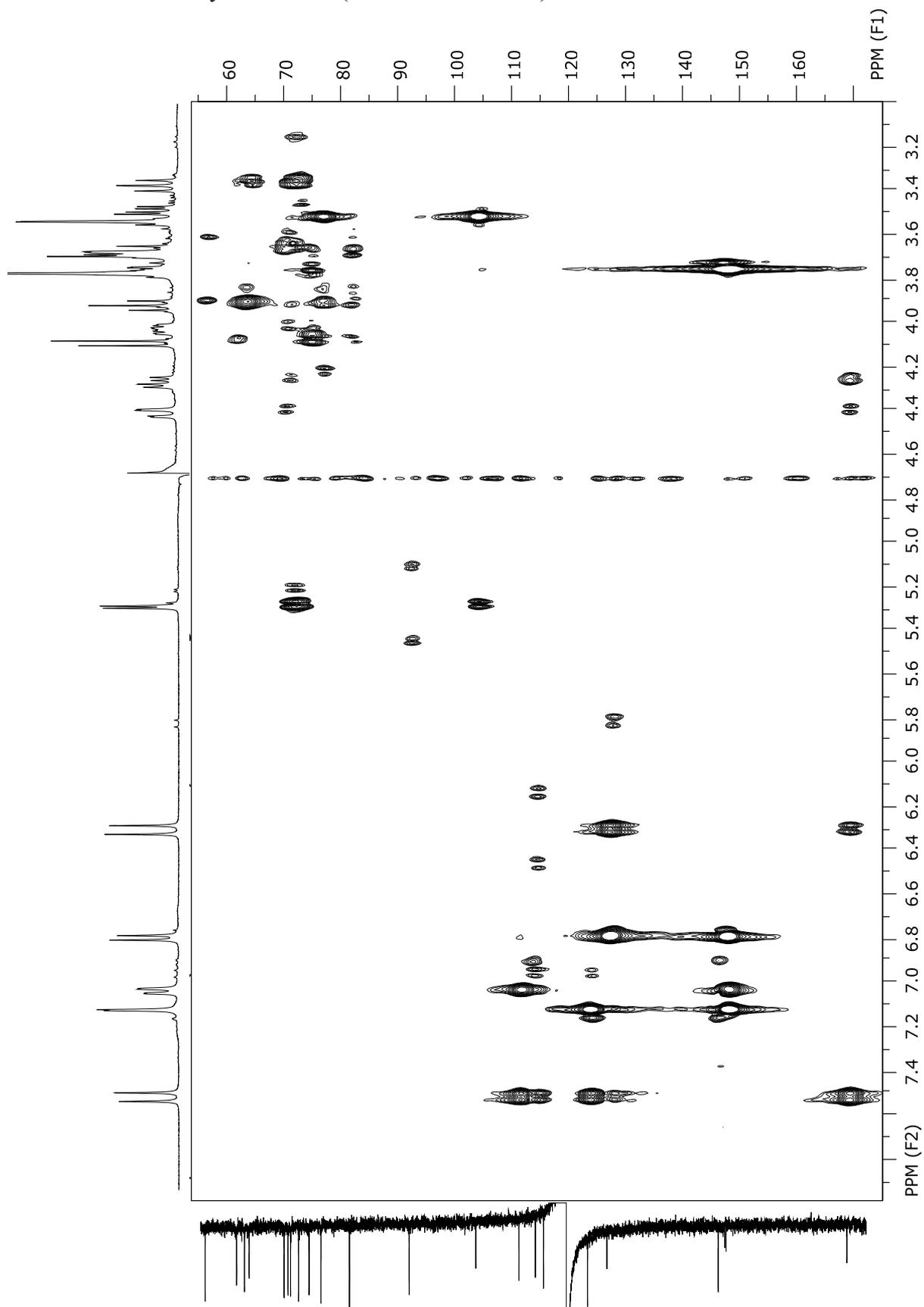
Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J (1995): Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. Appl. Microbiol. Biotechnol., 44 (3), 277-282.

## 7 Anhang

TOCSY-NMR Feruloilsaccharose (Methode siehe 3.24)



## HMBC-NMR Feruloylsaccharose (Methode siehe 3.24)



---

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name:	René Matthes
Geburtsdatum:	24.05.1980
Geburtsort:	Bernburg

---

### Schulbildung

1986 – 1991	polytechnische Oberschule „Juri Gagarin“, Bernburg
1991 – 1998	Hermann-Hellriegel-Gymnasium, Bernburg
Juli 1998	Abitur

---

### weiterer Werdegang

Nov. 1998 – Mai 2002	Grundwehrdienst, anschl. Soldat auf Zeit
Okt. 2002 – März 2008	TU Dresden, Diplom-Studium: Lebensmittelchemie, wissenschaftl. Abschlussarbeit im AK Prof. Henle: „Proteolytische Freisetzung und epithelialer Transport ausgewählter Maillard-Produkte“
April 2008 – Mai 2011	Leibniz Universität Hannover Institut für Lebensmittelchemie wissenschaftlicher Mitarbeiter

---

Hannover, 16.06.2011

## **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

*Enzyme aus Basidiomyceten zur Modifikation von Hydrokolloid-Systemen*

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

René Matthes