

**Enzyme aus Basidiomyceten zur Hydrolyse von Estern
aromatischer Carbonsäuren**

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

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Lebensmittelchemiker Paul Haase-Aschoff

geboren am 10.12.1982 in Bad Kreuznach

2014

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

Korreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Tag der Promotion: 05.05.2014

Danksagung

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

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

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates und Herrn Prof. Dr. Andreas Hahn (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft den Vorsitz meiner Disputation zu übernehmen.

Dem BMBF Cluster BOKATALYSE2021 danke ich für die finanzielle Unterstützung der Arbeit durch das Projekt „Entwicklung und Optimierung eines mikrobiellen Expressionssystems zur Produktion von Feruloyl-Esterase“ (P37).

Herrn Dr. Manfred Nimtze (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Braunschweig) danke ich für die Sequenzierung von Peptiden mittels ESI-MS/MS.

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

Nicht zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern danken, die mich in meinem Leben immer unterstützt und gefördert haben, und meiner Freundin, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mich mit ihrem sonnigen Gemüt allzeit zum Lachen bringen konnte.

Vorbemerkung

Diese Dissertationsschrift basiert auf Arbeiten, die in folgenden *peer reviewed* Publikationen veröffentlicht wurden:

- Haase-Aschoff, P., Linke, D., Berger, R.G., (2013) Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase. *Bioresource Technology* 130, 231-238.
- Haase-Aschoff, P., Linke, D., Nimtz, M., Popper, L., Berger, R.G., (2013) An enzyme from *Auricularia auricula-judae* combining both benzoyl and cinnamoyl esterase activity. *Process Biochemistry* 48, 1872-1878.

Nachfolgend gelistete Veröffentlichungen, Poster und Vorträge wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit erarbeitet, sind jedoch nicht Gegenstand dieser Dissertationsschrift.

- Haase-Aschoff, P.; Schimanski, S.; Linke, D.; Berger, R.G., (2013) Aromabildung und Strukturmodifikation durch Ferulasäure-Esterasen. *Lebensmittelchemie* 67, 76.
- Nieter, A., Haase-Aschoff, P., Linke, D., Nimtz, M., Berger, R.G., (2014) A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. *Fungal Biology* 118, 348-357.

Posterpräsentation:

- Haase-Aschoff, P.; Linke, D.; Berger, R.G. An extracellular carboxylesterase from the basidiomycete *Hirneola auricula-judae* hydrolyses phenolic esters. 6th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, 2. - 6. September 2012 und BIODIVERSITY2013 Clusterkonferenz, Hamburg, 10. - 11. Juni 2013.

Vorträge:

- Haase-Aschoff, P.; Linke, D.; Berger, R.G. Basidiomycota: Eine vielseitige Quelle neuer Ferulasäure-Esterasen. DEHEMA Vortrags- und Diskussionstagung: Effiziente Verfahren und Anlagen in der Bioverfahrenstechnik und Lebensmittelbiotechnologie. Bad Wildungen, 06. - 08. Mai 2013.
- Haase-Aschoff, P.; Schimanski, S.; Linke, D.; Berger, R.G. Aromabildung und Strukturmodifikation durch Ferulasäure-Esterasen. Arbeitstagung 2013 des Regionalverband Nord, Lebensmittelchemische Gesellschaft, Hamburg School of Food Science, Hamburg, 18. - 19. Februar 2013.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
Abstract	VII
1. Einleitung	1
1.1 Pilze	1
1.1.1 Ascomyceten und Basidiomyceten	1
1.1.2 Holzfäule-Organismen	2
1.2 Ferulasäure (FA).....	4
1.3 Hydrolasen / Esterasen	7
1.4 Ferulasäure-Esterasen (FAE).....	9
1.4.1 FAE-Substrate.....	9
1.4.2 Klassifizierung von FAE.....	12
1.4.3 3D-Strukturen von FAE	13
1.4.4 Katalytischer Mechanismus von FAE	14
1.4.5 Assays für FAE	15
1.4.6 Industrielle Applikationen von FAE und FA	18
1.5 Laccasen	21
1.6 Ziele der Arbeit	23
2. Vorwort zur Publikation „Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase”	24
3. Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase	25
3.1 Introduction	26
3.2 Methods.....	27
3.2.1 Chemicals and enzymes.....	27
3.2.2 Basidiomycete strains	28
3.2.3 Culture conditions.....	29
3.2.4 Enzyme assays.....	29
3.3 Results and discussion	31
3.3.1 Analysis of FAEs in basidiomycetes.....	31
3.3.2 Recovery rate of FA and FA-ME vs. laccase activity.....	31
3.3.3 Inhibition of laccase by sodium azide	32
3.3.4 Detection of substrate preference	33
3.3.5 Efficiency of the analytical method	35
3.3.6 Basidiomycete CAE/FAEs	36

3.3.7	Substrate prevalence of basidiomycete CAE/FAEs.....	36
3.3.8	CAE/FAE induction by Tween 80	39
3.3.9	FAE loss by laccases	40
3.3.10	<i>p</i> -NPB esterase activity.....	40
3.4	Conclusion	41
4.	Vorwort zur Publikation „An enzyme from <i>Auricularia auricula-judae</i> combining both benzoyl and cinnamoyl esterase activity”	43
5.	An enzyme from <i>Auricularia auricula-judae</i> combining both benzoyl and cinnamoyl esterase activity	44
5.1	Introduction.....	45
5.2	Materials and methods	46
5.2.1	Chemicals and enzymes.....	46
5.2.2	Cultivation of <i>A. auricula-judae</i> (Aaj)	47
5.2.3	Purification.....	47
5.2.4	Activity assays.....	48
5.2.5	HPLC.....	50
5.2.6	ESI tandem MS of tryptic peptides	50
5.2.7	pH optimum.....	50
5.2.8	Temperature optimum and stability	51
5.2.9	Denaturing SDS-PAGE and isoelectric focusing.....	51
5.3	Results.....	52
5.3.1	General properties of EstBC	52
5.3.2	pH, temperature optimum and thermal stability.....	53
5.3.3	Hydrolysis of FAE substrates.....	54
5.3.4	Benzoic acid esterase activity vs. FAE activity	55
5.3.5	Substrate profile of EstBC.....	56
5.3.6	Partial amino acid sequence of EstBC	57
5.4	Discussion	58
6.	Ausblick	64
7.	Literaturverzeichnis.....	66
	Lebenslauf	75

Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>Amino acid</i> (Aminosäure)
Aaj	<i>Auricularia auricula-judae</i> (Judasohr)
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Asp	Asparaginsäure
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CA	<i>Cinnamic acid</i> (Zimtsäure)
CAZy	<i>Carbohydrate-active enzymes</i>
Di-FA	Dehydrodimer der Ferulasäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSWB	<i>Destarched wheat bran</i> (Weizenkleie ohne Stärke)
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie
EstBC	Benzoyl- und Cinnamoyl-Esterase aus <i>Auricularia auricula-judae</i>
FA	<i>Ferulic acid</i> (Ferulasäure)
F-A	5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FAE	Ferulasäure-Esterase (<i>ferulic acid esterase</i>)
F-AX	β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
F-AXG	α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
F-AXGX	α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl-L-Arabinofuranose
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
GC	Gaschromatographie (<i>gas chromatography</i>)
Glu	Glutaminsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatografie
His	Histidin

HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>Ion exchange chromatography</i>
IUBMB	<i>International union of biochemistry and molecular biology</i>
KA	Kaffeesäure
Me oder ME	Methylester (<i>methyl ester</i>)
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P-AXX	α -D-Xylopyranosyl-(1→4)- β -D-Xylopyranosyl-(1→3)-5-O- <i>trans-p</i> -Coumaroyl-L-Arabinofuranose
<i>p</i> CU	<i>p</i> -Cumarsäure (<i>p</i> -coumaric acid)
POD	Pilzliche Peroxidasen (Klasse II)
RG	Rhamnogalacturonan
RP	<i>Reversed phase</i>
SA	Sinapinsäure (<i>sinapinic acid</i>)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
Ser	Serin
SNL	Standardnährlösung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
UV	Ultraviolett
w/v	<i>Weight by volume</i>

Zusammenfassung

Ferulasäure-Esterasen (FAE) sind eine Gruppe ubiquitär vorkommender Enzyme. In neuerer Zeit erfahren FAE stetig wachsende wissenschaftliche und wirtschaftliche Aufmerksamkeit, da ihre Katalyse in vielen biotechnologischen Bereichen benötigt wird. Sie sind in Bakterien und Hefen, zumeist jedoch in Ascomyceten identifiziert worden. Aus der großen Klasse der Basidiomyceten (Ständerpilze), den nächsten Verwandten der Ascomycota, waren jedoch keine FAE beschrieben. Dies ist bemerkenswert, denn Basidiomycota gedeihen auf hemicellulose- und ferulasäurereichem Material besonders gut. Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass der Nachweis basidiomycetischer FAE aufgrund von Interferenzen mit Oxidoreduktasen, insbesondere den in Holzfäulepilzen mannigfaltig vorkommenden Laccasen, versagt: Ferulasäure (FA) und deren Ester polymerisieren, so dass diese den üblichen FAE-Assays entzogen werden.

Um diesen Umstand zu begegnen, wurde ein neuer Assay entwickelt, der FAE in Gegenwart von Laccasen nachweist. Durch die Kombination phenolischer, wie auch nicht-phenolischer Substrate konnte Laccaseaktivität indirekt kontrolliert werden. Der parallele Einsatz von Ferulasäure-, Zimtsäure- und 3,4,5-Trimethoxy-Zimtsäure-Methylester ermöglichte zeitgleich die Ableitung von Substratspezifitäten.

In einem umfassenden Screening wurden 41 Basidiomyceten mit der entwickelten Methode hinsichtlich ihrer FAE- und Laccase-Aktivitäten untersucht. Mehr als die Hälfte der Organismen (61 %) zeigte FAE-Aktivität. Verschiedene Substratspezifitäten und somit unterschiedliche FAE-Typen wurden detektiert. Diese umfangreiche Studie belegt erstmals das große Potential von Basidiomycota zur Bildung diverser FAE.

Die FA-Ester hydrolysierende Aktivität des Speisepilzes *Auricularia auricula-judae* (Judasohr, auch Mu-Err) wurde isoliert und biochemisch weitreichend charakterisiert. Das EstBC genannte Enzym hydrolysierte viele Zimtsäurederivate – jedoch nur in Form der Alkylester (artifizielle Substrate) und nicht als Saccharidester (natürliche Substrate). Erstmals wurde somit nachgewiesen, dass die Hydrolyse artifizieller Substrate nicht grundsätzlich den Rückschluss auf genuine FAE-Aktivität zulässt.

Die umfassende Substratanalyse von EstBC zeigte neben der Cinnamat- auch Benzoat-Alkylester-spaltende Aktivität; bis *dato* galten Benzoyl- und Cinnamoyl-Esterasen jedoch als Enzymklassen mit nicht überlappenden Substratspektren.

Die Sequenzanalyse von sechs tryptischen EstBC-Peptiden (93 Aminosäuren in der Summe) zeigte keine Homologie zu bekannten Proteinen. Hohe Identitäten wurden lediglich in Verbindung mit hypothetischen, aus Genomprojekten abgeleiteten und somit nicht weiter charakterisierten Proteinen detektiert. Diese Proteine wiesen Esterasetypische Domänen der α/β -Hydrolasefaltung mit einer aus Serin, Histidin und Asparaginsäure bestehenden katalytischen Triade auf.

Die detaillierte Charakterisierung der Esterase aus *Auricularia auricula-judae* eröffnet neue katalytische Eigenschaften. Aufgrund des ungewöhnlichen Substratspektrums und der fehlenden Sequenzhomologie zu bekannten Proteinen ist die Esterase einer neuen Klasse von Enzymen zuzuordnen. Zukünftige Anwendungen könnten die Hydrolyse und Veresterung von benzylierten und feruloylierten Verbindungen wie Aromastoffen, Feinchemikalien und Pharmazeutika sein.

Schlagnvorte: Basidiomycota, Ferulasäure-Esterase, Phenolsäure

Abstract

Ferulic acid esterases (FAE) are a group of ubiquitous enzymes. Recently, the scientific and economic interest in FAE increased, as their catalysis is required in diverse biotechnological applications. They have been identified in bacteria and yeasts; however, they are most common in ascomycetes. Interestingly, no FAEs had so far been detected in the wide field of basidiomycetes, the nearest relatives of ascomycota. This can be considered remarkable since basidiomycetes thrive well on hemicelluloses and feruloyl-rich materials. Within the scope of this research it was illustrated that oxidoreductases interfere with the detection of basidiomycete FAEs. This especially applies to laccases, which are widely spread in wood rotting fungi. The common FAE assays are not applicable due to the polymerization of ferulic acid (FA) and their esters.

A new assay has been developed, in order to circumvent the analytical problems. The combination of phenolic and non-phenolic substrates facilitated the indirect control of laccase activity. The parallel usage of methyl ferulate, cinnamate and 3,4,5-trimethoxycinnamate supported the simultaneous deduction of substrate preferences.

41 basidiomycetes were analyzed regarding their FAE and laccase activity applying the developed method. More than half of the set (61 %) was FAE active. A variety of substrate specificities and subsequently different FAE types were detected. This comprehensive study verified the broad potential of basidiomycetes for FAE secretion for the first time.

The FA ester hydrolyzing activity of *Auricularia auricula-judae* (Jew's ear), an edible mushroom, was isolated and extensively characterized biochemically. The substrate spectra of the so called EstBC covered the hydrolysis of many cinnamate derivatives – however, the only esters hydrolyzed were alkyl esters (artificial substrates), whereas no saccharide esters (natural substrates) were cleaved. Obviously, hydrolysis of artificial FAE-substrates does not automatically coincide with genuine FAE activity.

The comprehensive substrate analysis of EstBC showed both wide benzoate and cinnamate alkyl ester hydrolyzing activity; previously, benzoyl and cinnamoyl esterases were considered as enzymes without overlapping substrate spectra.

The sequence analysis of six tryptic peptides of EstBC (93 amino acids in total) revealed no homology to any known proteins. High identities were solely detected in conjunction with hypothetical proteins, deduced from genome projects and not characterized. These

proteins showed esterase specific domains with an alpha/beta hydrolase fold in combination with a serine, histidine and aspartic acid containing catalytic triad.

The extensive characterization of the esterase originating from *Auricularia auricula-judae* revealed new catalytic properties combined with broad pH and temperature windows. Besides this, a new class of enzymes was established based on the extraordinary substrate spectrum and the missing sequence homology to known proteins. Future applications may be the hydrolysis as well as the synthesis of benzoylated and feruloylated compounds, such as flavors, fine chemicals and pharmaceuticals.

Keywords: Basidiomycota, ferulic acid esterase, phenolic acid

1. Einleitung

1.1 Pilze

Pilze (Fungi), der Domäne der Eukaryoten zugehörig (Fig. 1-1), weisen eine enorme Vielfalt an Lebensweisen und -formen auf. Jährlich werden mehr als 1200 neue Pilzarten entdeckt (Blackwell, 2011), so dass bis heute circa 100 000 Pilze bekannt sind (Kirk *et al.*, 2008). Schätzungen zufolge existierten jedoch mehr als 5,1 Millionen Pilzspezies auf unserer Erde (O'Brien *et al.*, 2005). Pilze ernähren sich heterotroph mittels saprobiothischer, parasitischer oder symbiotischer Nahrungsaufnahme. Insbesondere in ihrer saprobiothischen Lebensweise nehmen sie als Zersetzer der Biosphäre eine Schlüsselposition in unserem Ökosystem ein (Lüttge *et al.*, 2010; Raven *et al.*, 2006; Schwantes, 1996).

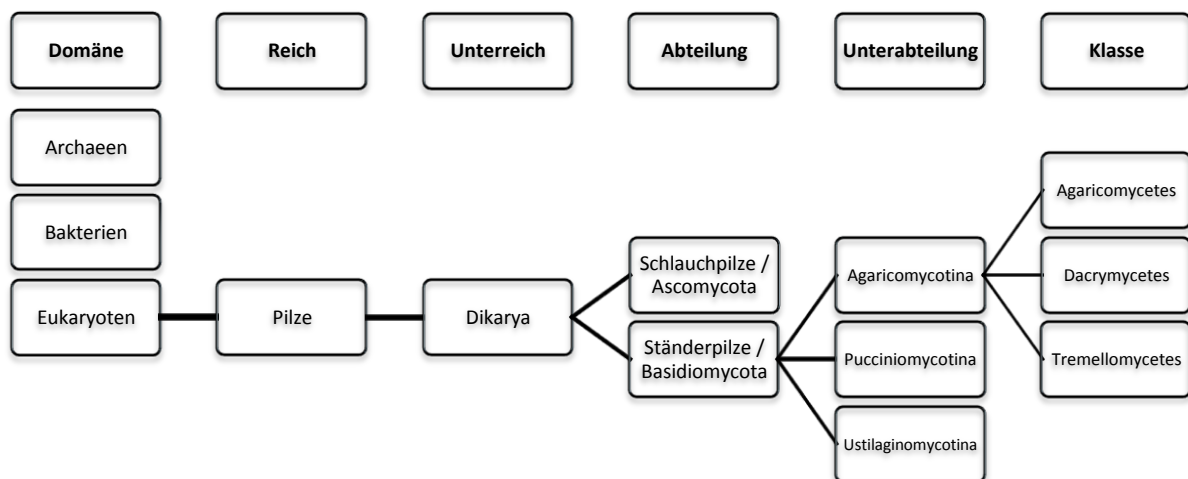


Fig. 1-1 | Taxonomie der Pilze mit Focus auf die Abteilung der Basidiomyceten (BRENDA Tax Tree Explorer, Schomburg *et al.*, 2013)

1.1.1 Ascomyceten und Basidiomyceten

Mehr als 90 % aller beschriebenen Pilze sind den Abteilungen der Ascomyceten und Basidiomyceten zuzuordnen (Fig. 1-1). Die Ascomyceten (Schlauchpilze) bilden mit ca. 60 000 Arten (60 % der Pilze) die umfangreichste und heterogenste Pilzgruppe. Bei der geschlechtlichen Vermehrung bilden die Ascomyceten die namensgebenden schlauchartigen Asci, die als Bildungsstätte und Träger der Ascosporen fungieren. Zu den Ascomyceten gehören viele Schimmelpilze und Hefen, aber auch essbare Vertreter wie

der Trüffel (*Tuber*) und die Morcheln (*Morchella*) (Lüttge *et al.*, 2010; Raven *et al.*, 2006; Schwantes, 1996).

Basidiomyceten (Ständerpilze), die nächsten Verwandten der Ascomyceten, bilden mit ca. 30 000 Arten (30 % der Pilze) die zweitgrößte Pilzgruppe. Die namensgebende Basidie bildet mit dem sogenannten Sporenständer das Fortpflanzungsorgan der Ständerpilze. An den Basidien werden die Basidiosporen nach außen hin abgeschnürt, so dass es sich im Gegensatz zu den Ascosporen um Exosporen handelt. Viele Basidiomyceten sind essbare und schmackhafte Vertreter, wie beispielsweise die weltweit am häufigsten kultivierten Speisepilze Zuchtchampignon (*Agaricus bisporus*), Shiitake (*Lentinula edodes*) und Seitlinge (*Pleurotus* spp.) (Lüttge *et al.*, 2010; Raven *et al.*, 2006; Schwantes, 1996).

In der Natur spielen Pilze, insbesondere Basidiomyceten, eine zentrale Rolle bei dem Abbau von Pflanzenbiomasse. Hierzu sekretieren sie, entsprechend ihrem Habitat, verschiedenste Enzyme (Brink *et al.*, 2011). Pflanzliche Biomasse wird hauptsächlich durch Cellulose und Hemicellulose repräsentiert (Saha, 2003). Diese Polysaccharide liegen im pflanzlichen Gewebe zumeist in Lignin eingebettet vor oder sind hiermit vernetzt (Fig. 1-2). Lignin besteht aus einem dreidimensionalen Phenylpropanoid-Netzwerk, das unter biologischen Bedingungen keine hydrolysierbaren Verbindungen enthält und chemisch nur unter drastischen Bedingungen zugänglich ist (Dias *et al.*, 2010). Cellulose-, Hemicellulose- und Lignin-abbauende Pilze gehören meistens zu den Holzfäule-Pilzen, die hauptsächlich in der Abteilung der Basidiomyceten vorkommen (Eastwood *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012).

1.1.2 Holzfäule-Organismen

Holzabbauende Pilze lassen sich in Weißfäule- und Braunfäule-Pilze unterteilen. Holzfäule-Pilze gehören zumeist in die den Basidiomyceten untergeordnete Klasse der Agaricomyceten (Fig. 1-1) (Eastwood *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012). Diese Organismen sekretieren ein ganzes Set extrazellulärer Hydrolasen und Oxidoreduktasen, um die aus Cellulose, Hemicellulose und Lignin bestehenden Pflanzenzellwände (vgl. Fig. 1-2) zu zersetzen und als Kohlenstoffquelle nutzbar zu machen.

Weißfäule-Pilze sekretieren bei der Zersetzung von Holzsubstraten und verholzten Matrices Peroxidasen mit hohem Redoxpotential. Hierzu gehören Oxidoreduktasen wie Lignin-Peroxidasen (EC 1.11.1.14), Mangan-Peroxidasen (EC 1.11.1.13) und *Versatile*-Peroxidasen (EC 1.11.1.16). Diese ligninabbauenden Enzyme werden zu den pilzlichen Peroxidasen (POD der Klasse II) gezählt (Eastwood *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012; Irbe *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2009). Durch den vollständigen Abbau des Lignins und der Hemicellulose hinterlässt der Weißfäule-Pilz aufgehellte bis völlig weiße Bereiche unzersetzter, kristalliner Cellulose (Schwantes, 1996).

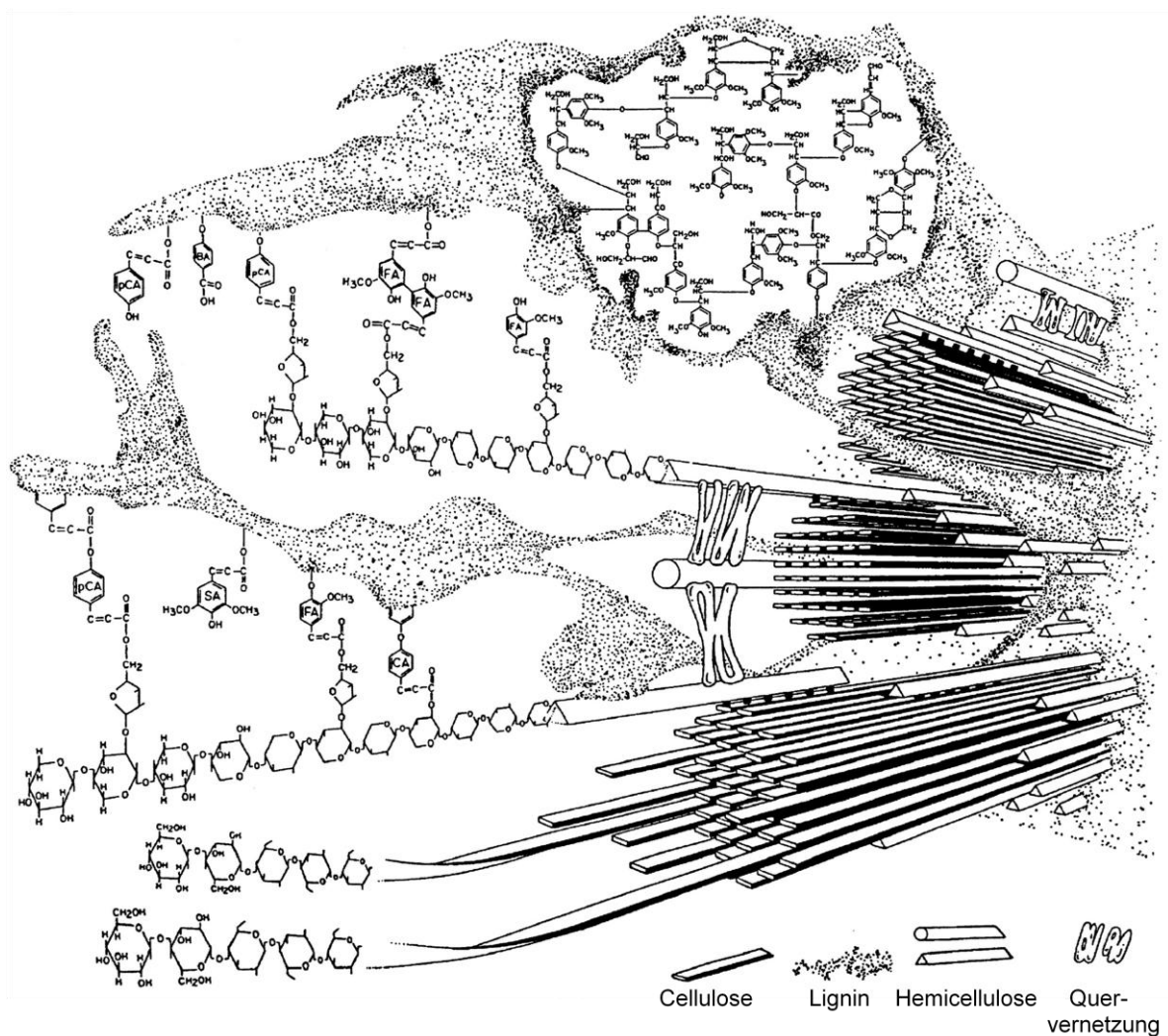


Fig. 1-2 | Schematische Darstellung einer Pflanzenzellwand (nach Martínez *et al.*, 2009)

Lineare Bereiche werden durch das Homopolysaccharid Cellulose repräsentiert; das Heteropolysaccharid Hemicellulose bildet mittels Zimtsäurederivaten (pCA: *p*-Cumarsäure, FA: Ferulasäure, SA: Sinapinsäure) intra-molekulare Hemicelluloseverbindungen und inter-molekulare Ligninverbindungen. Cellulose und Hemicellulose sind in einer Ligninmatrix, die aus vernetzten non-, mono- und di-methoxylierten und hydroxylierten Phenylpropanoid-Einheiten besteht, eingebettet.

Braunfäule-Pilze weisen im Vergleich zu Weißfäule-Pilzen weniger Oxidoreduktase- und CAZy-Gene (CAZy: *Carbohydrate-Active Enzymes*) auf (Eastwood *et al.*, 2011). So wurden POD-Gene bisher nicht in Braunfäule-Pilzen detektiert. Multikupfer-Oxidasen wie Laccasen wurden hingegen zahlreich sowohl in Weißfäule-, wie auch in Braunfäule-Pilzen gefunden. (Eastwood *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012; Irbe *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2009). Braunfäule-Pilze bauen primär die Cellulose und Hemicellulose des Holzes ab, so dass ein rötlich-brauner Rückstand, der auf unzersetztes Lignin zurückzuführen ist, beobachtet werden kann (Schwantes, 1996).

1.2 Ferulasäure (FA)

Der Name der Ferulasäure (FA; 4-Hydroxy-3-Methoxy-Zimtsäure) beruht auf der Gattung der Steckenkräuter (*Ferula* von lat. Rute, Gerte). Die erste Isolierung und Beschreibung von FA erfolgte durch von Hlasiwetz *et al.* (1866) aus Asant (*Ferula assa-foetida*). In Pflanzen wird FA über den Phenylpropanoid-Biosyntheseweg aus den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin aufgebaut. Zumeist ist FA mit Sacchariden verestert (Fig. 1-2 und Fig. 1-3), wird jedoch auch frei und verethert vorgefunden (Graf, 1992; Mathew *et al.*, 2006). Mit ihrer ubiquitären Verbreitung in der Natur ist FA die in der Welt am häufigsten vorkommende Phenolsäure (Mathew *et al.*, 2004).

Besonders hohe Gehalte an veresteter FA befinden sich in der weltweit verbreiteten Pflanzenfamilie der Süßgräser (*Poaceae*), zu denen unter anderem Gerste, Hafer, Hirse, Mais, Reis, Roggen und Weizen gehören. Der durchschnittliche FA-Gehalt der *Poaceae*, wie auch anderer Monokotyledonen, liegt im Promillebereich, kann jedoch – wie im Falle der Maiskleie (3,1 % (Benoit *et al.*, 2006)) – bis in den unteren Prozentbereich ansteigen (Barberousse *et al.*, 2008; Harris *et al.*, 2010).

FA ist in den Monokotyledonen an die Struktureinheiten des Arabinoxylans, den Hauptbestandteil der Hemicellulosen, gebunden. Die Grundstruktur des Arabinoxylans besteht aus β -1,4-glykosidisch verbundenen D-Xylopyranose-Einheiten (A in Fig. 1-3). An der Xylan-Hauptkette sind L-Arabinose-Einheiten in Form von Seitenketten sowohl α -1,3-glykosidisch (B) als auch α -1,2-glykosidisch (C) gebunden. Ferulasäure ist in

Monokotyledonen stets an die O-5-Positionen von Arabinose-Seitenketten mittels Esterbindung verknüpft (D in Fig. 1-3, Fig. 1-4) (Buanafina, 2009; Harris *et al.*, 2010; Saulnier *et al.*, 1999).

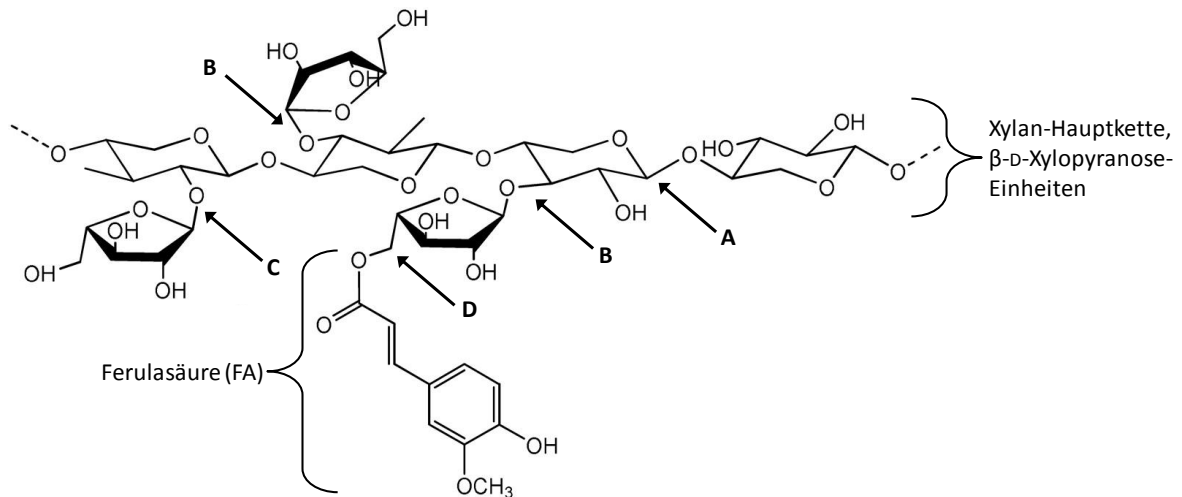


Fig. 1-3 | Strukturausschnitt eines Arabinoxyllans mit veresterter Ferulasäure (nach Buanafina, 2009)

Arabinoxylan, die Hauptkomponente der Hemicellulose, ist aus D-Xylopyranose-Einheiten aufgebaut, die β -1,4-glykosidisch (A) verbunden sind. Seitenketten werden durch α -1,3-glykosidisch (B) und α -1,2-glykosidisch (C) gebundene L-Arabinose-Einheiten gebildet. Die O-5-Position der Arabinose-Seitenkette kann durch FA verestert vorliegen (D).

Dikotyledonen wie Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) und Spinat (*Spinacia oleracea*) enthalten ebenfalls gebundene FA. Entsprechend den Monokotyledonen ist FA an den Seitenketten der heteropolysacchariden Bereiche verestert (Buanafina, 2009). Das Rückgrat dieser Seitenketten bildet das Rhamnogalacturonan I (RG-I), ein Bestandteil des Pektins (Fig. 1-4). RG-I enthält sich wiederholende Einheiten eines Disaccharids aus Galacturonsäure und Rhamnose (α -(1,2)-D-GalS- α -(1,4)-L-Rha). An der Rhamnose des Hauptstrangs sind Arabinane und Galactane in Gestalt von Seitenketten an O-2- und/oder O-3-Positionen glykosidisch gebunden. Arabinane bestehen aus oligo α -(1,3)-Arabinose-Molekülen, Galactane setzen sich aus oligo β -(1,4)-Galactose-Einheiten zusammen (Fig. 1-4) (Ochoa-Villarreal *et al.*, 2012).

Im Gegensatz zu Monokotyledonen (O-5) ist FA in den Dikotyledonen an den O-2-Positionen der Arabinane und O-6-Positionen der Galactane gebunden (Fig. 1-4). Die Analyse von Zuckerrüben-Pulpe ergab, dass 45–50 % der FA an O-6-Galactose und 50–55 % an O-2-Arabinose verestert vorlag (Buanafina, 2009; Ralet *et al.*, 1994b).

Vernetzte FA-Moleküle sind auf den Mechanismus enzymatischer Oxidation (Ralph *et al.*, 2004; Wallace *et al.*, 1995) und auf die Dimerisierung und Photoisomerisierung durch UV-Licht (Ford *et al.*, 1990) zurückzuführen. Die Vernetzung von FA und damit einhergehend die Verknüpfung verschiedener Kohlenhydratketten und Struktureinheiten (vgl. Zellwandmodell Fig. 1-2) hat in der Hauptsache drei Auswirkungen: die Verlangsamung des Wachstums; einen durch die Vernetzungen erhöhten Widerstand gegen das Eindringen von Pathogenen und Insekten wie auch die Stabilisation und Verstärkung der Zellmatrix, so dass der Abbau durch Mikroorganismen und pilzliche Enzyme erschwert wird (Buanafina, 2009; Bunzel, 2010).

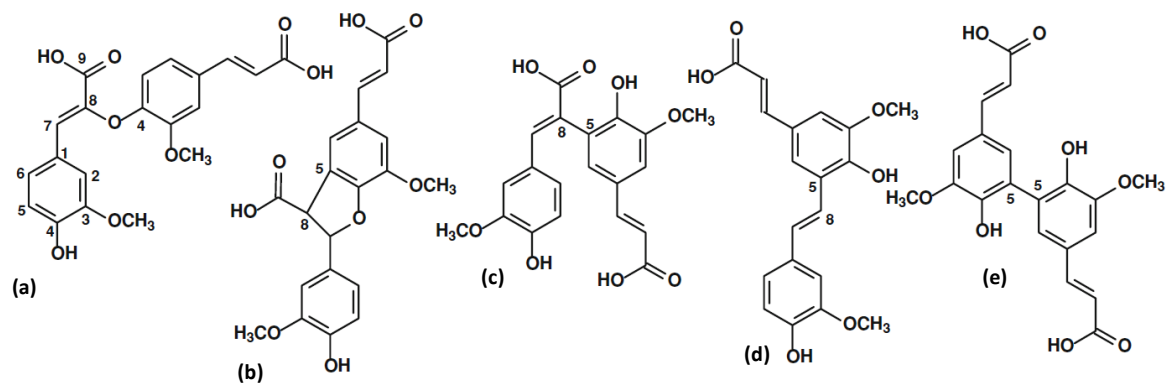


Fig. 1-5 | Auswahl von in den Pflanzen vorkommenden Dehydro-Di-Ferulasäure (Di-FA) Molekülen

(a) 8-O-4-Di-FA; (b) 8-5-cyclo-Di-FA; (c) 8-5-Di-FA; (d) 8--5-decarboxy-Di-FA; (e) 5-5-Di-FA (nach Bunzel, 2010).

1.3 Hydrolasen / Esterasen

Hydrolasen bilden eine große Gruppe von Enzymen, welche Verbindungen durch Anlagerung von Wasser spaltet, oder aber – der Gleichgewichtslage der Reaktion entsprechend – die Rückreaktion katalysiert (Fig. 1-6). Hydrolasen bilden im Nomenklatorsystem der IUBMB die 3. Enzymklasse (Römpf-Lexikon, 2013; Schomburg *et al.*, 2013).

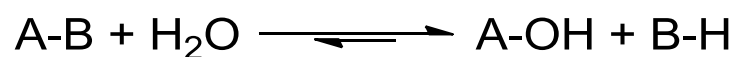


Fig. 1-6 | Reaktionsschema von Hydrolasen (EC 3.x.x.x)

Eine Untergruppe der Hydrolasen bilden die Carboxyl-Esterasen (EC 3.1.1.x). Diese katalysieren die Hydrolyse von Carboxyl-Estern zur Carbonsäure und Alkohol, bzw. deren Rückreaktion (Fig. 1-6) (Panda *et al.*, 2005; Schomburg *et al.*, 2013).

Dem Gros der Hydrolasen ist die α/β -Hydrolasefaltung gemein. Die allgemeine Struktur einer α/β -Hydrolasefaltung ist in Fig. 1-7 dargestellt. Die Sekundärstruktur zeichnet sich durch acht zumeist parallele β -Faltblatt Stränge aus, die an beiden Seiten von α -Helices umgeben sind. Die katalytisch aktiven Reste bestehen stets aus einer hoch-konservierten Triade: ein nach dem β -5-Strang gelegenes Nukleophil (Serin, Cystein oder Asparaginsäure), ein zumeist nach dem β -7-Strang gelegener Säurerest und ein absolut konserviertes Histidin nach dem letzten β -Strang. Das Nukleophil ist stets in einer scharfen Drehung, dem sogenannten „nukleophilen Ellenbogen“, eingebettet. Auf diese Weise kann es leicht durch das Substrat und auch durch das hydrolytische Agens Wasser erreicht werden. Der nukleophile Ellenbogen ist durch die Konsensus-Sequenz kR-X-Nu-X-kR (kR: kleiner Rest, X: beliebiger Rest; Nu: Nukleophil) gekennzeichnet (Nardini *et al.*, 1999; Ollis *et al.*, 1992).

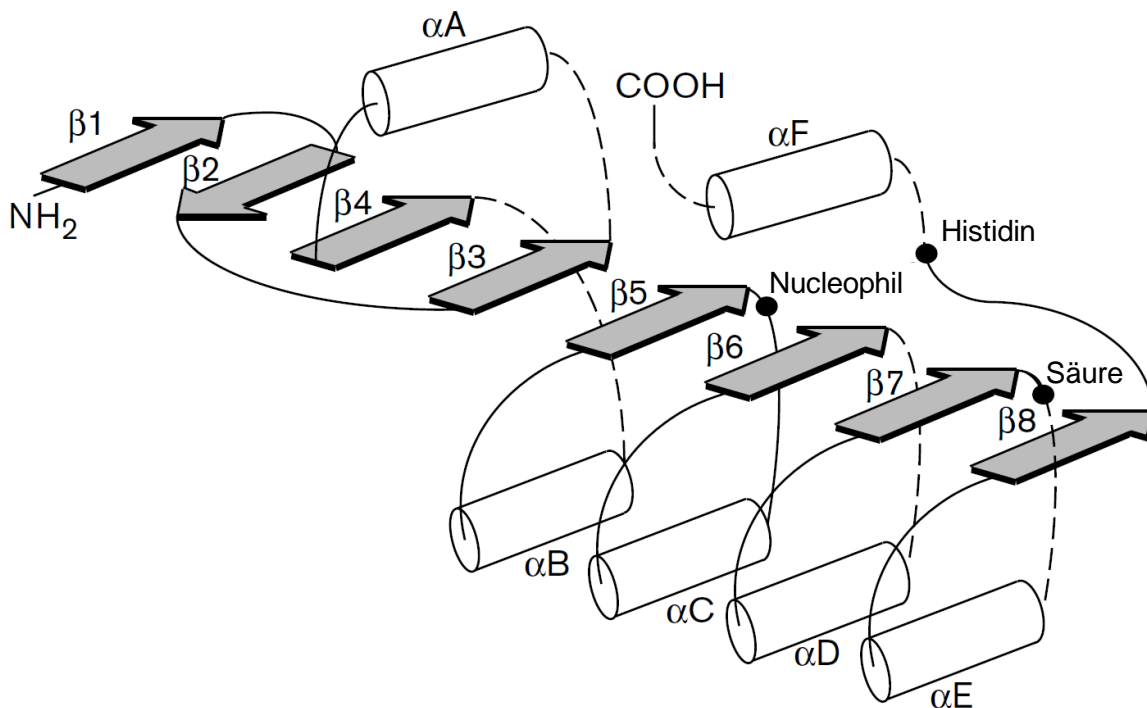


Fig. 1-7 | Strukturdiagramm einer α/β -Hydrolasefaltung (nach Nardini *et al.*, 1999)

α -Helices wurden durch weiße Zylinder, β -Faltblattstrukturen durch graue Pfeile dargestellt. Die katalytische Triade ist durch schwarze Punkte gekennzeichnet. Gestrichelte Linien zeigen Positionen möglicher Insertionen.

1.4 Ferulasäure-Esterasen (FAE)

Ferulasäure-Esterasen (FAE, auch Feruloyl-esterase, Zimtsäure-Esterase; EC 3.1.1.73) sind eine Unterklasse der Carboxyl-Esterasen (vgl. Kapitel 1.3). FAE katalysieren das Hydrolysegleichgewicht von Estern der Ferulasäure in pflanzlichen Sacchariden (MacKenzie *et al.*, 1988).

Im Jahre 1987 wurde FAE-Aktivität erstmals im Zusammenhang mit cellulolytischen und xylanolytischen Enzymen in der Literatur erwähnt (MacKenzie *et al.*, 1987); ein Jahr später erfolgte die erste dezidierte Publikation über eine FAE aus *Schizophyllum commune* (MacKenzie *et al.*, 1988). Seit den 1990er Jahren hat die Anzahl an Publikationen über FAE (Suchwort „*ferulic acid esterase*“) auf über 100 Artikel jährlich zugenommen (SciFinder, 2013). Dieser Trend repräsentiert das steigende wissenschaftliche wie auch wirtschaftliche Interesse an dieser Enzymklasse (Damásio *et al.*, 2013).

Die Verbreitung von FAE in der Natur ist divers. Sie wurden in verschiedensten eukaryotischen wie auch prokaryotischen Lebewesen nachgewiesen. Hierzu gehören sowohl Pflanzen wie Gerste (Sancho *et al.*, 1999) und Fingerhirse (Latha *et al.*, 2007) als auch Bakterien wie *Lactobacillus* (Donaghy *et al.*, 1998; Guglielmetti *et al.*, 2008) und *Streptomyces* (Mukherjee *et al.*, 2007). FAE Aktivität konnte sogar im Darm von Insekten wie den Termiten (Rashamuse *et al.*, 2013) und von Säugern wie den Ratten (Lai *et al.*, 2009) nachgewiesen werden. Die meisten FAE wurden jedoch in Pilzen, insbesondere der Ascomyceten zugehörigen *Aspergillus*-Gattung, erforscht (de Vries *et al.*, 2002; Faulds *et al.*, 1993; Udatha *et al.*, 2011).

1.4.1 FAE-Substrate

Die in der Natur vorkommenden Substrate der FAE sind feruloylierte Hetero-Polysaccharide, wie sie in Kapitel 1.2 dargestellt wurden. Eine effiziente FA-Hydrolyse von Polysacchariden ist jedoch nur unter synergistischer Zuhilfenahme anderer Hydrolasen wie Cellulasen und Xylanasen möglich (Faulds *et al.*, 2002; Faulds *et al.*, 2003; Tabka *et al.*, 2006). Faulds *et al.* (2003) testeten die isolierte und Xylanase-synergistische Hydrolysefähigkeit dreier unterschiedlicher FAE-Typen (AnFaeA aus *A. niger*, NcFae-1 aus

Neurospora crassa und TsFaeC aus *Talaromyces stipitatus*) mit den Substraten DSWB (Weizenkleie ohne Stärke) und Biertreber. Ohne Mitwirkung von Xylanasen wurde in keinem Versuch Freisetzung von FA detektiert. Bei der Inkubation von FAE mit Xylanasen wurde bei Biertreber bis zu 26 %, im Falle des DSWB bis zu 53 % der veresterten FA freigesetzt. Analoges wurde bei der FA-Hydrolyse von Dicotyledonen wie Zuckerrüben-Pulpe beobachtet. Die FAE AnFaeB aus *A. niger* setzte alleine weniger als 1 % FA frei, wohingegen eine Co-Inkubation mit *endo*-1,5- α -L-Arabinanase und α -L-Arabinofuranosidase eine 14-fache Steigerung (12 %) an freigesetzter FA bewirkte (Kroon *et al.*, 1996).

Aus zuvor genannten experimentellen Befunden ist zu schließen, dass die eigentlichen FAE-Substrate feruloylierte Polysaccharid-Fragmente wie F-A, F-AX, F-AXG und F-AXGX (Strukturen und systematische Namen siehe Fig. 1-8) darstellen (Faulds *et al.*, 1995).

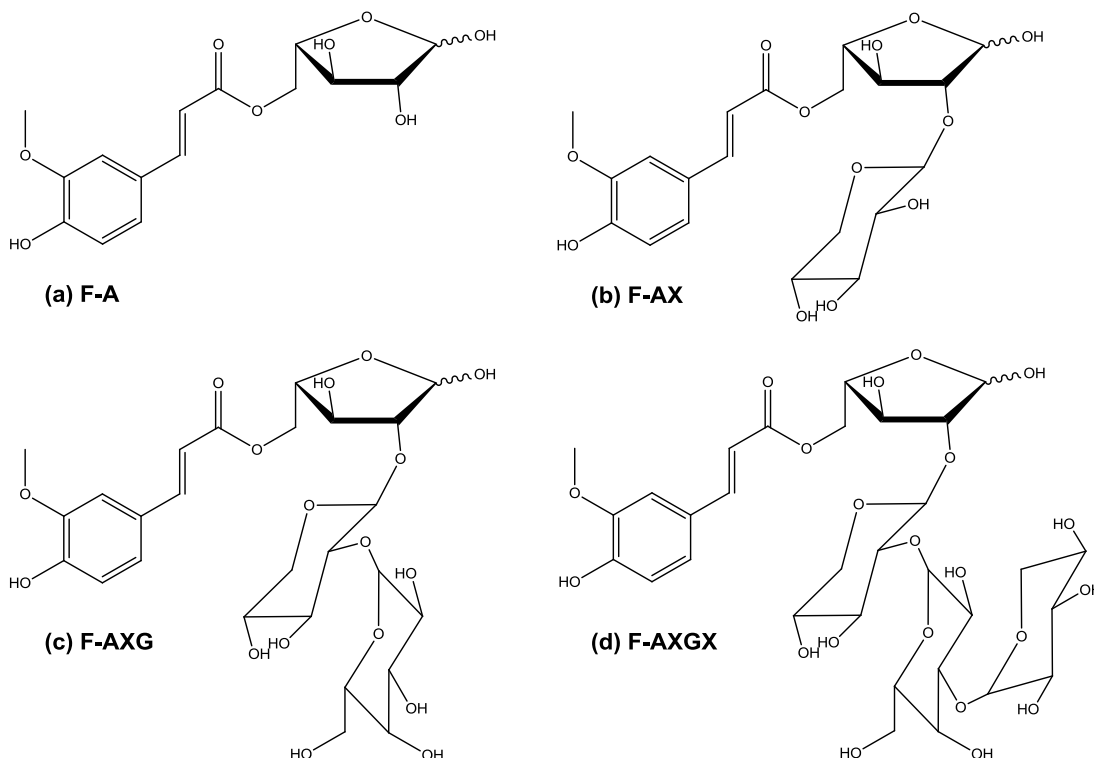


Fig. 1-8 | Feruloylierte Polysaccharid-Fragmente aus Monokotyledonen als natürliche FAE-Substrate

(a) F-A: 5-O-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; **(b)** F-AX: β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; **(c)** F-AXG: α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; **(d)** F-AXGX: α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose (Strukturen nach Allerdings *et al.*, 2006).

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass FAE feruloylierte Mono- bis Trisaccharide mit höchster katalytischer Effizienz im Vergleich zu Polysacchariden und den nachfolgend beschriebenen artifiziellen Substraten hydrolysierten (Fig. 1-9) (Benoit *et al.*, 2006; Faulds *et al.*, 1995; Linke *et al.*, 2013).

Die Substraterkennung der FAE ist insbesondere auf die Struktur des Säurerestes ausgerichtet. Enzym-Substrat Kristallstrukturanalysen zeigten, dass lediglich der Zimtsäure-Rest samt funktioneller Gruppen mit den katalytischen Bereichen des Enzyms wechselwirkt; der alkoholische Part des Esters spielte bei der Katalyse eine untergeordnete Rolle (Faulds *et al.*, 2005).

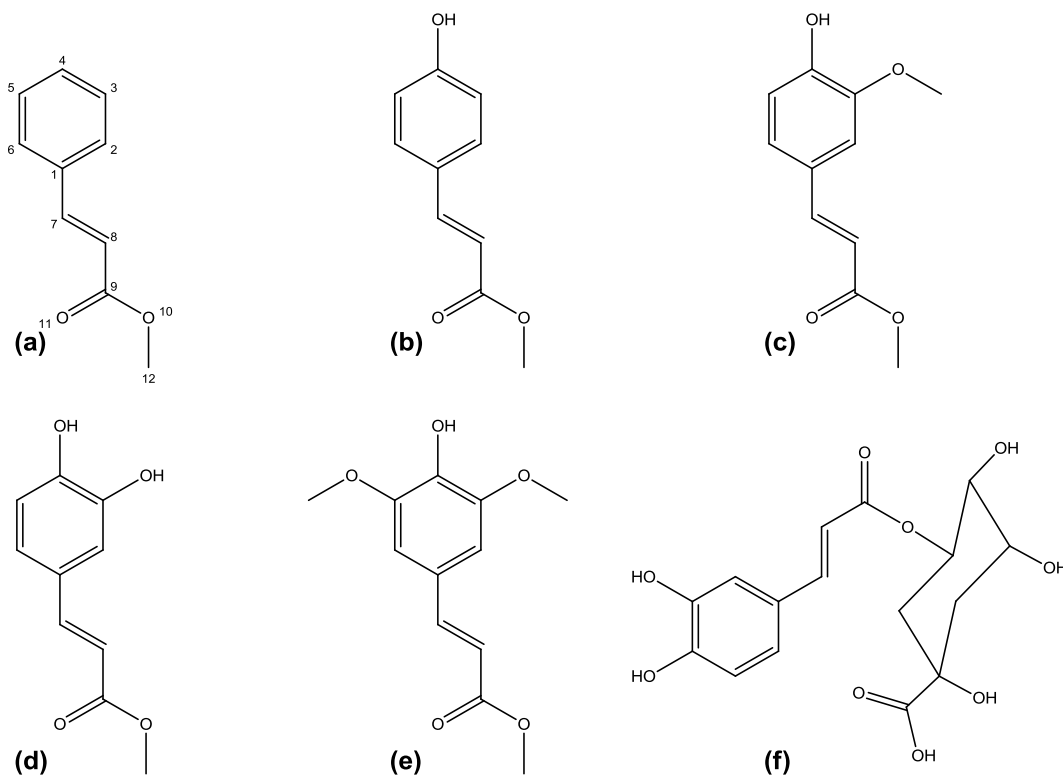


Fig. 1-9 | Auswahl der am häufigsten gebrauchten artifiziellen FAE-Substrate

(a) Zimtsäure-Methylester (CA-Me); **(b)** *p*-Cumarsäure-Methylester (*p*CU-Me); **(c)** Ferulasäure-Methylester (FA-Me); **(d)** Kaffeesäure-Methylester (KA-Me); **(e)** Sinapinsäure-Methylester (SA-Me); **(f)** Chlorogensäure.

FAE akzeptieren eine große Vielfalt an Zimtsäure-Derivaten. Das Substratspektrum umfasst die unsubstituierte Zimtsäure (Fig. 1-9a) sowie ihre hydroxylierten und methoxylierten Abkömmlinge. Hierbei können die Positionen 2 bis 5 mit allen

Kombinationen von -OH und -OCH₃, sowohl in Mono-, als auch in Di- und Tri-Substitution besetzt sein (Kroon *et al.*, 1997; Topakas *et al.*, 2005; Vafiadi *et al.*, 2006). Aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit der meisten Methylester der Zimtsäurederivate haben sich diese als Standardsubstrate zum FAE-Nachweis und zur Charakterisierung etabliert (vgl. Kapitel 1.4.5).

1.4.2 Klassifizierung von FAE

Auf Basis empirischer Beobachtungen der Substratpräferenzen von FAE wurden Enzym-Typen definiert; die Kategorisierung in vier verschiedene FAE-Typen A–D wurde zudem durch Sequenz-Homologien unterstützt (Crepin *et al.*, 2004a). Maßgeblich für die Typisierung ist das Hydrolyseverhalten der Substrate *p*-Cumarsäure-Methylester, Ferulasäure-Methylester, Kaffeesäure-Methylester und Sinapinsäure-Methylester (Fig. 1-9). Die Hydrolyse aller Substrate resultiert in Abhängigkeit der Sequenz-Homologie in einer Typ-C oder -D FAE (Tab. 1-2). Sofern Kaffeesäure-Methylester nicht als Substrat akzeptiert wird, resultiert eine Typ-A FAE, und sofern Sinapinsäure-Methylester nicht hydrolysiert wird, eine Typ-B FAE (Crepin *et al.*, 2004a).

Die Kategorisierung der FAE wurde in einem zweiten Schritt durch Ergänzung phylogenetischer Analysen auf sieben Kategorien erweitert (Benoit *et al.*, 2008). Ein dritter Klassifizierungsvorschlag wurde vor zwei Jahren auf Basis Deskriptor-basierter Sequenzanalysen in Verbindung mit pharmakophoren Modellen vorgestellt. Anhand der Analyse von 356 FAE-Aminosäure-Sequenzen – die meisten hypothetischer Natur, da aus Genomprojekten annotiert – wurden 12 FAE-Familien mit insgesamt 32 FAE-Untergruppen abgeleitet (Udatha *et al.*, 2011). Bis heute findet man bei Veröffentlichungen jedoch nur die Bezugnahme auf das erste FAE-Modell mit den Typen A–D, da nicht immer Sequenzinformationen der Enzyme verfügbar sind und ein Server zur Deskriptor-basierten FAE-Sequenzanalyse nicht zur Verfügung steht.

Tab. 1-1 | Klassifizierung von FAE auf Basis der Substratspezifität und Sequenz-Homologie (nach Crepin *et al.*, 2004a)

	FAE Typ-A	FAE Typ-B	FAE Typ-C	FAE Typ-D
Hydrolyase von Methyl-Estern	<i>p</i> CU-Me, FA-Me, SA-Me	<i>p</i> CU-Me, FA-Me, KA-Me	<i>p</i> CU-Me, FA-Me, KA-Me, SA-Me	<i>p</i> CU-Me, FA-Me, KA-Me, SA-Me
Freisetzung von Di-Ferulasäure	ja (5-5)	nein	nein	ja (5-5)
Sequenz-Homologie	Lipase	Kohlenhydrat-Esterase Klasse 1 und Acetyl-Xylan-Esterase	Chlorogensäure-Esterase und Tannase	Xylanase
Enzym-Beispiel	AnFaeA bzw. FAE-III aus <i>Aspergillus niger</i> (Faulds <i>et al.</i> , 1994)	FoFaeB bzw. FoFAE-I aus <i>Fusarium oxysporum</i> (Topakas <i>et al.</i> , 2003b)	TsFaeC aus <i>Talaromyces stipitatus</i> (Garcia-Conesa <i>et al.</i> , 2004)	NcFaeD aus <i>Neurospora crassa</i> (Crepin <i>et al.</i> , 2004b)

Abkürzungen: *p*-Cumarsäure-Methylester (*p*CU-Me); Ferulasäure-Methylester (FA-Me); Kaffeesäure-Methylester (KA-Me); Sinapinsäure-Methylester (SA-Me); Strukturen siehe Fig. 1-9; 5-5-Di-Ferulastruktur vgl. Fig. 1-5.

1.4.3 3D-Strukturen von FAE

Bis heute wurden Kristallstrukturen von lediglich drei verschiedenen FAE aus den Organismen *Aspergillus niger* (Faulds *et al.*, 2005; Hermoso *et al.*, 2004), *Butyrivibrio proteoclasticus* (Goldstone *et al.*, 2010) und *Clostridium thermocellum* (Blum *et al.*, 2000; Schubot *et al.*, 2001) publiziert. Die dreidimensionalen Strukturen dieser FAE entsprechen der kanonischen α/β -Hydrolasefaltung (vgl. Kapitel 1.3). In Fig. 1-10 ist exemplarisch die Sekundärstruktur der AnFaeA aus *A. niger* dargestellt. Sie besteht aus neun großen, teils antiparallel angeordneten β -Strängen und zwei kleineren zwei-Strang β -Strukturen sowie sieben Helices. Die katalytische Triade ist aus dem Nukleophil Serin (133), dem Säurerest Asparaginsäure (194) und dem absolut konservierten Histidin (247) zusammengesetzt (Fig. 1-10). Das Serin bildet mit dem Pentapeptid G-X-S-X-G (X: beliebiger Rest) den Richtung Lösungsmittel exponierten nukleophilen Ellenbogen mit einem stark negativen elektrostatischen Potential (Hermoso *et al.*, 2004).

Die katalytischen Reste Ser, Asp, His in Verbindung mit dem konservierten Pentapeptid-Motiv G-X-S-X-G wurden als Gemeinsamkeit und Kriterium aller bis 2011 sequenzierten FAE formuliert (Udatha *et al.*, 2011). Die Analyse der von Udatha *et al.* (2011) kumulierten 321 FAE-Sequenzen zeigt, dass die katalytische Triade zu 77 % aus der Reihenfolge Ser-Asp-His, gefolgt von Asp-Ser-His (12 %) und His-Ser-Asp (11 %) zusammengesetzt war. Neuste Veröffentlichungen, die über die ersten FAE aus Basidiomyceten berichten,

präsentieren eine alternative katalytische FAE-Triade. Das aktive Zentrum der FAE Est1 und PeFaeA aus *Pleurotus sapidus* respektive *P. eryngii* besteht aus Serin, Glutaminsäure und Histidin (Linke *et al.*, 2013; Nieter *et al.*, 2014). Der Austausch der Aminosäure Asparaginsäure durch Glutaminsäure in diesen Basidiomyceten mag eine neue Unterklasse an FAE begründen; weitere Sequenzinformationen basidiomycetischer FAE sind von Nöten, um neue Systematiken abzuleiten.

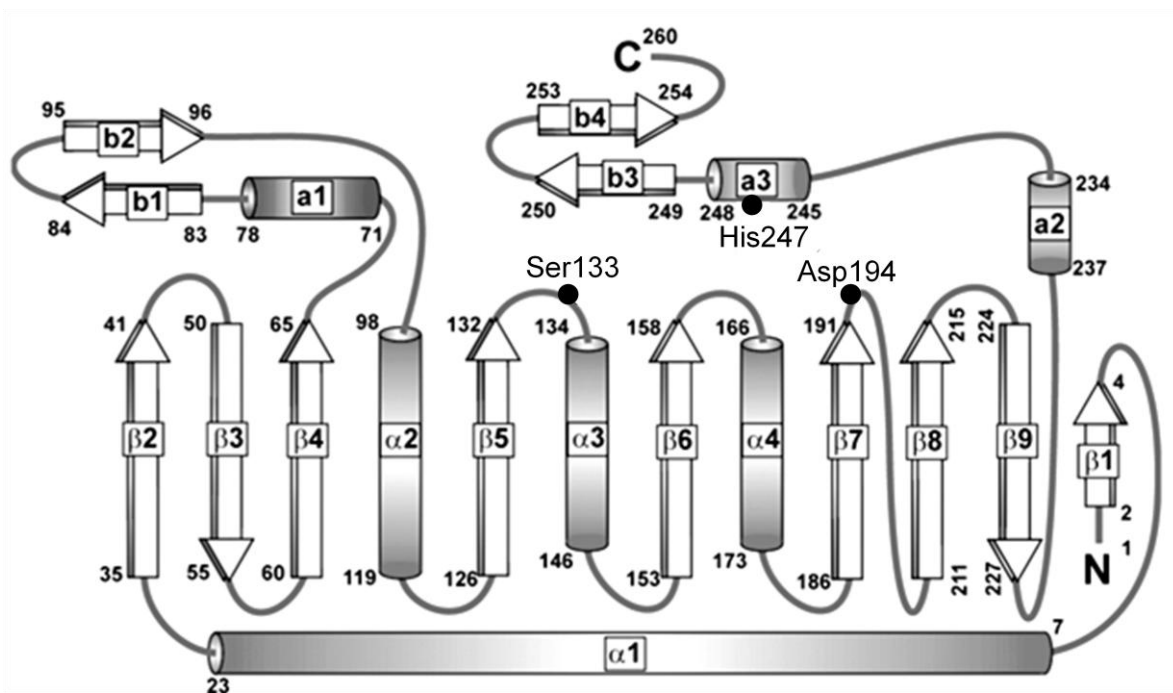


Fig. 1-10 | Strukturdiagramm der AnFaeA aus *Aspergillus niger* (nach Hermoso *et al.*, 2004)

α -Helices wurden durch graue Zylinder, β -Faltblattstrukturen durch weiße Pfeile dargestellt. Die katalytische Triade ist durch schwarze Punkte gekennzeichnet und besteht aus dem Nukleophil Ser133, dem Säurerest Asp194 und dem konservierten His247.

1.4.4 Katalytischer Mechanismus von FAE

Der katalytische Mechanismus der FA-Esterhydrolyse bzw. der Veresterung entspricht dem katalytischen Prinzip anderer Esterasen und Lipasen. In einem ersten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff des katalytischen Serins an den Carbonylkohlenstoff des Substrates (Fig. 1-11); ein kovalenter tetraedrischer Übergangszustand wird gebildet, der durch die katalytischen Reste Histidin und Asparaginsäure stabilisiert wird. Dieses Intermediat wird zusätzlich durch ein „Oxyanion-Loch“ stabilisiert, welches zwischen dem

negativ geladenen Sauerstoff (ehemals Carbonylsauerstoff) und zwei NH-Gruppen des Hauptstrangs ausgebildet wird. Der Zerfall des kurzlebigen Übergangszustandes führt zur Freisetzung eines Alkohols und des acylierten Serins (Fig. 1-11).

Im nächsten Schritt erfolgt der Angriff eines Nucleophils (Wasser im Falle der Esterhydrolyse bzw. ein Alkohol oder Ester bei der Ver- oder Umesterung) an den Carbonylkohlenstoff (Fig. 1-11). Entsprechend dem initialen Schritt wird der nucleophile Angriff durch die Basenreaktion des katalytischen Histidins unterstützt. Die Reaktion verläuft über einen zweiten tetraedrischen Übergangszustand (nicht in Fig. 1-11 dargestellt), der nachfolgend zur Freisetzung des Produktes und des regenerierten Enzyms führt (Hermoso *et al.*, 2004; Prates *et al.*, 2001; Schubot *et al.*, 2001).

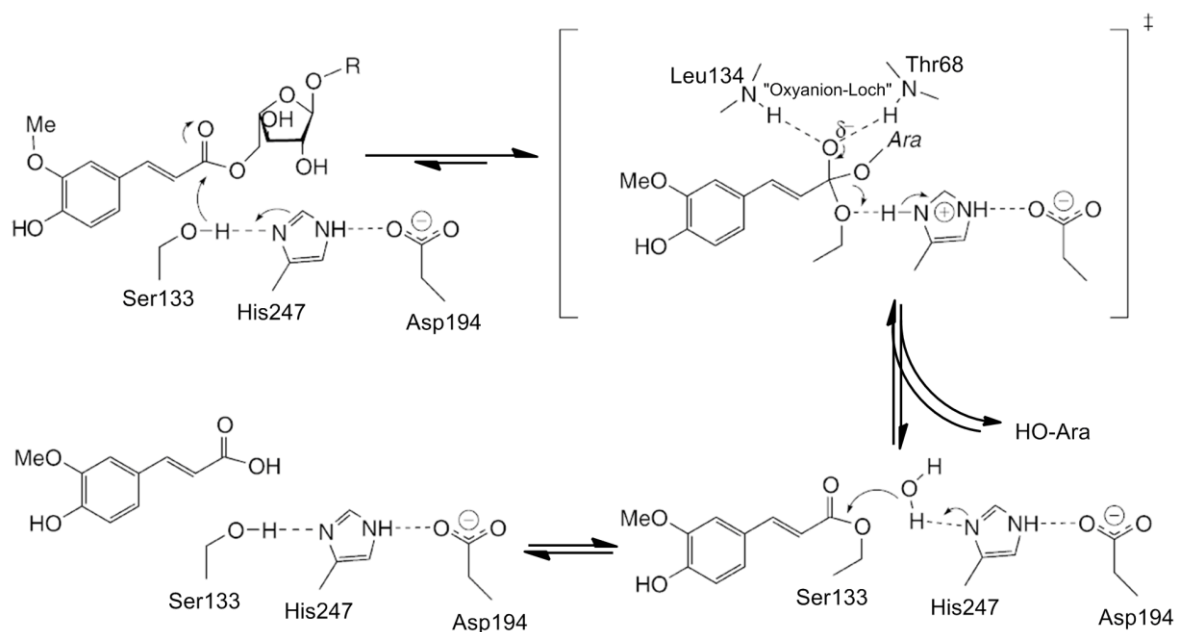


Fig. 1-11 | Katalytischer Mechanismus von FAE (nach Prates *et al.*, 2001)

Die Nummerierung der katalytischen Triade und der „Oxyanion-Lock“-Reste erfolgte auf Basis von AnFaeA aus *A. niger*. Das Substrat der Reaktion ist ein 5-O-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranosyl-Rest; Strukturen von F-A-Resten sind in Fig. 1-8 dargestellt.

1.4.5 Assays für FAE

Der Nachweis von FAE-Aktivität wurde auf mannigfaltige Art und Weise erbracht. Die Assays basieren auf der Inkubation der Esterase mit einem geeigneten Substrat (vgl. 1.4.1)

und der Detektion der hydrolysierten FA. Grundsätzlich ist jedes Detektionssystem zur Separation und Quantifizierung der FA als Assay geeignet.

Allen in der Literatur beschriebenen Assays ist gemein, dass als Substrate zur Detektion und Quantifizierung von FAE-Aktivität stets phenolische Verbindungen Anwendung finden (Tab. 1-2). Das am häufigsten gebrauchte Substrat ist FA-Me, was mit der ubiquitären und kostengünstigen Verfügbarkeit zu erklären ist. FA-Me, wie auch andere Alkylester von Zimtsäurederivaten, zählen jedoch nicht zu den natürlichen FAE-Substraten und sind folglich als artifizielle Hilfssubstrate zu betrachten (vgl. Kapitel 1.4.1).

Natürliche Substrate wie Arabinoxylan, Weizenkleie und Zuckerrübenpektin sind zwar leicht zugänglich, können jedoch nicht in standardisierter Form angeboten und erworben werden; überdies ist bei der Aktivitätsbestimmung unter Verwendung von Heteropolysacchariden häufig eine Co-Inkubation anderer Hydrolasen notwendig (Faulds *et al.*, 2003; Kroon *et al.*, 1996).

Ideale FAE-Substrate sind Hydrolysate von in der Natur vorkommenden Heteropolysacchariden wie F-A, F-AX, F-AXG (vgl. Kapitel 1.4.1 und Fig. 1-8). Diese müssen jedoch in einem aufwändigen Verfahren partiell hydrolysiert und isoliert werden. Die Isolate sind kommerziell nicht verfügbar und finden in der Folge keine regelmäßige und weit verbreitete Anwendung (Allerdings *et al.*, 2006).

Tab. 1-2 | Zusammenfassung literaturbekannter FAE-Assays

FAE-Substrat	Detektionssystem	Literatur
Artifizielle Substrate: Zumeist Ferulasäure-Methylester, aber auch Methyl- und Ethylester anderer Hydroxy-Zimtsäuren wie Cumarsäure, Kaffeesäure und Sinapinsäure, Chlorogensäure	RP-HPLC-UV	Donaghy <i>et al.</i> (1995); Kroon <i>et al.</i> (1997); Sancho <i>et al.</i> (1999); Topakas <i>et al.</i> (2005); Udatha <i>et al.</i> (2011)
Hydrolysate von in der Natur vorkommenden Heteropolysacchariden: Feruloyl- und Cumaroyl-Saccharide wie F-A ^{a)} , F-AX ^{a)} , F-AXX ^{a)} , F-AXG ^{a)} und P-AXX ^{a)}	RP-HPLC-UV	Borneman <i>et al.</i> (1990a); MacKenzie <i>et al.</i> (1988)
Feruloyl- und Cumaroyl-haltige Heteropolysaccharide wie Arabinoxylan, Weizenkleie, Reisspelz, Zuckerrübenpektin	RP-HPLC-UV	MacKenzie <i>et al.</i> (1987); O'Neill <i>et al.</i> (1996)
FA-Me, pCU-ME	GC-FID	Borneman <i>et al.</i> (1990b)
FA-Me	Kapillarzonenelektrophorese	Donaghy <i>et al.</i> (1995); Ji <i>et al.</i> (1999)

FAE-Substrat	Detektionssystem	Literatur
FA-Ethylester	Hof auf Agarplatte / visuelle Detektion	Donaghy <i>et al.</i> (1998); Donaghy <i>et al.</i> (1994)
4-Methylumbelliferyl-Ferulat ^{a), b)}	Fluoreszenz nach UV-Illumination in Verbindung mit IEF- bzw. nativer PAGE-Zymographie	Topakas <i>et al.</i> (2003a); van Tilbeurgh <i>et al.</i> (1985)
4-Methylumbelliferyl- <i>p</i> -Trimethylammonium-Cinnamatchlorid ^{b)} Umbelliferyl-5-O-feruloyl- α -L-Arabinofuranosid ^{a), b), c)}	Fluoreszenz-Detektion mittels <i>Microplate-Reader</i>	Dalrymple <i>et al.</i> (1996); Wagschal <i>et al.</i> (2012); Zhang <i>et al.</i> (2012)
4-Nitrophenyl-5-O- <i>trans</i> -Feruloyl- α -L-Arabinofuranosid ^{a), c)} , 4-Nitrophenyl-2-O- <i>trans</i> -Feruloyl- α -L-Arabinofuranosid ^{a), c)} , 4-Nitrophenyl-Ferulat ^{a), b)} , 2-Chloro-4-Nitrophenyl-Ferulat ^{a), b)}	Fotometer bzw. <i>Microplate-Reader</i> in Verbindung mit chromogenen Substraten	Biely <i>et al.</i> (2002); Hatfield <i>et al.</i> (1991); Mastihuba <i>et al.</i> (2002); Zhang <i>et al.</i> (2012)
FA-Me und feruloylierte Saccharide	Fotometer bzw. <i>Microplate-Reader</i> in Verbindung mit der Detektion verschiedener Absorptionsspektren von FA und FA-Me im basischen Milieu	Ralet <i>et al.</i> (1994a)
FA-Ethylester, Chlorogensäure	Fotometer bzw. <i>Microplate-Reader</i> in Verbindung mit pH-Indikatoren	Janes <i>et al.</i> (1998); Ramirez <i>et al.</i> (2008)

F-A: 5-O-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; F-AX: β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; F-AXG: α -L-Galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-Feruloyl-L-Arabinofuranose; P-AXX: α -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-5-O-*trans-p*-Coumaroyl-L-Arabinofuranose; Strukturen siehe Fig. 1-8.

^{a)} Substrat ist kommerziell nicht verfügbar.

^{b)} Ausgewiesene Autohydrolyse-Empfindlichkeit des Substrates.

^{c)} Die Verwendung des Substrates benötigt die Co-Inkubation einer α -L-Arabinofuranosidase.

Die während der FAE-Inkubation freigesetzte FA wird gemäß dem Gros an Assay-Vorschriften mittels RP-HPLC von ihren Edukten getrennt und anschließend per UV-Detektion quantifiziert (Borneman *et al.*, 1990a; Kroon *et al.*, 1997; MacKenzie *et al.*, 1988; Robbins, 2003). Alternativ wurde in wenigen Fällen die Verwendung der GC-FID (Borneman *et al.*, 1990b) und Kapillarzonenelektrophorese (Donaghy *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1999) zur Analyse von FAE beschrieben (Tab. 1-2).

Eine weitere Nachweismöglichkeit von FAE-Aktivität stellen spektroskopische Verfahren wie die Fluoreszenzspektroskopie und Fotometrie dar. Ein Vorteil dieser Verfahren kann die Möglichkeit der parallelen Messungen mehrerer Proben (*Microplate-Reader*) sein; zudem ist je nach Chromophor eine kinetische Beobachtung des Substratumsatzes gegeben.

Literaturbekannt ist hierzu die Anwendung des kommerziell verfügbaren fluorogenen Substrats 4-Methylumbelliferyl-*p*-Trimethylammonium-Cinnamatchlorid (Dalrymple *et al.*, 1996; Wagschal *et al.*, 2012) und des nach Synthese zugänglichen Umbelliferyl-5-O-Feruloyl- α -L-Arabinofuranosid (Zhang *et al.*, 2012). Ein entscheidender Nachteil der

Umbelliferyl-Substrate ist deren hohe Autohydrolyse-Empfindlichkeit und -Geschwindigkeit. So wurden diese fluorogenen Substrate bisher lediglich für *Screening*-Zwecke ohne Angabe von FAE-Aktivitäten verwendet (Wagschal *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Ein anderes Hymecromon-Derivat, das 4-Methylumbelliferyl-Ferulat, wurde als Zymographie-Substrat eingesetzt; aufgrund zuvor genannter Quantifizierungsinterferenzen verwendeten die Autoren zur Bestimmung der FAE-Aktivität jedoch Weizenkleie in Verbindung mit der HPLC-UV-Analyse der freigesetzten Ferulasäure (Tab. 1-2) (Topakas *et al.*, 2003a).

Neben der Anwendung fluorogener FAE-Substrate ist auch die Verwendung chromogener Moleküle beschrieben. 4-Nitrophenyl-Ferulat und entsprechende Derivate wurden in verschiedenen Studien zur Detektion von FAE verwendet (vgl. Tab. 1-2). Nitrophenyl-Ferulate weisen – entsprechend den Umbelliferyl-Substraten – entscheidende Nachteile auf: eine hohe Autohydrolyse-Empfindlichkeit, die zu Empfindlichkeitsverlusten und eingeschränkten pH-Arbeitsbereichen führt; überdies müssen Nitrophenyl-Ferulate synthetisiert werden, da sie nicht kommerziell zugänglich sind (Biely *et al.*, 2002; Hatfield *et al.*, 1991; Mastihuba *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2012).

Ein alternatives fotometrisches Verfahren ist die Detektion der freien Säure nach der Esterhydrolyse mittels pH-Indikatoren. Der Nachteil dieses Assays liegt in der ausgeprägten pH- und Temperatursensibilität in Verbindung mit geringer Nachweisempfindlichkeit (Tab. 1-2) (Janes *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 2008).

1.4.6 Industrielle Applikationen von FAE und FA

FAE erhalten, wie in Kapitel 1.4 dargestellt, zunehmende Aufmerksamkeit in der Wissenschaft und Wirtschaft. Industrielle Anwendungen lassen sich in drei Sparten unterteilen: 1. gezielte Modifikation der Heteropolysaccharide durch (partielle) Hydrolyse oder Veresterung der FA, 2. Abbau bis vollständige Hydrolyse der Pflanzenbiomasse mittels synergistischer Effekte von FAE und anderen Hydrolasen und 3. Verwertung der natürlich gewonnenen FA als Antioxidans oder Präkursor für Aromastoffe und Feinchemikalien (Fig. 1-12).

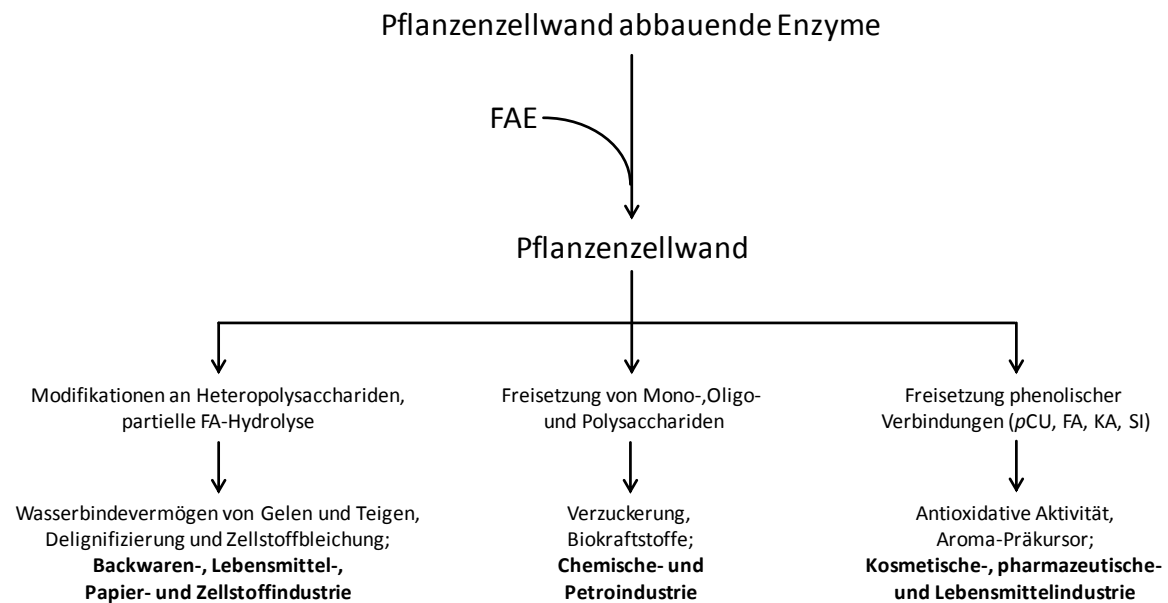


Fig. 1-12 | Schematischer Überblick industrieller Applikationen von FAE und FA (nach Benoit *et al.*, 2008)

In der Papier und Zellstoffindustrie sind Alternativen zum chemischen Aufschluss des Holzstoffs gefragt; ein verstärktes Interesse besteht an der Reduktion des Chloreinsatzes zur Bleichung der Pulpe. Die Modifikation von Hemicellulose und anderen Heteropolysacchariden entspricht dem Wirkungsbereich von FAE. So wurden FAE bereits erfolgreich zur Delignifizierung und zum Abbau von Hemicellulose eingesetzt. Aufgrund der enzymatischen Verringerung von Quervernetzungen konnten Cellulosefasern unter vermindertem Chemikalienverbrauch und reduzierter Abwasserbelastung produziert werden. Überdies wurde mittels enzymatischem Einsatz in einem chlorfreien Prozess die Helligkeit der Pulpe erhöht (Record *et al.*, 2003; Tabka *et al.*, 2006).

Eine weitere Applikation von FAE an Heteropolysacchariden ist die Verbesserung von Mehlen und Teigen. Durch die Hydrolyse von FA-Einheiten wird der (Quer)Vernetzungsgrad von Arabinoxylanen reduziert. Hierdurch können die Wasserbindekapazitäten der Teige erhöht werden. Es wurden stabilisierte Gel-Matrices und verbesserte rheologische Eigenschaften der Teige beobachtet (Faulds *et al.*, 2003).

Die nachhaltige Produktion von Rohstoffen ist ein Kernanliegen der Biotechnologie. Insbesondere die Gewinnung von Biokraftstoffen hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Die Herstellung von Biokraftstoffen aus Lebensmitteln wie Mais, Weizen oder

aber Raps, die zur Verdrängung anderer Kulturpflanzen auf den Ackerflächen führen, entspricht nicht dem Nachhaltigkeitskonzept. Erst die Nutzung Cellulose-, Hemicellulose- und Lignocellulose-haltiger Materialien, die als Seitenströme und Reststoffe der Industrie abfallen, umgeht die Konkurrenz mit Lebensmitteln (Farrell *et al.*, 2006). Die Hydrolyse und Verzuckerung der Heteropolysaccharide benötigt Hydrolasen unter Zuhilfenahme von synergistisch wirkenden FAE (Damásio *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2010; Tabka *et al.*, 2006).

Nicht nur die zuvor beschriebene Modifikation des FAE Substrates ist von wirtschaftlichem Interesse, sondern auch die freigesetzte FA und andere hydrolysierte Phenole. Zimtsäurederivate sind potente Antioxidantien und UV-Absorber (Kikuzaki *et al.*, 2002). Sie finden somit Anwendungen in der kosmetischen, pharmazeutischen und Lebensmittel-Industrie (Kroon *et al.*, 1999).

FA dient überdies als Präkursor für Aromastoffe wie Vanillin und 4-Vinylguajacol. Verschiedene bakterielle wie fungale Systeme wurden entwickelt, um Vanillin – die wichtigste Komponente zum Aromatisieren von Lebensmitteln, Getränken, Parfums und Pharmazeutika – per Biotransformation aus FA zu gewinnen (Lesage-Meessen *et al.*, 2002; Priefert *et al.*, 2001; Walton *et al.*, 2000). 4-Vinylguajacol, ein intensiv nach Rauch riechender Aromastoff, ist von FA ausgehend mittels Decarboxylasen einfach zugänglich (Donaghy *et al.*, 1999; Mathew *et al.*, 2006).

Enzymatisch hydrolysierte FA aus Pflanzenmaterialien trägt das Attribut „natürlich“ im Sinne der Aromen-Verordnung (EG) Nr. 1334/2008. Biotransformationen mit natürlicher FA führen zu natürlichen Aromen wie Vanillin oder 4-Vinylguajacol, die einen wesentlich höheren Marktpreis erzielen, als ihre synthetisch gewonnenen Pendanten (Mathew *et al.*, 2006).

Derzeit ist natürliche FA auf dem Weltmarkt schwer und insbesondere nur zu hohen Preisen verfügbar, so dass zuvor genannte biotechnologische Prozesse aufgrund der Rohstoffpreise nicht wirtschaftlich sind. In Anbetracht des ubiquitären Vorkommens gebundener FA (vgl. Kapitel 1.2) könnte mittels FAE in der Zukunft preisgünstige natürliche FA verfügbar werden.

1.5 Laccasen

Laccasen (EC 1.10.3.2) sind ausführlich studierte Enzyme. Die ersten wissenschaftlichen Studien über Laccasen wurden bereits im 19. Jahrhundert im Zusammenhang mit *Rhus vernicifera*, dem japanischen Lackbaum (Yoshida, 1883), und Pilzen (Bertrand, 1896) veröffentlicht. Laccasen werden typischerweise in Pflanzen und Pilzen gefunden (Mayer *et al.*, 2002). In Pflanzen sind sie an dem Mechanismus der radikal-basierten Polymerbildung des Lignins beteiligt (Baldrian, 2006; Boudet, 2000; Mayer *et al.*, 2002). In Pilzen werden den Laccasen verschiedene Aufgaben wie der Morphogenese, Pathogenese und der Stressabwehr zuteil (Thurston, 1994). Das primäre katalytische Ziel liegt jedoch in dem Ligninabbau (Baldrian, 2006).

Laccasen wurden in einer Reihe von Ascomyceten detektiert und biochemisch charakterisiert; die Hauptzahl der Laccasen entfällt jedoch auf die Basidiomyceten (Baldrian, 2006). Insbesondere die Spezies der in Kapitel 1.1.2 beschriebenen Holzfäulepilze sekretieren Laccasen (Baldrian, 2006; Eastwood *et al.*, 2011; Floudas *et al.*, 2012; Hatakka, 2001). Gemäß dem Zielsubstrat der Laccasen, dem Lignin, liegt dieses Enzym zumeist extrazellulär vor. In Weißfäulepilzen wurde jedoch – im Gegensatz zu Lignin- und Mangan-Peroxidasen – Laccaseaktivität häufig intra- sowie extrazellulär detektiert (Baldrian, 2006; Blauch *et al.*, 1975).

Bei Laccasen handelt es sich um Oxidoreduktasen. Sie katalysieren ein-Elektronen-Oxidationen einhergehend mit der vier-Elektronen-Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Laccasen besitzen 4 Kupferionen unterschiedlicher Koordination und werden der Gruppe der blauen Multikupfer-Oxidasen zugeordnet. In Fig. 1-13 ist der katalytische Zyklus von Laccasen schematisch dargestellt. Phenolische Substrate werden mittels Typ-1 Kupfer (T1) oxidiert; die Elektronen werden im Anschluss über ein konserviertes His-Cys-His Tripeptid-Motiv zu den Typ-2 und -3 Kupfer-Positionen (ein T2, zwei T3) transferiert. Hier findet die Reduktion des molekularen Sauerstoffs zu Wasser statt (Fig. 1-13) (Baldrian, 2006; Messerschmidt, 1997; Rodgers *et al.*, 2010).

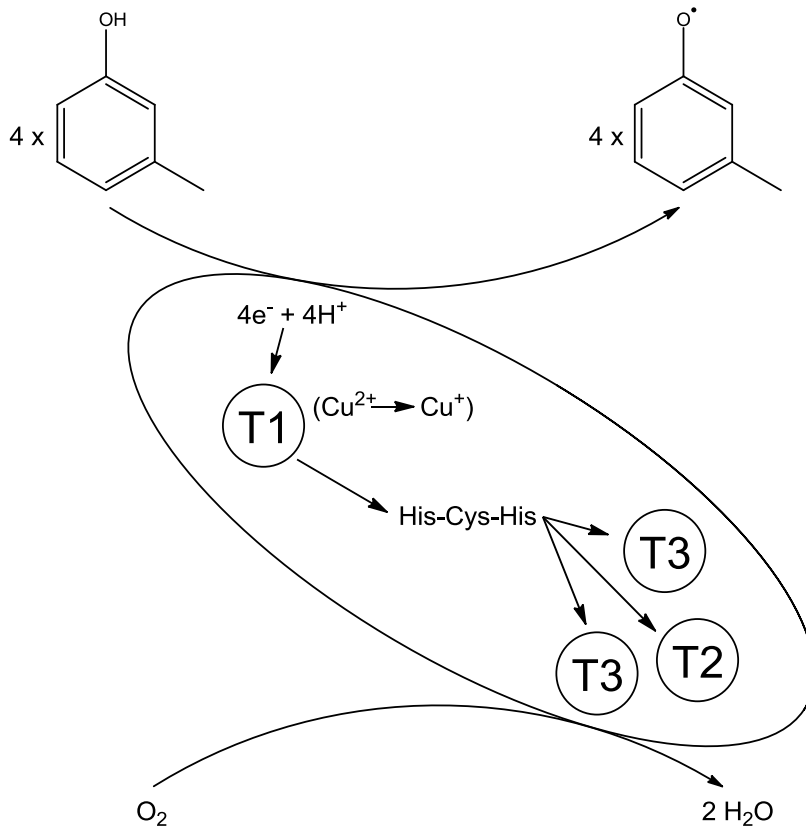


Fig. 1-13 | Katalytischer Zyklus von Laccasen (nach Baldrian, 2006)

Phenole werden in vier ein-Elektronenübergängen an dem Typ-1 Kupfer (T1) oxidiert. Über ein konserviertes His-Cys-His-Motiv werden die Elektronen an die Typ-2 und -3 Kupfer-Atome (T2, T3) übertragen. An dem trinuklearen T2/T3 Kupfercluster findet die Reduktion des Sauerstoffs zu Wasser statt.

Laccasen weisen ein breites Substratspektrum auf. Sie katalysieren die Oxidation verschiedener Verbindungsklassen wie Phenole, Diphenole, methoxy-substituierte Phenole, Polyphenole, Aminophenole, Lignin, Polyamine und Arylamine (Majeau *et al.*, 2010; Morozova *et al.*, 2007; Thurston, 1994).

Der Nachweis von Laccaseaktivität ist sowohl mittels phenolischer, wie auch nicht-phenolischer Verbindungen üblich. Etabliert haben sich insbesondere die chromogenen Substrate 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) und 2,6-Dimethoxyphenol (Fig. 1-14) (Majcherczyk *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2012).

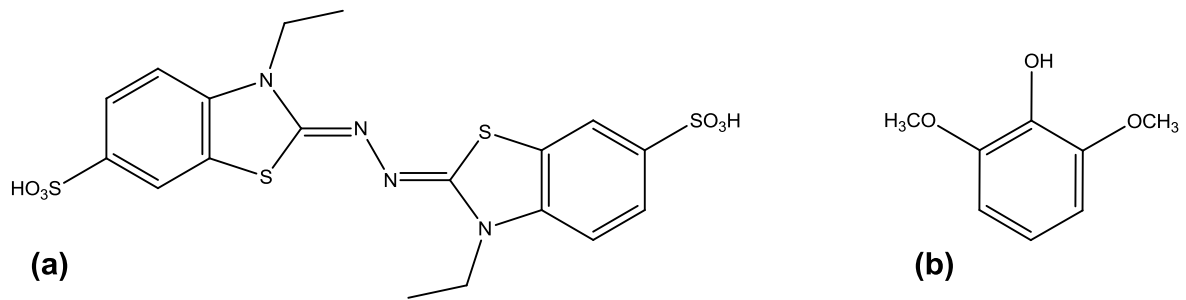


Fig. 1-14 | Chromogene Laccasesubstrate

(a): 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS); (b): 2,6-Dimethoxyphenol (Syringol).

1.6 Ziele der Arbeit

FAE unterliegen einem stetig steigenden Interesse. Trotz intensiver FAE-Forschung seit 25 Jahren waren zu Beginn vorliegender Arbeit auf dem Markt keine FAE kommerziell verfügbar. Erstes Ziel war somit die Detektion neuer FAE, um zukünftig alternative und potente Enzyme bereitstellen zu können.

Recherchen zu Beginn dieser Arbeit ergaben, dass die charakterisierten FAE insbesondere dem Reich der Pilze, unter diesen jedoch ausschließlich der Abteilung der Ascomyceten, zuzuordnen waren. Es galt den wissenschaftlichen Rückstand basidiomycetischer FAE zu ergründen und neue Enzyme aus dieser Abteilung zu erforschen. Hierzu sollten verschiedene Nachweis- und Detektionsverfahren geprüft und alternative Protokolle entwickelt werden. Die Robustheit und Praxistauglichkeit einer ausgewählten Methode sollte in einem umfassenden Screening mit Basidiomyceten erprobt werden. Darüber hinaus sollten andere Enzymaktivitäten wie Carboxylesterasen überwacht und verschiedene Kultivierungsbedingungen getestet werden. Abschließend sollten die kumulierten Daten evaluiert und miteinander in Bezug gesetzt werden.

Das Enzym eines FAE-aktiven Basidiomyceten sollte unter Entwicklung einer Proteinreinigungsstrategie isoliert und charakterisiert werden. Ausführliche Substratanalysen in Verbindung mit Aminosäure-Sequenzanalysen sollten die Grundlage für den Vergleich mit anderen FAE aus Ascomyceten und Bakterien legen.

2. Vorwort zur Publikation „Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase“

Wie in Kapitel 1.4 dargestellt, ist das Vorkommen von FAE in der Natur ubiquitär, wobei die meisten beschriebenen FAE dem Reich der Pilze zuzuordnen sind. Eine umfassende Literaturanalyse ergab, dass zu Beginn der Arbeiten zu nachfolgender Veröffentlichung keine FAE aus Basidiomyceten, jedoch zahlreiche FAE aus deren nächsten Verwandten, den Ascomyceten, publiziert waren.

Das Habitat der Basidiomyceten, Hemicellulose-reiche und somit FA-haltige Materialien (Kapitel 1.1), sowie die Vielfalt an detektierten FAE in anderen Pilzen ließen annehmen, dass Basidiomyceten gute Produzenten FA-Ester spaltender Enzyme sind.

Demzufolge wurden Kulturen verschiedener Basidiomyceten mit artifiziellen und natürlichen Substraten der Tab. 1-2 inkubiert und hinsichtlich ihrer FAE-Aktivität mittels HPLC-UV analysiert. Darüber hinaus wurden auch fotometrische FAE-Assays unter Verwendung von 4-Nitrophenyl-Ferulat sowie FA-Me in Verbindung mit pH-Indikatoren getestet (vgl. Kapitel 1.4.5).

In allen Fällen war eine Auswertung der Assays nicht möglich, da das Substrat und/oder das Produkt, die freigesetzte FA, nicht detektierbar waren. Analysen zeigten, dass der Verlust an Substrat/Produkt auf Oxidoreduktase-Aktivität, die zur Oligo- und Polymerisierung der Phenole führte, zurückzuführen war. Insbesondere Laccasen, die zur Katalyse neben Phenolen nur den omnipräsenten Sauerstoff als Elektronenakzeptor benötigen (Kapitel 1.5), kommen in Basidiomyceten ubiquitär vor (vgl. Kapitel 1.1.2).

Um der Beeinträchtigung des FAE-Nachweises durch Oxidoreduktasen wie Laccasen zu begegnen, wurde ein neuer Assay konzipiert. Nachfolgende Publikation beschreibt die Anwendung des entwickelten FAE-Assays in Verbindung mit der mittelbaren und unmittelbaren Detektion von Laccasen. Die Ergebnisse eines umfassenden Screenings zeigen die Fülle und Diversität basidiomycetischer FAE.

3. Detection of feruloyl- and cinnamoyl esterases from basidiomycetes in the presence of interfering laccase

Highlights

- A simple method for the detection of CAE/FAE in the presence of laccase.
- More than half of the 41 tested basidiomycetes exhibited CAE/FAE activity.
- Different substrate specificity of basidiomycete CAE/FAEs was evaluated.
- Tween 80 induced CAE/FAE activity.
- A comprehensive study on basidiomycete sources of CAE/FAEs is provided.

Abstract

Little is known on basidiomycete sources of feruloyl esterases (FAEs), although many wood-rotting representatives of these fungi typically grow on feruloyl-rich substrates. A major reason is that the almost ubiquitous presence of laccases interferes with the detection of FAE activity. Laccases polymerize the liberated ferulic acid (FA) *in situ*, thus detracting the product of enzymatic hydrolysis from its detection. A rapid HPLC-UV method was developed to detect the loss of FA, but also to quantify the hydrolysis of FA esters. The method allows at the same time to evaluate the substrate specificity of a FAE. Forty one basidiomycetes were tested for their FAE activities, and 25 out of the set were positive. The basidiomycetes hydrolyzing cinnamates with the highest conversion rates were *Auricularia auricula-judae* and *Marasmius scorodonium*. Moreover, a new FAE inducer, the nonionic detergent Tween 80, was found. This is the first comprehensive study on basidiomycete sources of FAEs.

Keywords

Fungi, basidiomycete, feruloyl esterase, laccase, biofuels.

3.1 Introduction

Feruloyl esterases (FAEs, also known as ferulic acid esterase, cinnamoyl esterase (CAE) and cinnamic acid hydrolase; EC 3.1.1.73) liberate ferulic acid and cinnamic acid derivatives from naturally occurring hemicelluloses and pectins (Topakas *et al.*, 2007). Hemicelluloses, after cellulose the second most common polysaccharides in nature, represent about 20–35 % of the lignocellulosic biomass (Saha, 2003). Therefore, the potential industrial applications of FAEs are wide. It has been reported that saccharification, hence bioethanol production, can be enhanced by synergistic effects between cellulases, xylanases and FAEs (Tabka *et al.*, 2006). Furthermore, FAEs can be used synergistically with xylanases and laccases in the pulp and paper industries to support delignification and pulp bleaching (Record *et al.*, 2003). The release of ferulic acid by enzymatic degradation of natural agricultural byproducts and its biotransformation into the flavouring compounds vanillic acid and vanillin is important as well (Lesage-Meessen *et al.*, 2002). FAE degradation products, such as ferulic and other hydroxycinnamic acids, are also of significance in the cosmetic and pharmaceutical industries due to their antioxidant properties (Kikuzaki *et al.*, 2002).

FAEs have been discussed in detail in recent reviews (Benoit *et al.*, 2008; Koseki *et al.*, 2009; Topakas *et al.*, 2007; Udatha *et al.*, 2011). FAEs from basidiomycetes were mentioned as hypothetical/predicted proteins from *Coprinopsis cinerea* okayama7#130, *Laccaria bicolor* S238N-H82, *Moniliophthora perniciosa* FA553, *Postia placenta* Mad-698-R, *Ustilago hordei* and *Ustilago maydis* 521 (Udatha *et al.*, 2011). There are no publications on biochemically characterized FAEs from the large division of basidiomycetes. Only few publications mentioned the presence of FAEs in basidiomycetes. MacKenzie *et al.* (1988) partially purified an esterase of *Schizophyllum commune* which released ferulic acid from starch-free wheat bran. Hashimoto *et al.* (2010) cloned an extracellular carbohydrate esterase (CcEst1) from *Coprinopsis cinerea*. The recombinant CcEst1, expressed in *Pichia pastoris*, exhibited a FAE side activity which was more than 50-fold lower than the activity against *p*-nitrophenyl acetate (Hashimoto *et al.*, 2010). Work aiming at the saccharification and biodegradation of wheat straw mentioned FAE activity of crude extracts of six solid state cultivated basidiomycetes (Dias *et al.*, 2010; Dinis *et al.*, 2009). The natural habitat and substrate of basidiomycetes, hemicellulose rich material, suggests these

microorganisms as potential producers of FAE; therefore the lack of in-depth publications is remarkable.

FAEs have mostly been assayed using the synthetic substrate ferulic acid methyl ester (FAME), whereat the liberated product ferulic acid is quantified by HPLC (Borneman *et al.*, 1990b). Alternatively, FAE activity is assayed spectrophotometrically based on different absorption spectra of esterified and free phenolic acid derivatives (Ralet *et al.*, 1994a). Other substrates used were de-starched wheat bran (O'Neill *et al.*, 1996), arabinofuranosyl esters of ferulic acid (Hatfield *et al.*, 1991) and *p*-nitrophenyl ferulate as a spectrophotometric substrate, respectively (Biely *et al.*, 2002; Mastihuba *et al.*, 2002). All common FAE assay substrates are, at the same time, laccase (EC 1.10.3.2) substrates (Baldrian, 2006; Felici *et al.*, 1985). Basidiomycetes, especially white-rot fungi, produce laccases and other oxidoreductases, such as catechol oxidases, peroxidases and monophenol monooxygenases acting on ferulic acid and derivatives (Baldrian, 2006). The enzymatic oxidation of phenolic compounds by laccase generates radicals that react with each other to form dimers, oligomers or polymers (Claus, 2004). As a result, the FAE substrate(s) (ferulic acid ester derivatives) and the FAE product (ferulic acid) will neither be present nor detectable. These analytical difficulties might be the major reason for the lack of FAEs reported from basidiomycetes.

Unambiguous determination of FAE activity is best achieved by purification of the protein to electrophoretic homogeneity. While analyzing non-purified intra- and extracellular organism samples, particularly for the detection of new FAE active organisms, a robust method, ideally using multiple substrates, is needed to discover false negative results. In this study, numerous basidiomycetes were screened for FAEs using a new method able to detect FAEs despite substrate and product polymerization.

3.2 Methods

3.2.1 Chemicals and enzymes

All chemicals were of highest purity grade and were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma–Aldrich (Taufkirchen, Germany).

Ferulic acid methyl ester was from Alfa Aesar (99 %, Karlsruhe, Germany). 3,4,5-trimethoxycinnamic acid methyl ester was synthesized according to literature (Borneman *et al.*, 1990b). *Aspergillus niger* feruloyl esterase AnFaeA was provided from Sternenzym (Ahrensburg, Germany); laccase C (*Trametes spec.*) was from ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Germany).

3.2.2 Basidiomycete strains

41 basidiomycetes strains used in this study were mainly purchased from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, Netherlands) and from the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany): *Agaricus arvensis* (DSMZ, No. 8327), *Auricularia auricula-judae* (DSMZ, No. 11326), *Auriporia aurea* (CBS, No. 294.71), *Bjerkandera adusta* (CBS, No. 230.90), *Collybia fusipes* (CBS, No. 414.79), *Cyathus julietae* (CBS, No. 373.80), *Fomes fomentarius* (DSMZ, No. 1182), *Ganoderma applanatum* (CBS, No. 250.61), *Ganoderma lucidum* (DSMZ, No. 9621), *Grifola frondosa* (CBS, No. 480.63), *Hericium erinaceus* (CBS, No. 260.74), *Ischnoderma benzoinum* (CBS, No. 311.29), *Kuehneromyces mutabilis* (DSMZ, No. 1684), *Lentinula edodes* (CBS, No. 808.91), *Lepista nuda* (CBS, No. 376.80), *Lycoperdon perlatum* (DSMZ, No. 8678), *Macrolepiota procera* (DSMZ, No. 3399), *Marasmius scorodonius* (CBS, No. 137.83), *Micromphale foetidum* (CBS, No. 208.47), *Nidularia pulvinata* (CBS, No. 251.84), *Phallus impudicus* (DSMZ, No. 3400), *Phanerochaete chrysosporium* (DSMZ, No. 1547), *Phellinus pini* (DSMZ, No. 5238), *Phellinus robustus* (CBS, No. 100119), *Pleurotus dryinus* (DSMZ, No. 5178), *Pleurotus eryngii* (CBS, No. 458.79, 613.91), *Pleurotus flabellatus* (DSMZ, No. 8299), *Pleurotus floridanus* (Department of Forest Botany and Tree Physiology, Göttingen, Germany), *Pleurotus ostreatus* (DSMZ, No. 1833), *Pleurotus pulmonarius* (DSMZ, No. 5331), *Pleurotus sapidus* (DSMZ, No. 8266), *Polyporus umbellatus* (CBS, No. 483.72), *Postia placenta* (United States Department of Agriculture, Washington, USA, No. Mad-698-R), *Pycnoporus sanguineus* (CBS, No. 614.73), *Rhodotus palmatus* (CBS, No. 231.91), *Stereum rugosum* (DSMZ, No. 6467), *Trametes suaveolens* (DSMZ, No. 5237), *Trametes versicolor* (DSMZ, No. 11309), *Tremella mesenterica* (DSMZ, No. 1557) and *Xerula radicata* (DSMZ, No. 4830).

3.2.3 Culture conditions

The strains were inoculated on standard nutrient liquid (SNL)-agar and maintained at 4 °C.

SNL was prepared on the basis of the Sprecher medium: D-(+)-glucose-monohydrate 30.0 g L⁻¹, L-asparagine monohydrate 4.5 g L⁻¹, yeast extract 3.0 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1.5 g L⁻¹, MgSO₄ 0.5 g L⁻¹; trace element solution (1.0 mL L⁻¹ (FeCl₃·6H₂O 0.08 g L⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0.09 g L⁻¹, MnSO₄·H₂O 0.03 g L⁻¹, CuSO₄·5H₂O 0.005 g L⁻¹, Titriplex III (EDTA) 0.4 g L⁻¹); adjusted to pH 6.0 with 1 M NaOH. For preparing SNL-agar medium, agar (15 g L⁻¹) was added to SNL.

For Tween 80 nutrient liquid (TW-SNL), SNL was prepared with only 10 g L⁻¹ D-(+)-glucose-monohydrate and additionally with Tween 80 (4 g L⁻¹).

To prepare submerged cultures, 10 × 10 mm agar plugs with mycelium were inoculated into a 300 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL SNL and TW-SNL, respectively, and homogenized using an Ultra Turrax (Micra Art, Müllheim, Germany). Cultures were kept for 18 days at 24 °C on a rotary shaker (Infors, Bottmingen, Switzerland) at 150 rpm. Esterase and laccase activity was measured at least every third day in the culture supernatant after removing the mycelia by centrifugation.

Sixteen basidiomycetes were cultivated in both SNL and TW-SNL, 17 were cultivated in SNL and 8 were cultivated in TW-SNL. Fifty seven cultivations were performed in sum.

3.2.4 Enzyme assays

The molar conversion rate of cinnamic acid methyl ester derivatives to their free acids was determined by HPLC. 0.75 mL of culture supernatant was added to 0.66 mL of cinnamic acid methyl ester (3-phenylprop-2-enoic acid methyl ester, CA-ME, 0.33 mM), 3,4,5-trimethoxycinnamic acid methyl ester (3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid methyl ester, 3,4,5-MeO-CA-ME, 0.33 mM) and ferulic acid methyl ester (3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid methyl ester, FA-ME, 0.33 mM) in 50 mM TRIS pH 7.0 and incubated at 37 °C for 15 h. The reaction was terminated by the addition of 0.25 mL acetonitrile. An aliquot of the supernatant was analyzed by HPLC with a Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 reverse-phase column (Merck, Darmstadt, Germany).

Substrates were separated from the products using a step-wise gradient at a flow velocity of 1.5 mL min⁻¹: 20 µL sample loaded in 90 % buffer A (0.05 % formic acid), 10 % buffer B (acetonitrile); 10–50 % buffer B in 13.5 min; 50–100 % buffer B in 1 min; 100 % buffer B for 2.5 min; 100–10 % buffer B in 0.5 min; re-equilibrate with 10 % buffer B for 1 min; total run time 18.5 min. Additionally, an optimized gradient program was developed: 10–36 % buffer B in 7.5 min; 36–66 % buffer B in 2.8 min; 66–100 % buffer B in 0.2 min; 100 % buffer B for 2 min; 100–10 % buffer B in 0.5 min; re-equilibrate with 10 % buffer B for 1 min; total run time 14 min.

Substance elution was detected at 277 nm (CA and CA-ME), 302 nm (3,4,5-MeO-CA and 3,4,5-MeO-CA-ME) and 323 nm (FA and FA-ME) using a HP 1050 multiple wavelength detector (79854A MWD, Hewlett–Packard GmbH, Waldbronn, Germany).

Loss of FA and FA-ME, expressed as % recovery of FA/FA-ME, was calculated as follows:

$$\% \text{ recovery FA/FA-ME} = \frac{c(\text{FA}) + c(\text{FA-ME})}{c(3,4,5\text{-MeO-CA}) + c(3,4,5\text{-MeO-CA-ME})} \times 100$$

. The basis of calculations were molar concentrations.

Laccase activity was determined at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in a microtiter plate at 30 °C using ABTS (Majcherczyk *et al.*, 1999) as a substrate. The reaction mixture contained 0.5 mM substrate in 100 mM tartrate buffer at pH 4.5 and a culture supernatant in a total volume of 300 µL. The increase of absorbance was monitored over 10 min in a Synergy 2 Microplate reader (BioTek, Bad Friedrichshall, Germany). One unit of enzyme activity was defined as 1 µmol of substrate oxidized per minute under the experimental conditions used.

Esterase activity was determined at 410 nm in a microtiter plate at 37 °C using 4-nitrophenyl butanoate as a substrate. The reaction mixture contained 1.25 mM substrate in 88 mM phosphate buffer at pH 7.0, 0.1 % Triton X-100 and a culture supernatant in a total volume of 200 µL. The formation of 4-nitrophenol was measured at 410 nm in a Synergy 2 Microplate reader. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 µmol of 4-nitrophenol per minute under the experimental conditions used. Activity assays were performed in triplicates, and standard deviation was found below 10 % if not mentioned otherwise.

3.3 Results and discussion

3.3.1 Analysis of FAEs in basidiomycetes

Direct detection of FAEs in culture supernatants of basidiomycetes using ferulic acid derivatives as substrates is impossible, if active laccases or other oxidoreductases are present. The enzymatic oxidation of phenolic compounds by laccase generates radicals that react with each other to form dimers, oligomers or polymers (Claus, 2004). In consequence, the FAE substrate ferulic acid methyl ester and other ferulic acid ester derivatives as well as the FAE product ferulic acid are neither present nor detectable. Therefore an HPLC assay using three different FAE substrates simultaneously was established to avoid a false negative result. The assay contained the common FAE substrate ferulic acid methyl ester (FA-ME), cinnamic acid methyl ester (CA-ME) and 3,4,5-trimethoxycinnamic acid methyl ester (3,4,5-MeO-CA-ME) the latter two being no laccase substrates due to missing phenolic groups. All three esters were used simultaneously in equimolar concentrations and were incubated with culture supernatant. Supplementary Fig. 3-4 shows exemplary the detection of all three methyl esters provided after incubation with *P. dryinus* culture supernatant (TW-SNL) of culture day one. No hydrolysis of an ester and no loss of FA/FA-ME was observed; thus the chromatogram of Fig. 3-4a represents the methyl ester standards. On day ten of cultivation, 90 mol-% hydrolysis of CA-ME (UV lane 277 nm) and 6 mol-% hydrolysis of 3,4,5-MeO-CA-ME (UV lane 302 nm) was detected (Fig. 3-4b). There was no evidence for a FA-ME esterase, because all FA and FA-ME was polymerized (Fig. 3-4b UV lane 323 nm). Despite the complete conversion of FA and FA-ME, a cinnamic acid esterase was detected using the substrates CA-ME and 3,4,5-MeO-CA-ME.

3.3.2 Recovery rate of FA and FA-ME vs. laccase activity

Due to the equimolar concentrations of esters in the standard mixture, the sum of FA and FA-ME in ratio to the sum of 3,4,5-MeO-CA and its ester displays the recovery of FA/FA-ME (100 % in the absence of laccase activity). Fig. 3-1 presents all measured enzyme activities and the recovery rate of FA/FA-ME of a *Pleurotus dryinus* cultivation (TW-SNS).

On culture day one the recovery rate of FA/FA-ME was 98 % and no laccase activity was detected. On culture day four 12 U L⁻¹ laccase and 0 % recovery of FA/FA-ME were determined. After a decrease of laccase activity on culture day six a constant increase of laccase was observed. The course of the FA/FA-ME recovery-line is mirror-inverted to the laccase activity line; no recovery of FA/FA-ME was detected at culture days 10–14. While the substrates FA/FA-ME were completely polymerized, the secretion of a CAE was detected with the laccase-independent substrates CA-ME and 3,4,5-MeO-CA-ME. An assay containing only the substrate FA-ME would have resulted in a false negative conclusion regarding the class of CAE/FAE enzymes. In addition, a loss of phenolic compounds through the activity of oxidoreductases was assessed by calculating the recovery of ferulic acid with one single sample preparation and analysis.

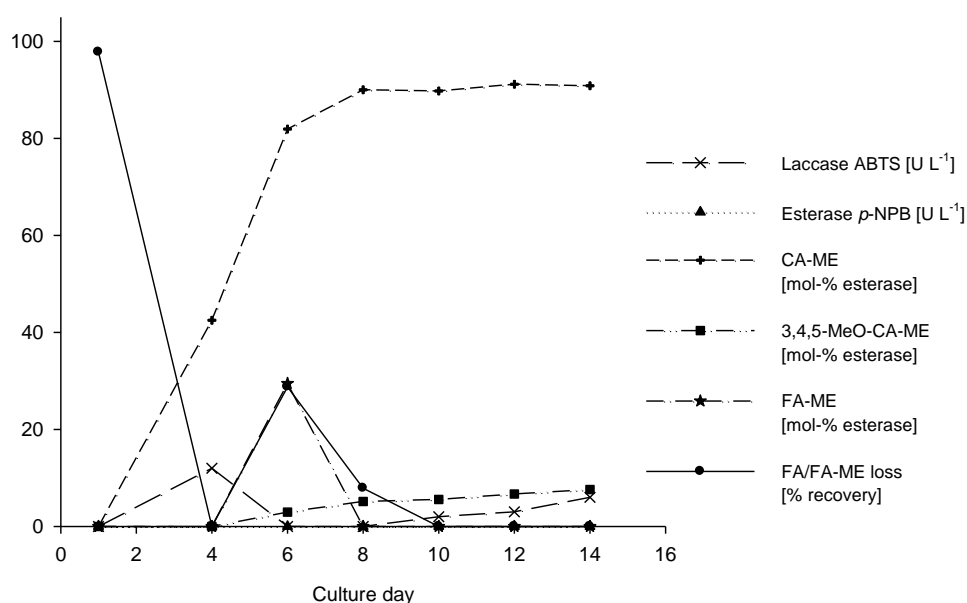


Fig. 3-1 | FA/FA-ME loss in comparison to laccase and esterase activity detected (*Pleurotus dryinus* supernatant in TW-SNL)

3.3.3 Inhibition of laccase by sodium azide

Alternatively, inhibition of laccase activity by sodium azide was examined. The laccase assay with culture supernatant and 1 mM sodium azide showed 100 % inhibition of activity. Incubation of culture supernatant with cinnamic acid methyl ester mixture in presence of 1 mM sodium azide led to reduced degradation of FA and FA-ME in

comparison to incubation without sodium azide (Fig. 3-2). However, on culture day 14 more than 80 % of FA/FA-ME loss in conjunction with a poorly evaluable FA-ME conversion rate was observed (Fig. 3-2). The loss of FA/FA-ME, despite no detectable laccase activity, has to be explained with the long incubation time for cinnamate esterase detection (15 h) in comparison to the laccase activity assay (10 min). Subsequent analyses of basidiomycetes were performed without the addition of NaN_3 , firstly because of the remaining trace activity of laccase acting on ferulic acid during the long incubation time; secondly, to exclude a possible inhibitory influence of azide on esterases.

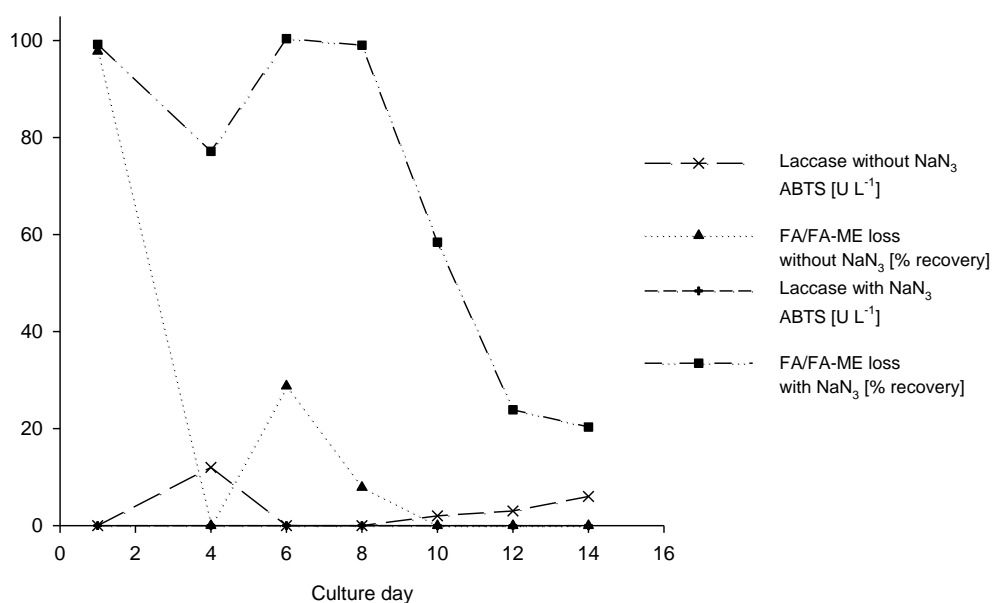


Fig. 3-2 | Effect of laccase inhibitor sodium azide on residual laccase activity and FA/FA-ME loss (*Pleurotus dryinus* supernatant in TW-SNL)

3.3.4 Detection of substrate preference

Using three different FAE substrates simultaneously enabled the detection of substrate preference. Fig. 3-3 shows activity plots of two fungi. *P. sanguineus* (Fig. 3-3a) released no esterase until culture day 6. On culture days 8–14 all three cinnamic methyl ester derivatives were hydrolyzed. The kinetics of all three curves were synchronous indicating the presence of one esterase. CA-ME was best hydrolyzed with a peak activity of 34 mol-% conversion at culture day 10, followed by FA-ME and 3,4,5-MeO-CA-ME with peak activities of 17 and 15 mol-% conversion, respectively. The esterase of *P. sanguineus*

hydrolyzed less bulky substrates with the best conversion rate: the more substituents on the phenyl ring, the less hydrolysis occurred. This esterase seemed to be more a CAE than a FAE.

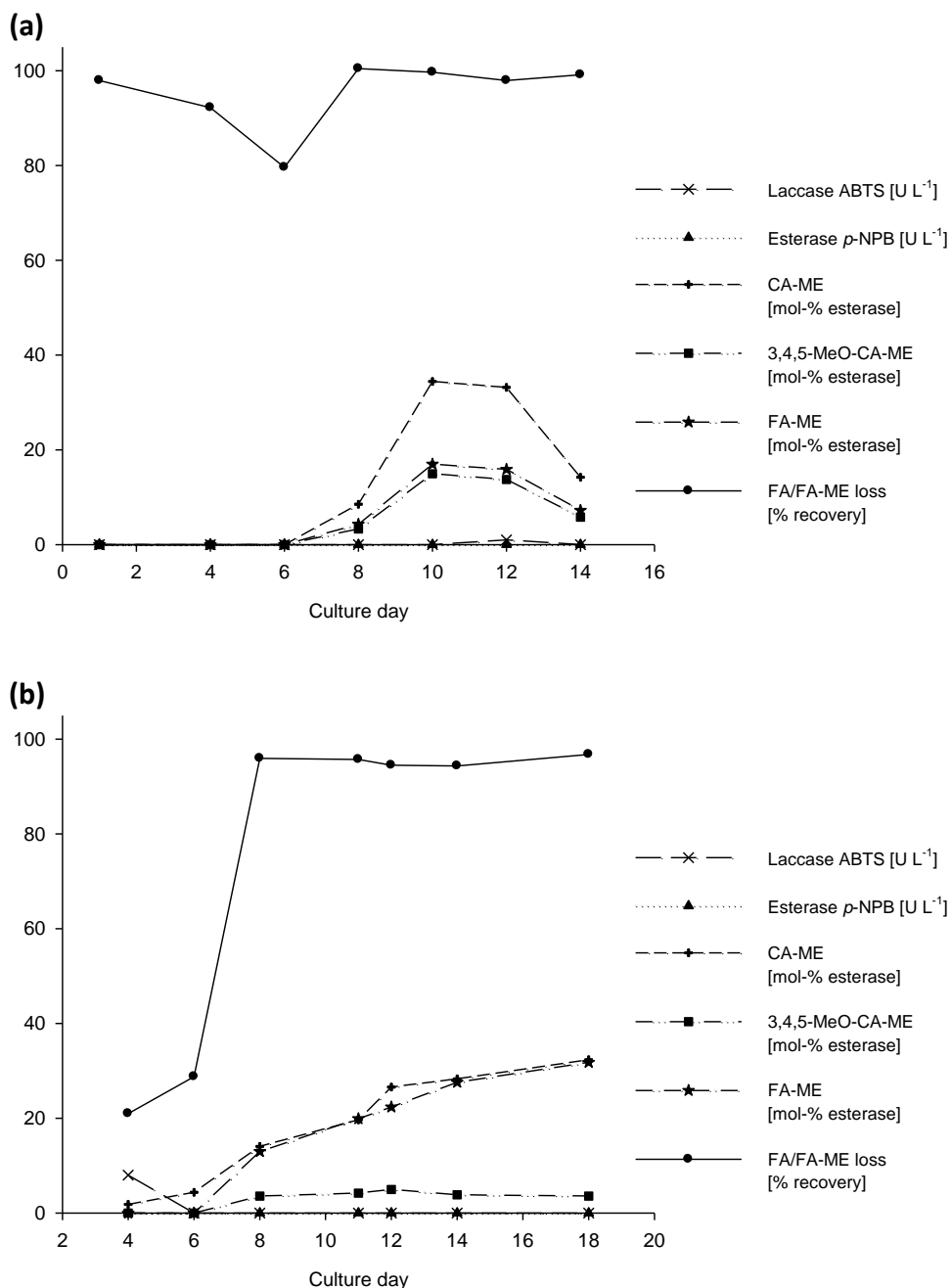


Fig. 3-3 | Detection of substrate preference on the basis of ester mixture (1 mM in total) incubation with supernatant (0.75 mL)

Pycnoporus sanguineus supernatant (TW-SNL, Fig. 3-3a) and *Pleurotus dryinus* supernatant (SNL, Fig. 3-3b) incubated with the cinnamic acid ester mixture.

In contrast to Fig. 3-1, Fig. 3-3b shows the cultivation of *P. dryinus* in SNL. The cultivation in TW-SNL exhibited laccase activity and FA/FA-ME loss, as described above (Fig. 3-1). No laccase activity and no FA/FA-ME loss were observed when cultivated in SNL, and therefore all activity curves were evaluable (Fig. 3-3b). *P. dryinus* showed the same conversion rates for CA-ME and FA-ME over the whole culture period, whereas the trend of 3,4,5-MeO-CA-ME differed (Fig. 3-3b). Hydrolysis of CA-ME and FA-ME increased steadily with the beginning of culture day 4; the maximal detected hydrolysis rate was observed on culture day 18 with 32 mol-% conversion. In contrast, 3,4,5-MeO-CA-ME was converted from culture days 8–18 with constant four mol-%. Consequently, there are either two or more esterases with different substrate specificities or one esterase (CAE/FAE), which converted 3,4,5-MeO-CA-ME only up to four mol-%.

3.3.5 Efficiency of the analytical method

The new protocol was successfully proved using a FAE from *A. niger* (AnFaeA). The ester mixture was incubated with AnFaeA (0.21 U L^{-1}) instead of culture supernatant under the reaction conditions of the method. Six mol-% of FA-ME and 13 mol-% of 3,4,5-MeO-CA-ME were hydrolyzed, whereas no hydrolysis of CA-ME was detected. With an AnFaeA activity of 0.53 U L^{-1} , the conversion rate of FA-ME and 3,4,5-MeO-CA-ME was 16 mol-% and 30 mol-%, respectively; no CA-ME was hydrolyzed. In accordance with these experimental data Kroon *et al.* (1997) described that AnFaeA did not hydrolyze CA-ME. The catalytic efficiency ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) of FA-ME and 3,4,5-MeO-CA-ME was determined to 146 and $652 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Kroon *et al.*, 1997). This is in line with the detected preference for 3,4,5-MeO-CA-ME compared to FA-ME.

The proposed method provides four different sets of information with only one sample preparation (incubation of supernatant with ester mixture) and one analytical run: detection of quantitative FA and FA-ME loss, substrate preference of esterase(s), indication about esterase number and quantitative information about ester hydrolysis. One run took 14 min with a common HPLC-UV system and an optimized gradient program.

3.3.6 Basidiomycete CAE/FAEs

Forty one basidiomycetes (all species member of the subphylum Agaricomycotina), 16 of which were cultured both in SNL and TW-SNL (57 cultivations in sum), were analyzed with the method described above. Twenty five basidiomycetes (61 %) showed esterase activity towards at least one cinnamic acid methyl ester derivative (Tab. 3-1), 16 did not convert a single one of the provided esters.

A. auricula-judae hydrolyzed CA-ME best (100 mol-%, No. 7, Tab. 3-1), followed by *M. scorodonius* (94 mol-%, No. 11b) and *P. robustus* (93 mol-%, No. 15b). The latter two were top FA-ME converting organisms with 68 mol-% and 56 mol-%, respectively (Tab. 3-1). *M. foetidum* (No. 12, Tab. 3-1) was the third best FAE hydrolyzing organism (42 mol-%) and the best 3,4,5-MeO-CA-ME hydrolyzing organism (42 mol-%).

It is apparent that CA-ME, followed by FA-ME, were the most preferred substrates (Tab. 3-1). 29 cultures hydrolyzed CA-ME, 12 3,4,5-MeO-CA-ME and 19 FA-ME with average molar conversion rates of 23 %, 9 % and 16 % (Tab. 3-1). The detected number of organisms possessing FA-ME esterase must be underestimated considering the loss of FA/FA-ME due to polymerization. For instance, 7 cultures with intense FA/FA-ME loss (+++ in accordance with Tab. 3-1) were capable of CA-ME hydrolysis, but due to the loss of FA no FAE activity could be directly verified (cultures No.: 9a-10b, 18b, 19, 25, Tab. 3-1). Thus, the CAEs were detected directly indicating at the same time the presence of FAEs.

Highest activities of the cinnamate esterases detected in test set occurred mostly on the same day; the median of CA-ME and FA-ME esterase occurred on day 11 and 11.5 for 3,4,5-MeO-CA-ME, respectively (Tab. 3-1). Maximal laccase activity was detected earlier, in median on culture day 8; *p*-NPB esterase occurred on later days, in median on day 12.5 (Tab. 3-1).

3.3.7 Substrate prevalence of basidiomycete CAE/FAEs

FAEs were usually classified into four types (A, B, C and D) based on substrate specificity for methyl caffeate, *p*-coumarate, ferulate, and sinapate as well as sequence homology (Crepin *et al.*, 2004a). The substrate specificity of more than 20 cinnamates of seven different type A to C FAEs is described in the literature (Kroon *et al.*, 1997; Topakas *et al.*,

2005; Vafiadi *et al.*, 2006). Udatha *et al.* (2011) expanded these results applying a pharmacophore model. It was found that all tested types of FAEs acted on both FA-ME and CA-ME. Only a type A FAE, called AnFaeA from *A. niger*, did not act on CA-ME, whereas the other tested type A FAE FoFaeA from *F. oxysporum* hydrolyzed CA-ME. The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of all three tested type B FAEs (AnFaeB from *A. niger*, FoFaeB from *F. oxysporum* and StFaeB from *S. thermophile*) was higher for CA-ME than for FA-ME. Type A and C FAEs showed better catalytic efficiency for FA-ME than for CA-ME (Kroon *et al.*, 1997; Topakas *et al.*, 2005; Vafiadi *et al.*, 2006). Consequently type B FAEs would rather have to be named CAEs. Most of the organisms tested here exhibited highest catalytic efficiency for CA-ME (25 from 33 cultures) and thus had type B FAE characteristics (Tab. 3-1).

According to the literature, only type A FAEs (AnFaeA and FoFaeA) were able to hydrolyze 3,4,5-MeO-CA-ME, whereas tested type B and C FAEs did not act at all on this bulky substrate (Kroon *et al.*, 1997; Topakas *et al.*, 2005; Vafiadi *et al.*, 2006). Twelve of the tested basidiomycete cultures cleaved 3,4,5-MeO-CA-ME and thus exhibited type A FAE characteristics (culture No.: 7, 9b, 11a-12, 15a, 16a, 16b, 17b, 18b, 21b, 23, Tab. 3-1). On the other hand, 9 of these 12 cultures hydrolyzed CA-ME best and therefore had type B FAE characteristics at the same time (culture No.: 7, 9b, 11a, 11b, 15a, 16b, 18b, 21b, 23, Tab. 3-1). This can be caused by the expression of several esterases as well as by yet unknown FAE types. A more rational, sequence based follow-up for classification will now be possible.

By means of the trend of the three esterase rates vs. culture day, information about the activity of the esterase can be obtained. If the various esterase curves rose at the same time and in the same direction as in Fig. 3-3a, the presence of one esterase is likely. Nine of the tested basidiomycetes exhibited these curve characteristics (culture No. 3b, 7, 9b, 12, 15b, 17b, 18b, 21b, 23, Tab. 3-1). If at least two curves differed in the trend as in Fig. 3-3b, the activity of several esterases may be supposed. Nine cultures of the tested basidiomycetes showed differing esterase curves indicating the presence of multiple esterases (culture No. 1, 2, 11a, 11b, 15a, 16a, 16b, 22a, 22b, Tab. 3-1). Six cultures showed best conversion rates for FA-ME, compared to CA-ME and 3,4,5-MeO-CA-ME indicating type C FAE characteristics (Kroon *et al.*, 1997; Topakas *et al.*, 2005; Vafiadi *et al.*,

2006). FAE type classification was not possible with the three esters tested, but, as shown, the characteristics of FAE types became predictable. All in all the tested basidiomycetes presented a wide variety of FAEs, as proven by the method proposed.

Tab. 3-1 | Organism with ability to hydrolyse cinnamic acid methyl ester derivatives

No. ^a	Organism	Media ^b	Maximal molar conversion of			FA/FA-ME loss ^d	Maximal activity	
			CA-ME [%] ^c	3,4,5-MeO-CA-ME [%] ^c	FA-ME [%] ^c		Laccase ABTS [U L ⁻¹]	Esterase p-NPB [U L ⁻¹]
1	<i>Bjerkandera adusta</i>	SNL	3 ⁽¹³⁾		4 ⁽¹³⁾	+	2 ⁽¹³⁾	
2	<i>Fomes fomentarius</i>	SNL	69 ⁽¹³⁾		4 ⁽¹⁸⁾	++	9 ⁽⁶⁾	2.2 ⁽¹⁸⁾
3a	<i>Ganoderma applanatum</i>	SNL			3 ⁽⁶⁾	-		
3b	<i>Ganoderma applanatum</i>	TW-SNL	8 ⁽¹³⁾		3 ⁽¹³⁾	+	1 ⁽¹⁸⁾	0.6 ⁽¹⁸⁾
4	<i>Ganoderma lucidum</i>	TW-SNL			4 ⁽¹³⁾	++	8 ⁽⁶⁾	33.5 ⁽¹⁴⁾
5a	<i>Grifola frondosa</i>	SNL				+		
5b	<i>Grifola frondosa</i>	TW-SNL	3 ⁽¹⁴⁾			+		1.9 ⁽¹⁴⁾
6	<i>Hericium erinaceus</i>	SNL			16 ⁽¹¹⁾	++	60 ⁽⁸⁾	
7	<i>Auricularia auricula-judae</i>	SNL	100 ⁽¹⁸⁾	19 ⁽¹⁸⁾	20 ⁽¹⁸⁾	-	1 ⁽⁸⁾	
8a	<i>Lentinula edodes</i>	SNL	10 ⁽¹¹⁾			+	3 ⁽⁸⁾	
8b	<i>Lentinula edodes</i>	TW-SNL				++	9 ⁽⁸⁾	
9a	<i>Lepista nuda</i>	SNL	16 ⁽¹⁸⁾			+++	100 ⁽⁸⁾	
9b	<i>Lepista nuda</i>	TW-SNL	61 ⁽¹³⁾	10 ⁽¹³⁾		+++	91 ⁽⁷⁾	1 ⁽¹³⁾
10a	<i>Macrolepiota procera</i>	SNL	12 ⁽¹²⁾			+++	48 ⁽¹⁸⁾	
10b	<i>Macrolepiota procera</i>	TW-SNL	23 ⁽¹²⁾			+++	9 ⁽¹⁴⁾	0.9 ⁽⁶⁾
11a	<i>Marasmius scorodoni</i>	SNL	7 ⁽⁶⁾	4 ⁽⁸⁾	3 ⁽⁸⁾	+	23 ⁽⁶⁾	
11b	<i>Marasmius scorodoni</i>	TW-SNL	94 ⁽¹⁴⁾	14 ⁽¹⁴⁾	68 ⁽¹⁴⁾	++	22 ⁽⁴⁾	
12	<i>Micromphale foetidum</i>	SNL	11 ⁽⁴⁾	42 ⁽¹¹⁾	42 ⁽¹¹⁾	-	4 ⁽¹⁾	1.7 ⁽¹¹⁾
13a	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	SNL				-		
13b	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	TW-SNL	19 ⁽¹²⁾			-		
14a	<i>Phellinus pini</i>	SNL				-		
14b	<i>Phellinus pini</i>	TW-SNL	35 ⁽⁴⁾			+		
15a	<i>Phellinus robustus</i>	SNL	27 ⁽⁶⁾	3 ⁽¹³⁾		+		
15b	<i>Phellinus robustus</i>	TW-SNL	93 ⁽¹⁰⁾		56 ⁽¹⁰⁾	+	2 ⁽⁴⁾	
16a	<i>Pleurotus dryinus</i>	SNL	32 ⁽¹⁸⁾	5 ⁽¹²⁾	32 ⁽¹⁸⁾	+	8 ⁽⁴⁾	
16b	<i>Pleurotus dryinus</i>	TW-SNL	91 ⁽¹⁴⁾	8 ⁽¹⁴⁾	29 ⁽⁶⁾	+++	12 ⁽⁴⁾	
17a	<i>Pleurotus eryngii</i>	SNL				+	106 ⁽⁶⁾	
17b	<i>Pleurotus eryngii</i>	TW-SNL	18 ⁽⁶⁾	10 ⁽¹⁰⁾	29 ⁽⁸⁾	+++	122 ⁽¹⁴⁾	3.5 ⁽⁸⁾
18a	<i>Pleurotus floridanus</i>	SNL			21 ⁽⁶⁾	++	64 ⁽⁴⁾	
18b	<i>Pleurotus floridanus</i>	TW-SNL	39 ⁽³⁾	4 ⁽³⁾		+++	13 ⁽¹⁸⁾	1.6 ⁽⁹⁾
19	<i>Pleurotus sapidus</i>	TW-SNL	56 ⁽³⁾			+++	31 ⁽¹⁸⁾	1.3 ⁽⁷⁾
20	<i>Postia placenta</i>	SNL	5 ⁽¹¹⁾			-		
21a	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	SNL				+	13 ⁽¹¹⁾	
21b	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	TW-SNL	34 ⁽¹⁰⁾	15 ⁽¹⁰⁾	17 ⁽¹⁰⁾	-	1 ⁽¹²⁾	0.5 ⁽¹²⁾
22a	<i>Rhodotus palmatus</i>	SNL	30 ⁽⁶⁾		3 ⁽¹³⁾	-		
22b	<i>Rhodotus palmatus</i>	TW-SNL	90 ⁽⁴⁾		3 ⁽⁸⁾	+		

No. ^a	Organism	Media ^b	Maximal molar conversion of			FA/FA-ME loss ^d	Maximal activity	
			CA-ME	3,4,5-MeO-CA-ME	FA-ME		Laccase	Esterase
			[%] ^c	[%] ^c	[%] ^c		ABTS [U L ⁻¹]	p-NPB [U L ⁻¹]
23	<i>Stereum rugosum</i>	TW-SNL	13 ⁽¹⁰⁾	3 ⁽¹⁰⁾	11 ⁽¹⁰⁾	-		
24	<i>Tremella mesenterica</i>	TW-SNL	4 ⁽⁶⁾			-		
25	<i>Xerula radicata</i>	TW-SNL	15 ⁽¹⁴⁾			+++	58 ⁽¹⁴⁾	0.5 ⁽¹⁴⁾
	Median of CAE/FAE positive cultures		23 ⁽¹¹⁾	9 ^(11.5)	16 ⁽¹¹⁾		12.5 ⁽⁸⁾	1.5 ^(12.5)

Numbers in parentheses indicate the culture day of peak activity.

^a 41 basidiomycete strains were tested; 16 strains were cultivated both in SNL and TW-SNL (e. g. 57 cultures in sum); listed are the 25 strains with CAE/FAE activity; 16 strains did not hydrolyze the provided esters.

^b SNL: standard nutrient solution; TW-SNL: Tween 80 nutrient solution.

^c Maximal molar conversion of cinnamic acid methyl ester derivatives to their free acid under conditions: all three methyl ester were incubated simultaneously (equimolar 0.33 mM each) with 0.75 mL of culture supernatant.

^d FA/FA-ME loss: - no to less than 10 % FA/FA-ME loss; + 10-99 % FA/FA-ME loss; ++ 1-2 culture days with 100 % FA/FA-ME loss; +++ 3 or more culture days with 100 % FA/FA-ME loss.

3.3.8 CAE/FAE induction by Tween 80

Basidiomycetes were randomly cultivated in SNL (17 times), TW-SNL (8 times) and in both SNL and TW-SNL (16 times). Except of one basidiomycete (*L. edodes*: No. 8a and 8b, Tab. 3-1) cultivating in TW-SNL media in comparison to SNL media resulted in an enhancement of CAE/FAE conversion rates (Tab. 3-1). Regarding the hydrolysis of CA-ME, cultivation in TW-SNL effected at least doubling of the conversion rate. Five organisms exhibited CAEs/FAEs during TW-SNL cultivation, whereas no conversion was detected in SNL (No. 5b, 13b, 14b, 17b, 21b, Tab. 3-1). It can be concluded that Tween 80 served as an efficient inducer of CAE/FAEs.

Tween 80 induction of peptidases (Palma *et al.*, 2000), lipases (Henriette *et al.*, 1993) and glucosyltransferases (Jacques *et al.*, 1985) has been reported. The mechanism of induction was explained by increased substrate transport into the mycelium and a facilitated translocation of enzymes in the media due to the amphiphilic properties of Tween (Jacques *et al.*, 1985). In addition it has been found that oleic acid, hydrolyzed from Tween 80, was directly incorporated into the membrane bilayer, thus increasing membrane fluidity (Jacques *et al.*, 1985).

Commonly, FAEs are induced with substrates containing FAs (Benoit *et al.*, 2008). The detected Tween 80 induction of FAEs creates new possibilities of promoting expression. Using FA and FA rich substrates (e. g. wheat bran, wheat straw, oat spelt, sugar beet

pectin) as inducers, enhanced production could be likewise expected. As these substrates inevitably induce laccases (Zucca *et al.*, 2011) the analytical method presented will be indispensable for revealing FAE activity in supernatants and initial enzyme purification steps.

3.3.9 FAE loss by laccases

28 of the 39 cultures of Tab. 3-1 exhibited a FA/FA-ME loss of at least 10 % (+, ++ and +++ in accordance with Tab. 3-1) due to laccase induced polymerization. This high number accentuates the need for a method detecting such an interference. The correlation of laccase activity with the loss of FA/FA-ME was verified with the 57 tested cultures. In addition, the results of Tab. 3-1 demonstrate that the detection of more than 8 U L^{-1} of laccase activity caused 100 % FA/FA-ME loss at one or more culture days (++ and +++ in accordance with Tab. 3-1). This empirically observed correlation was verified using a laccase C from *Trametes spec.* solution containing 8 U L^{-1} (ABTS assay) under the reaction conditions of the method. Consequently, the laccase activity of enzyme samples has to be taken into account before starting the detection of FAE activities.

3.3.10 *p*-NPB esterase activity

In general, *p*-NPB esterase activities were low. Only 12 cultures were able to hydrolyze this substrate with more than 0.5 U L^{-1} (median 1.5 U L^{-1} , Tab. 3-1). No correlation appeared between the expression of the three cinnamate esterases and the *p*-NPB esterase, neither in day of occurrence nor in activity. Particularly, there was no correlation of the trend of the curves (activity vs. culture day) of cinnamate esterases and *p*-NPB esterases. Topakas *et al.* (2005) found side activities of type A, B and C FAEs for short-chain *p*-nitrophenyl esters. *p*-Nitrophenyl acetate and propanate were hydrolyzed best, while less specificity for *p*-nitrophenyl butanoate was found (Topakas *et al.*, 2005). Therefore, the detected *p*-NPB activities had no side activity towards CAE/FAE and may rather be considered as other esterases. Consequently, the CAE/FAE from the species investigated here exhibited

a different substrate profile than described in the literature for *F. oxysporum* and *S. thermophile* (Topakas *et al.*, 2005).

3.4 Conclusion

In conclusion, basidiomycetes are powerful and versatile feruloyl- and cinnamoyl esterase producers. More than half of the tested basidiomycetes exhibited CAE/FAE activity with different substrate specificity. Tween 80 induced FAE activity. Fungal cultures, especially laccase producing organisms, can be tested easily for FAE activity using the new approach. Four different sets of information about FAEs can be gained by only one run, hence providing a time- and cost-efficient analytical method. These enzymes will be invaluable in the degradation of lignocellulosic materials for different applications including biofuels.

Acknowledgements

Support of the work by the BMBF cluster Biokatalyse2021 (P 37) and by L. Popper (Sternenzym Ahrensburg, Germany) is gratefully acknowledged.

Appendix. Supplementary data.

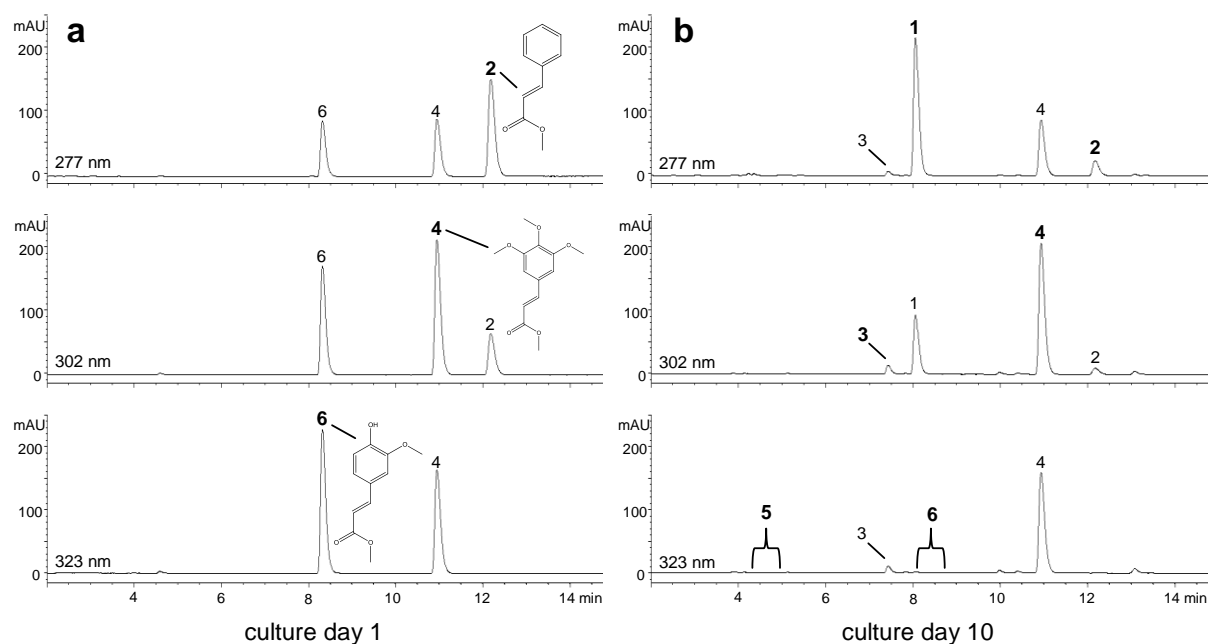


Fig. 3-4 | FA and FA-ME loss detected by HPLC-UV

Pleurotus dryinus supernatant (TW-SNL): culture day 1 (Fig. 3-4a) and 10 (Fig. 3-4b) incubated with ester mixture. (1) CA, retention time (RT) 8.1 min; (2) CA-ME, RT 12.2 min; (3) 3,4,5-MeO-CA, RT 7.5 min; (4) 3,4,5-MeO-CA-ME, RT 11.0 min; (5) FA, RT 4.6 min; (6) FA-ME, RT 8.4 min. 90 % Conversion of CA-ME and 6 % 3,4,5-MeO-CA-ME on culture day 10 (Fig. 3-4b); FA-ME and FA were not detectable due to polymerization by oxidoreductases (Fig. 3-4b). There was no ester conversion and no polymerization on culture day 1 (Fig. 3-4a).

4. Vorwort zur Publikation „An enzyme from *Auricularia auricula-judae* combining both benzoyl and cinnamoyl esterase activity“

Den Ergebnissen der in Kapitel 3 beschriebenen Publikation zufolge wiesen mehr als die Hälfte der 41 getesteten Basidiomyceten FA-Ester spaltende Aktivität auf. Aufgrund der hohen hydrolytischen Aktivität gegenüber Cinnamaten (Tab. 3-1) wurde der Organismus *Auricularia auricula-judae* ausgewählt, um das für die FAE-Aktivität verantwortliche Enzym zu isolieren und zu charakterisieren und somit für industrielle Applikationen zugänglich zu machen.

Das nachfolgende Manuskript beschreibt im ersten Abschnitt die Entwicklung einer Reinigungsstrategie für das „EstBC“ genannte Enzym. Anschließend wird die biochemische Charakterisierung der Esterase beschrieben; hierzu wurden die Parameter pI , molekulare Masse, pH und Temperatur-Optimum sowie -Stabilität ermittelt. Diese biochemischen Eigenschaften von EstBC entsprechen anderen FAE aus Ascomyceten.

Im Zuge der Charakterisierung von EstBC wurde ein umfassendes Substratscreening durchgeführt. Artificielle FAE-Substrate (vgl. Tab. 1-2 und Tab. 5-1) wurden mit guten spezifischen Aktivitäten umgesetzt, natürliche FAE-Substrate wurden hingegen nicht hydrolysiert. Anhand der EstBC konnte somit erstmals nachgewiesen werden, dass aus der Aktivität gegenüber artifiziellen Substraten nicht auf genuine FAE-Aktivität extrapoliert werden kann. Der alkoholische Rest eines FA-Esters trägt hier entscheidend zur Substraterkennung bei und spielt nicht nur, wie in der Literatur beschrieben (Kapitel 1.4.1), eine untergeordnete Rolle.

Aufgrund des gebräuchlichen Einsatzes von FA-Me als Substrat in FAE-Assays (vgl. Kapitel 1.4.5) und der auf artifiziellen Substraten basierenden Typisierung von FAE (vgl. Kapitel 1.4.2) finden sich in der Literatur zahlreiche FAE, die nie mit natürlichen Substraten getestet wurden. Aus den Erkenntnissen der nachfolgend beschriebenen Publikation ist deren genuine FAE-Aktivität erstmals in Frage zu stellen.

In einem umfassenden Substratscreening mit EstBC wurde neben Cinnamat- auch Benzoat-Aktivität detektiert. Bis *dato* galt es als Stand der Wissenschaft, dass Benzoessäure- und Zimtsäure-Esterasen kein überlappendes Substratprofil aufweisen. Das nachfolgend beschriebene Enzym EstBC bildet somit den Prototyp einer neuen Enzymklasse.

5. An enzyme from *Auricularia auricula-judae* combining both benzoyl and cinnamoyl esterase activity

Highlights

- EstBC from *Auricularia auricula-judae* established a new class of esterases.
- The unique substrate profile and partial sequences were determined.
- EstBC acted on both, benzoates and cinnamates efficiently.
- The enzyme may be useful for hydrolyzing / synthesizing flavor esters or other fine chemicals.

Abstract

Benzoic acid esterases and ferulic acid esterases (FAE) are enzymes with different profiles of substrate specificity. An extracellular esterase (EstBC) from culture supernatants of the edible basidiomycete fungus *Auricularia auricula-judae* was purified by anion exchange chromatography, followed by preparative isoelectric focusing and hydrophobic interaction chromatography. EstBC showed a molecular mass of 36 kDa and an isoelectric point of 3.2 along with broad pH and temperature windows similar to fungal FAEs. However, EstBC exhibited also characteristics of a benzoic acid esterase acting on both benzoates and cinnamates, and most efficiently on methyl and ethyl benzoate, methyl 3-hydroxybenzoate and methyl salicylate. Feruloyl saccharides as well as lipase substrates, such as long chain fatty acids esterified with glycerol, polyethoxylated sorbitan and *p*-nitrophenol were not hydrolyzed. Protein database analyses with tryptic peptides of EstBC solely yielded hits regarding hypothetical proteins belonging to the *alpha/beta* hydrolase family. The uncommon substrate specificity of EstBC concomitant with a lack of sequence homology to known enzymes suggests a new type of enzyme.

Keywords

Fungi, basidiomycete, enzymatic hydrolysis, benzoyl esterase, cinnamoyl esterase, feruloyl esterase.

5.1 Introduction

Esterases belong to the class of carboxylic ester hydrolases (EC 3.1.1.) that catalyze both the hydrolysis and synthesis of ester bonds (Lortie, 1997), and are characterized by an *alpha/beta* hydrolase fold and a highly conserved catalytic triad (Nardini *et al.*, 1999; Ollis *et al.*, 1992). Many of them, such as benzoic acid esterases and ferulic acid esterases (FAE) accept bulky substrates which has evoked growing industrial interest (Panda *et al.*, 2005; Topakas *et al.*, 2007). FAEs (EC 3.1.1.73) hydrolyze ferulic acid (FA) and other cinnamic acid (CA) derivatives (MacKenzie *et al.*, 1988). The hydrolysis of FA from arabinoxylan, hemicellulose and lignocellulosic material decreases the degree of cross-linking and thus improves enzymatic saccharification for the production of biofuels (Ferreira *et al.*, 2007; Tabka *et al.*, 2006). The product of FAEs, ferulic acid, is a valuable precursor for the biotechnological production of natural aroma compounds such as vanillin and 4-vinylguaiacol (Lesage-Meessen *et al.*, 2002); in addition, FA and other cinnamic acid derivatives are of wide interest to the food, pharmaceutical and cosmetic industry due to their antioxidative and photo-protective properties (Bouزيد *et al.*, 2005; Kikuzaki *et al.*, 2002).

In contrast to FAEs, benzoyl esterases are hardly described in literature. There is no consistent nomenclature for benzoyl esterases. They are reported as enzymes hydrolyzing benzoyl esters of simple sugars (Reese *et al.*, 1969), as lipases acting on oleyl benzoate (Mitsubishi *et al.*, 1999) and esterases cleaving 4-hydroxybenzoic acid esters (Koseki *et al.*, 2010). Applications of benzoyl esterases are the enantioselective synthesis of flavors, fine chemicals and pharmaceuticals (Henke *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2005).

Both, benzoyl esterase and FAEs were only marginally identified in the large division of basidiomycetes. The first biochemically characterized FAE of these fungi was recently published (Linke *et al.*), and only one basidiomycete benzoyl esterase hydrolyzing benzoyl-

tartrate was described (Zimmer *et al.*, 2006). Enzymes acting on both benzoates and cinnamates (FAE substrates) were neither described for basidiomycetes nor any other organism.

This work presents the purification and biochemical characterization of an esterase named EstBC from the Agaricomycete *Auricularia auricula-judae* (Aaj). A comprehensive substrate profile was mapped using a combination of benzoates and cinnamates. In addition, peptide fragments for EstBC were identified and aligned with sequences of known hydrolases.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Chemicals and enzymes

All chemicals were of highest purity grade and purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Benzoates and cinnamates were bought from aforementioned suppliers apart from following: ferulic acid methyl and ethyl ester were from Alfa Aesar (99%, Karlsruhe, Germany); 4-nitrophenyl ferulate was synthesized according to (Hegde *et al.*, 2009); methyl caffeate, coumarate, sinapate were synthesized according to (Borneman *et al.*, 1990b). Feruloylated saccharides (5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose(F-A); β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose (F-AX); α -L-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose(F-AXG)) were prepared by M. Bunzel (KIT, Karlsruhe, Germany). The substrates were purified and characterized as described (Allerdings *et al.*, 2006). Arabinoxylan was a gift from Jäckering Mühlen- und Nahrungsmittelwerke (Hamm, Germany), sugar beet pectin was from Herbstreith & Fox (Neuenbürg, Germany). Wheat bran was Alnatura (Bio Weizenkleie, Bickenbach, Germany). De-starched wheat bran (DSWB) was produced by treatment with 0.25% potassium acetate at 90 °C for 15 min followed by extensive washing with water to remove starch. *Aspergillus niger* feruloyl esterase AnFaeA was provided by Sternenzym (Ahrensburg, Germany). Xylanase (*Trichoderma viridae*) was purchased from Sigma-Aldrich.

5.2.2 Cultivation of *A. auricula-judae* (Aaj)

The basidiomycete strain *A. auricula-judae* (Aaj) used in this study was purchased from the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany; No. 11326). The strain was inoculated on standard nutrient liquid (SNL)-agar and maintained at 4 °C. The identity of Aaj was confirmed by 18S ribosomal DNA gene internal transcribed spacer (ITS) sequencing.

SNL was prepared on the basis of Sprecher medium: D-(+)-glucose-monohydrate 30.0 g/L, L-asparagine monohydrate 4.5 g/L, yeast extract 3.0 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L; trace element solution (1.0 mL/L (FeCl₃ x 6 H₂O 0.08 g/L, ZnSO₄ x 7 H₂O 0.09 g/L, MnSO₄ x H₂O 0.03 g/L, CuSO₄ x 5 H₂O 0.005 g/L, Titriplex III (EDTA) 0.4 g/L); adjusted to pH 6.0 with 1 M NaOH. For preparing SNL-agar medium, agar (15 g/L) was added to SNL.

To prepare submerged cultures, 500 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL SNL were inoculated with 10 x 10 mm agar plugs of mycelium and homogenized using an Ultra Turrax (Micra D-9, Müllheim, Germany). Cultures were kept at 24 °C on a rotary shaker (Infors, Bottmingen, Switzerland) at 150 rpm. Every day methyl cinnamate (CA-ME) and methyl ferulate (FA-ME) hydrolyzing activity was measured in the culture supernatant after removing the mycelia by centrifugation.

5.2.3 Purification

500 mL culture supernatant, harvested after five days of cultivation, were centrifuged at 10,000 g for 30 min (Sorvall RC 28S, Wilmington, USA) and subsequently filtered under reduced pressure using a 0.45 µm polyether sulfone (PES) membrane (Merck Millipore, Billerica, USA). The filtrate was diluted 1:1 with 50 mM acetate buffer pH 4.75 (equilibrating buffer A) and applied on a 25 mL self-casted Q Sepharose FF column (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). A linear NaCl gradient (from 0 to 1 M) in equilibrating buffer A was used to elute the bound proteins (3 mL/min), which were collected and monitored for FA-ME activity. Active fractions were pooled, concentrated with an ultrafiltration module (PES membrane, molecular mass cut off 10,000; Sartorius, Göttingen, Germany), and 1 mL was applied on a preparative isoelectric focusing system

(Rotofor, Bio-Rad, Hercules, USA) using pH 2–4 ampholytes (SERVA, Heidelberg, Germany). Fractions were gathered after stabilization of voltage (3 h, 1200 V). Active FA-ME fractions were pooled and desalted with 10 mM phosphate buffer pH 6.5 using a HiTrap Desalting column (GE Healthcare; 2 mL/min). Samples were freeze dried (VaCo 2, ZIRBUS technology, Bad Grund, Germany), resolved in 1 mL 25 mM phosphate buffer pH 6.5 with 1 M ammonium sulfate (equilibrating buffer B), and applied on a 1 mL HiTrap Phenyl Sepharose HP column (GE Healthcare). A linear ammonium sulfate gradient (from 1 to 0 M; 1 mL/min) in 25 mM phosphate buffer pH 6.5 was used to receive electrophoretically pure EstBC fractions.

5.2.4 Activity assays

The esterase activity of benzoic and cinnamic acid ester derivatives was determined by HPLC. The reaction mixture (500 μ L) of the samples contained 1.5 mM substrate, 5% DMSO (resulting from substrate stock solution) and 75 mM phosphate buffer at pH 6.5. Crude culture supernatant samples contained additionally 1 mM of sodium azide for laccase inhibition. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 1 h. The assay was terminated by doubling the reacting volume (500 μ L) with methanol/acetic acid (95:5 v/v); an aliquot was analyzed by HPLC.

Enzymatic hydrolysis of polysaccharides was performed with 5% arabinoxylan, 2% DSWB and 1% sugar beet pectin solutions in 75 mM phosphate buffer at pH 6.5 (1 mL). The reaction was started by the addition of 50 μ L EstBC (corresponding to 165 U/L FA-ME activity) and was incubated for 1 h and 18 h, respectively, at 37 °C. Positive control samples were realized using equi-active AnFaeA instead of EstBC. The assay was terminated by doubling the reacting volume with methanol/acetic acid (95:5 v/v) followed by centrifugation at 15,000 g for 30 min and 4 °C; an aliquot was analyzed by HPLC. All polysaccharide assays were also performed by the addition of 50 μ L xylanase (1.2 U) solution. The endogenous FA content of plant material was determined after alkaline hydrolysis. Aforementioned polysaccharide solutions (1 mL) were incubated with 1 mL 4 N sodium hydroxide at 37 °C for 2 h. The mixture was acidified by the addition of 500 μ L 50%

(v/v) acetic acid and 2.5 mL methanol. The samples were centrifuged at 15,000 g for 30 min and 4 °C and analyzed by HPLC.

Kinetic parameters were determined from the 45 min hydrolysis rate of methyl benzoate (BA-ME), CA-ME and FA-ME using eight different substrate concentrations from 0.01 mM to 2.5 mM at 37 °C and pH 6.5 (Fig. 5-5). The other experimental conditions were according to the aforementioned HPLC esterase activity assay. K_m/k_{cat} values were calculated with non linear regression using SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., Chicago, USA). HPLC assay were performed at least in duplicates. Blanks were performed for all assays using denatured enzyme instead of active enzyme. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μ mol of free acid per min under the experimental conditions used.

Alkyl esterase activity was determined using 4-nitrophenyl butanoate (*p*-NPB) and palmitate (*p*-NPP) as a substrate. The reaction mixture contained the sample and 1.25 mM substrate in 88 mM phosphate buffer at pH 6.5 and 2% Triton X-100 in a total volume of 200 μ L. The formation of 4-nitrophenol was measured in a microtiter plate at 37 °C at 410 nm using a Synergy 2 Microplate reader (BioTek, Winooski, USA). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme releasing 1 μ mol of 4-nitrophenol per min under the experimental conditions used. Photometric activity assays were performed at least in triplicates, and standard deviation was found below 10% if not mentioned otherwise.

For determination of Tween 80 and triglyceride (olive oil) hydrolyzing activity (triacylglycerol lipase EC 3.1.1.3), an assay mix (2 mL) was prepared containing 10% Tween 80 and 5% olive oil with 5% gum arabic, respectively, in 75 mM phosphate buffer pH 6.5. Incubation was performed at 37 °C and 150 rpm for 60 min. The assay was terminated by doubling the reaction volume (2 mL) with ethanol/acetone (50:50 v/v). Hydrolytic activity was quantified by monitoring the free fatty acids released from Tween 80 and olive oil by titration with 0.1 M NaOH to pH 9.5 using a titrator (Titro line easy, Schott instruments, Mainz, Germany). One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of free fatty acids per min under the experimental conditions used.

Titrimetric activity assays were performed in quadruplicates, and standard deviation was found below 10%.

5.2.5 HPLC

HPLC was performed using a Chromolith Performance RP-18e 100-4.6 reverse-phase column (Merck, Darmstadt, Germany). Substrates were separated from the products using a step-wise gradient at a flow velocity of 1.5 mL/min: 20 μ L sample was loaded in 90% buffer A (0.1% formic acid), 10% buffer B (acetonitrile); 10–36% buffer B in 3.5 min; 36–66% buffer B in 1.5 min; 66–100% buffer B in 0.5 min; 100% buffer B for 1.5 min; 100–10% buffer B in 0.5 min; re-equilibrate with 10% buffer B for 2 min; total run time 9.5 min.

Substance elution was detected with two different programs using a HP 1050 multiple wavelength detector (79854A MWD, Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany): 232 nm, 275 nm, 323 nm were used for benzoic, cinnamic, ferulic, tannic, caffeic, chlorogenic, sinapinic and gallic acid; the wavelengths 232 nm, 254 nm, 306 nm were used for 3-hydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, vanillic, salicylic, and coumaric acid.

5.2.6 ESI tandem MS of tryptic peptides

The amino acid sequences of tryptic peptides were manually deduced from MS² and MS³ spectra using an Orbitrap Velos Pro mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany). The procedure was described in detail elsewhere (Linke *et al.*, 2013).

5.2.7 pH optimum

The effect of pH on esterase activity was determined between pH 3.5 and 11.5. Different buffers, such as acetate (pH 3.5–5.5), Bis-Tris (pH 5.5–7.5), Tris (pH 7–9) and borate (pH 8.5–11.5) at a concentration of 75 mM were used. Incubation was performed with CA-ME

and FA-ME for 60 min at 37 °C. The other experimental conditions were according to the HPLC esterase activity assay.

5.2.8 Temperature optimum and stability

Enzyme was incubated at a temperature range from 25 to 95 °C with CA-ME and FA-ME at pH 6.5 (75 mM phosphate buffer) for 45 min to determine the effect of temperature on the enzyme activity. Thermal stability was tested via preincubation of enzyme at temperatures from 15 to 95 °C for 60 min in a 75 mM phosphate buffer pH 6.5; residual enzyme activity was determined via incubation of the substrates CA-ME and FA-ME for 60 min at 37 °C. The other experimental conditions were according to the HPLC esterase activity assay.

5.2.9 Denaturing SDS-PAGE and isoelectric focusing

SDS-PAGE was performed on a 12% polyacrylamide separation gel. Samples were prepared by mixing 20 µL of enzyme solution and 20 µL of loading buffer (0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.2 M DTT, 4% SDS, 20% glycerol, 0.2% bromophenol blue) and boiling for 10 min. After electrophoresis at 15 mA per gel, the gels were stained with silver or InstantBlue™ Coomassie (Expedeon, Cambridgeshire, England). Marker proteins from 10 to 250 kDa (Bio-Rad) were used for molecular determination. Isoelectric focusing (IEF) polyacrylamide gel electrophoresis was performed on a Multiphor II system (GE Healthcare) using Servalyt™ Precotes™ precast gels with an immobilized pH gradient from 3 to 6 (SERVA) for 3,500 V h. The determination of isoelectric point was based on a protein test mixture from pI 3 to 10 (SERVA) and on pH control of EstBC active preparative IEF fractions. Gels were Coomassie stained as described above.

5.3 Results

5.3.1 General properties of EstBC

The purification of the Aaj esterase EstBC was accomplished by combining an anion exchange chromatography (lane 4, Fig. 5-1), followed by preparative IEF (lane 5) and hydrophobic interaction chromatography (lane 1). EstBC showed a molecular mass of 36 kDa on a denaturing SDS-PAGE. The isoelectric point of 3.2 was determined via analytical and preparative IEF. The relatively low pI facilitated good purification using anion exchange chromatography and preparative IEF. Hydrophobic interaction chromatography (HIC) was added for polishing the protein.

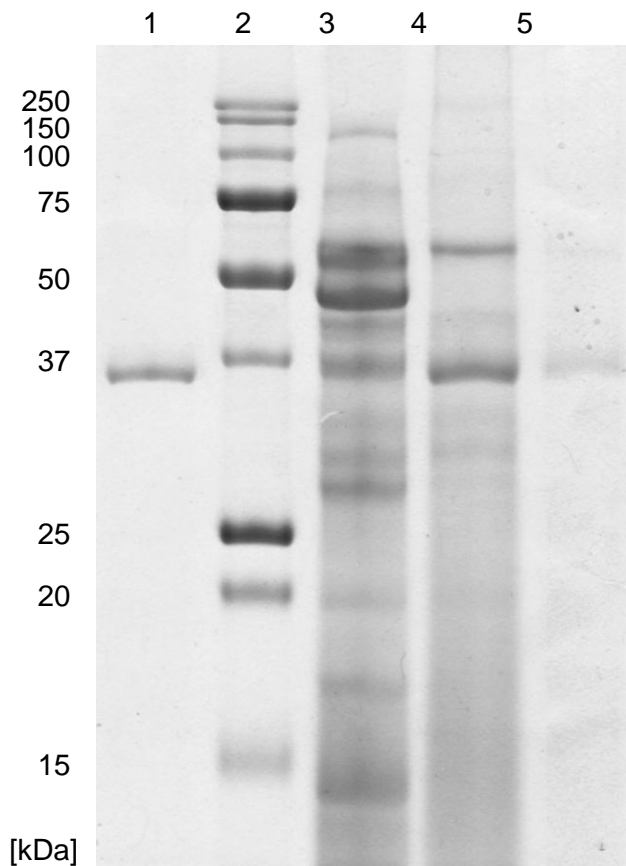


Fig. 5-1 | SDS-PAGE (12%) of EstBC purification; staining of protein was performed with InstantBlue™ Coomassie

Lane 1: concentrated purified EstBC after hydrophobic interaction chromatography; lane 2: marker proteins; lane 3: Aaj crude culture supernatant; lane 4: EstBC after anion exchange chromatography; lane 5: EstBC after preparative isoelectric focusing.

5.3.2 pH, temperature optimum and thermal stability

The biochemical characterization was carried out for the substrates CA-ME and FA-ME. For both substrates EstBC showed the same pH optimum at 6.5 (Fig. 5-2). The enzyme was active in a broad pH range hydrolyzing CA-ME from pH 3.5 to 8.0 with more than 85% and FA-ME from pH 4.5 to 8.5 with more than 80% of relative activity (Fig. 5-2). Alkaline auto hydrolysis was not detectable up to pH 8.5 for CA-ME and 9.5 for FA-ME.

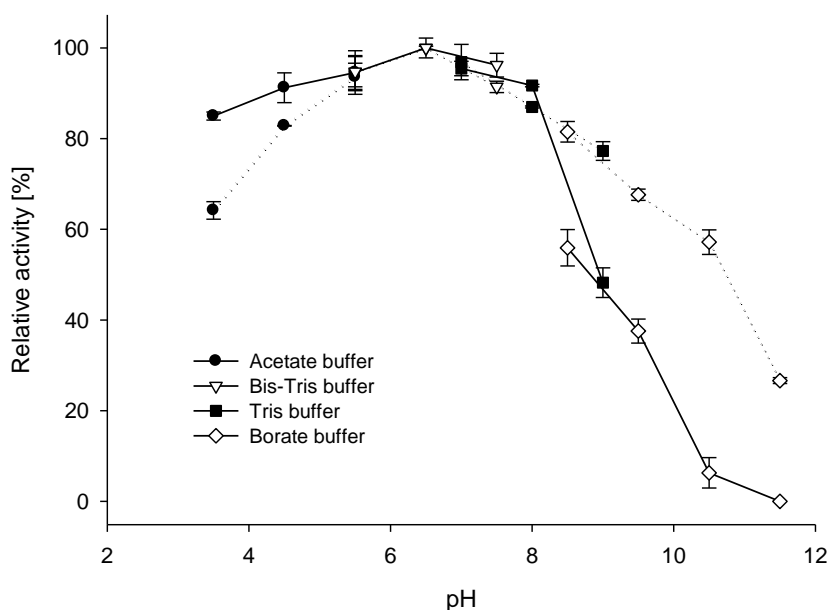


Fig. 5-2 | Effect of pH on EstBC activity tested with the substrates methyl cinnamate (solid line) and methyl ferulate (dotted line)

Various buffer solutions were used: acetate pH 3.5–4.5 (filled circle), Bis-Tris pH 5.5–7.5 (open triangle down), Tris pH 7–9 (filled square) and borate pH 8.5–11.5 (open diamond).

Optimal reaction temperature was determined at 66 °C for CA-ME and 61 °C for FA-ME (Fig. 5-3). The temperature profile of both substrates was similar with the curve of FA-ME parallel displaced to 5 °C lower values (Fig. 5-3). EstBC exhibited good thermal stability. The values were comparable for both, CA-ME and FA-ME (Fig. 5-3). 50% residual activity was measured after preincubation for 1 h at 65 °C. No activity was detectable at temperatures higher than 86 °C (Fig. 5-3).

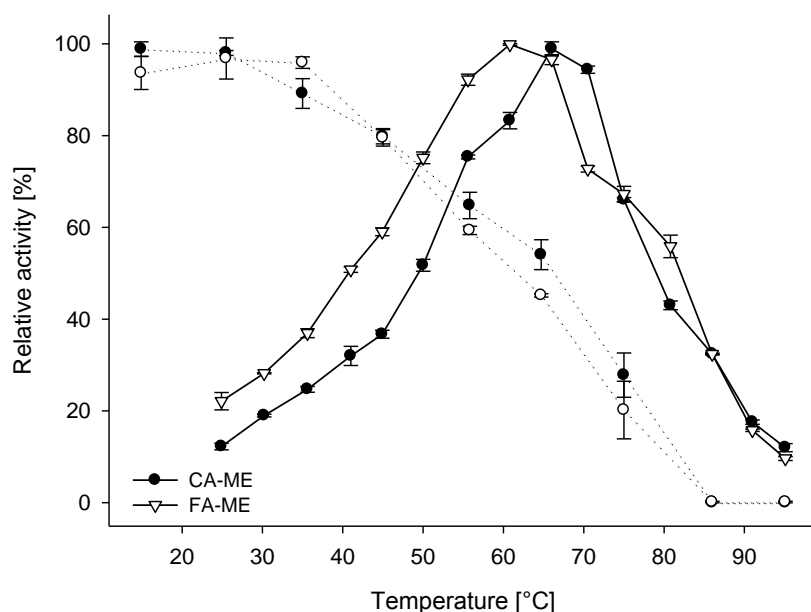


Fig. 5-3 | Temperature profile (solid line) and thermal stability (dotted line) of EstBC for the substrates methyl cinnamate (CA-ME, filled circle) and methyl ferulate (FA-ME, open triangle down)

For thermal stability, EstBC was preincubated at temperatures from 15 to 95 °C for 60 min in a 75 mM phosphate buffer pH 6.5.

5.3.3 Hydrolysis of FAE substrates

A comprehensive substrate profile was mapped. Cinnamate and benzoate derivatives were tested besides a number of aliphatic esters (Tab. 5-1). CA-ME was found to be the ester hydrolyzed best out of the group of cinnamate derivatives with a specific activity of 5.1 (± 0.03) U/mg (No. 1, Tab. 5-1). This activity was set as 100%, with all other relative activities found in Tab. 5-1 being calculated on this basis. EstBC showed hydrolysis of all typical synthetic FAE substrates, such as FA-ME (40% relative activity), methyl caffeate (7.8%), methyl coumarate (21%), and methyl sinapate (14%; Tab. 5-1, Nos. 3–5, 7). These substrates were usually used to classify the FAEs according to Crepin *et al.* (2004a). Hydrolysis of all four substrates would result in a type C or D FAE; exact classification would additionally require sequence information. The classification system of FAEs was extended by Benoit *et al.* (2008) and Udatha *et al.* (2011) on the basis of phylogenetic and descriptor analysis, respectively. Other synthetic FAE substrates, such as ethyl ferulate (12%) as well as methyl (100%) and ethyl cinnamate (70%) were also hydrolyzed by EstBC (Tab. 5-1, Nos. 1, 2, 6). Besides the synthetic substrates, natural FAE substrates, such as arabinoxylan, DSWB and sugar beet pectin containing 0.93, 1.53 and 7.79 mg esterified FA

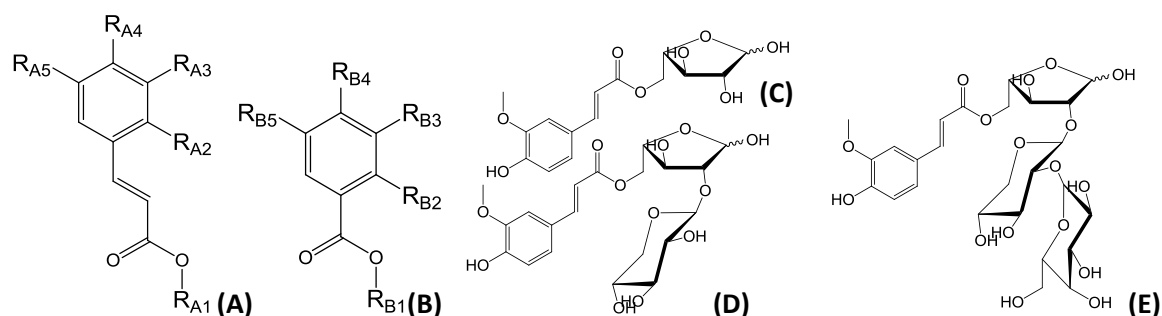
per g dry matter, were incubated with EstBC, but hydrolysis was not detected. Long-term incubation (18 h) and co-incubation with xylanase yielded analogous results. Smaller natural substrates, such as feruloylated mono-, di- and trisaccharides (F-A, F-AX, F-AXG) and chlorogenic acid did likewise not result in liberation of ferulate (Tab. 5-1, No. 8, 10–15).

K_m and k_{cat} were determined for the substrates CA-ME and FA-ME from the initial hydrolysis rates. K_m was calculated for FA-ME to 0.04 (± 0.002) mM and k_{cat} to 1.4 (± 0.01) s^{-1} which resulted in a k_{cat}/K_m value of 38 $mM^{-1} s^{-1}$. CA-ME was the preferred substrate for EstBC compared to FA-ME, as the kinetic parameters were almost doubled. K_m was determined for CA-ME to 0.02 (± 0.002) mM and k_{cat} to 3.5 (± 0.12) s^{-1} which resulted in a k_{cat}/K_m value of 175 $mM^{-1} s^{-1}$.

5.3.4 Benzoic acid esterase activity vs. FAE activity

Benzoate derivatives were generally better hydrolyzed than the analogous cinnamates: CA-ME (100%) vs. BA-ME (2171%), FA-ME (40%) vs. methyl vanillate (131%) and methyl coumarate (21%) vs. methyl 4-hydroxybenzoate (34%; Tab. 5-1). Kinetic studies for EstBC with the substrate BA-ME resulted in a K_m value of 0.15 (± 0.017) mM and a k_{cat} value of 88 (± 0.13) s^{-1} (k_{cat}/K_m value of 600 $mM^{-1} s^{-1}$). The turnover was 25- to 63-fold higher for BA-ME compared to CA-ME (3.5 s^{-1}) and FA-ME (1.4 s^{-1}), yet the affinity of the enzyme for BA-ME (0.15 mM) was 4- to 8-fold lower compared to FA-ME (0.04 mM) and CA-ME (0.02 mM). EstBC is the first characterized enzyme, which efficiently hydrolyzed both, benzoates and cinnamates.

Tab. 5-1 | Relative and specific activity of EstBC on various benzoic and cinnamic acid esters



Compound							Relative Activity [%] ^a	Specific Activity [U/mg]
No.	Cinnamate derivatives (A)	R _{A1}	R _{A2}	R _{A3}	R _{A4}	R _{A5}		
1	Methyl cinnamate	CH ₃	H	H	H	H	100	5.1 ± 0.03
2	Ethyl cinnamate	C ₂ H ₅	H	H	H	H	70	3.6 ± 0.05
3	Methyl ferulate	CH ₃	H	OCH ₃	OH	H	40	2.1 ± 0.008
4	Methyl coumarate	CH ₃	H	H	OH	H	21	1.1 ± 0.04
5	Methyl sinapate	CH ₃	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	14	0.7 ± 0.01
6	Ethyl ferulate	C ₂ H ₅	H	OCH ₃	OH	H	12	0.6 ± 0.02
7	Methyl caffeate	CH ₃	H	OH	OH	H	7.8	0.4 ± 0.005
8	Chlorogenic acid	C ₇ H ₁₂ O ₅	H	OH	OH	H		n. d.
9	<i>p</i> -Nitrophenyl ferulate	C ₆ H ₅ NO ₂	H	OCH ₃	OH	H		n. d.
10	F-A (C) ^b	C ₅ H ₁₀ O ₄	H	OCH ₃	OH	H		n. d.
11	F-AX (D) ^b	C ₁₀ H ₁₈ O ₈	H	OCH ₃	OH	H		n. d.
12	F-AXG (E) ^b	C ₁₆ H ₂₈ O ₁₃	H	OCH ₃	OH	H		n. d.
13	Arabinoxylan	PoSac	H	OCH ₃	OH	H		n. d.
14	De-starched wheat bran	PoSac	H	OCH ₃	OH	H		n. d.
15	Sugar beet pectin	PoSac	H	OCH ₃	OH	H		n. d.
Benzoate derivatives (B) ^c		R _{B1}	R _{B2}	R _{B3}	R _{B4}	R _{B5}		
16	Methyl benzoate	CH ₃	H	H	H	H	2171	111 ± 0.97
17	Methyl salicylate	CH ₃	OH	H	H	H	1404	72 ± 0.63
18	Methyl 3-hydroxybenzoate	CH ₃	H	OH	H	H	530	27 ± 0.56
19	Ethyl benzoate	C ₂ H ₅	H	H	H	H	153	7.8 ± 0.79
20	Methyl vanillate	CH ₃	H	OCH ₃	OH	H	131	6.7 ± 0.63
21	Methyl 4-hydroxybenzoate	CH ₃	H	H	OH	H	34	1.7 ± 0.05
22	Ethyl vanillate	C ₂ H ₅	H	OCH ₃	OH	H	6.9	0.35 ± 0.001
23	Ethyl 4-hydroxybenzoate	C ₂ H ₅	H	H	OH	H	6.5	0.33 ± 0.01
24	Methyl gallate	CH ₃	H	OH	OH	OH	4.3	0.22 ± 0.003
25	Propyl 4-hydroxybenzoate	C ₃ H ₇	H	H	OH	H	0.6	0.03 ± 0.003
26	Butyl 4-hydroxybenzoate	C ₄ H ₉	H	H	OH	H		n. d.
27	Tannic acid	PoPhe	H	OH	OH	OH		n. d.
Other substrates								
28	<i>p</i> -Nitrophenyl butanoate						8.6	0.44 ± 0.05
29–31	<i>p</i> -Nitrophenyl palmitate, olive oil, Tween 80							n. d.

n. d., no activity detected; PoPhe, polyphenol; PoSac, polysaccharide.

^a Relative activities were calculated on basis of methyl cinnamate activity (5.1 U/mg).

^b Feruloylated saccharides, F-A: 5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose; F-AX: β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose; F-AXG: α-L-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-5-O-*trans*-feruloyl-L-arabinofuranose.

^c The FAE AnFaeA from *A. niger* was incubated with the benzoates of Tab. 5-1: no hydrolytic activity was detected.

5.3.5 Substrate profile of EstBC

Best EstBC activities with all tested benzoates and cinnamates were observed for non-substituted phenyl rings (BA-ME, 2171% and CA-ME, 100%; Tab. 5-1). Further investigation

of the substrate profile of EstBC revealed that maximum hydrolysis was achieved with ortho-hydroxy substrate (methyl salicylate, 1404%), followed by the meta (methyl 3-hydroxybenzoate, 530%) and para position (methyl 4-hydroxybenzoate, 34%). Starting from the phenolic hydroxyl group in the fourth position, the activity increased with an additional methoxy group in the third position (methyl 4-hydroxybenzoate, 34% vs. methyl vanillate, 131% and methyl coumarate, 21% vs. FA-ME, 40%). Adding a second methoxy group to the phenol decreased the activity (methyl sinapate, 14%). Elongation of the alkyl chain of the alcohol yielded decreasing activities in all experiments (compare methyl/ethyl cinnamate, ferulate, benzoate and vanillate). Analogous results were obtained for the series from methyl to propyl 4-hydroxybenzoates with no detectable residual activity for the butyl ester (Tab. 5-1).

As mentioned above, natural FAE substrates (No. 10–15, Tab. 5-1) and chlorogenic acid were not hydrolyzed by EstBC. Furthermore, the synthetic substrate *p*-nitrophenyl ferulate, usually used for photometric FAE assays, was not hydrolyzed in the HPLC and photometric esterase assay. The natural polybenzoate tannic acid did not serve as substrate, whereas the monomer methyl gallate was cleaved by EstBC (No. 24 and 27, Tab. 5-1). Lipase substrates, such as long chain fatty acids esterified with glycerol (olive oil), polyethoxylated sorbitan (Tween 80) and *p*-nitrophenol were not hydrolyzed. However, EstBC showed a side activity for the short chain substrate *p*-nitrophenol butanoate (0.44 U/mg, No. 28, Tab. 5-1).

5.3.6 Partial amino acid sequence of EstBC

Tryptic peptides of EstBC were sequenced ab initio by means of ESI-MS/MS. Six peptide fragments with 93 amino acids in total were deduced. Homology searches of EstBC fragments 1–6 using NCBI BLAST (program blastp) yielded hits regarding hypothetical proteins belonging to the *alpha/beta* hydrolase family. Multiple sequence alignments of EstBC fragments against the top BLAST hits resulted in the fragment order 3–6–2–1–4–5, in which fragments 6–2 as well as 4–5 were joining (Fig. 5-4). Most frequent and best ranked hit was the hypothetical protein AURDEDRAFT_160157 from *Auricularia delicata* TFB-10046 SS5 (gi|393243500, GenBank: EJD51015; Fig. 5-4). No specific enzyme activity

Zimmer *et al.*, 2006). The pH optimum of EstBC at 6.5 corresponded most to the literature values of FAEs. The temperature optimum exceeded with 66 °C the optimum of previously published FAEs and benzoyl esterases. These ranged from 37 to 60 °C (Koseki *et al.*, 2009). The thermal stability properties of EstBC were with 50% residual activity at 65 °C greater than other FAEs and benzoyl esterases (Koseki *et al.*, 2009; Koseki *et al.*, 2010; Takehara *et al.*, 2012; Zimmer *et al.*, 2006).

Topakas *et al.* (2005) compared kinetic parameters of seven different FAEs from *A. niger* (AnFaeA, AnFaeB), *Fusarium oxysporum* (FoFaeA, FoFaeB), *Sporotrichum thermophile* (StFaeB, StFaeC) and *Talaromyces stipitatus* (TsFaeC) for several cinnamates. The turnover number of EstBC for CA-ME (3.5 s^{-1}) and FA-ME (1.4 s^{-1}) was at the lower end of literature FAEs, but the affinity to the substrate (Michaelis-Menten constant, CA-ME: 0.02 mM; FA-ME: 0.04 mM) was at the top end.

All of the FAE enzymes compared by Topakas *et al.* (2005) (apart from AnFaeA) acted on CA-ME. Particularly the type B FAEs AnFaeB, FoFaeB and StFaeB exhibited with 267, 359 and 255 s^{-1} high k_{cat} values for CA-ME (Kroon *et al.*, 1997; Topakas *et al.*, 2005; Vafiadi *et al.*, 2006). The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of all of these type B FAEs was higher for CA-ME than for FA-ME. EstBC showed the same type B characteristics. However, the hydrolysis of substrates no. 3, 4, 5 and 7 (Tab. 5-1) represents type C and D FAE characteristics (Crepin *et al.*, 2004a).

FAEs usually prefer feruloylated saccharides compared to the synthetic FA-ME. The FAE Est1 from the basidiomycetous fungus *Pleurotus sapidus*, for instance, preferred the substrate F-AX, followed by F-A, F-AXG and finally FA-ME (Linke *et al.*, 2013). FaeA and FaeB from the ascomycete *A. niger* hydrolyzed F-A with a higher activity than FA-ME (Benoit *et al.*, 2006). In contrast to other fungal FAEs, EstBC did not work on the feruloylated saccharides F-A, F-AX and F-AXG. Taken together, the biochemical properties of EstBC resembled fungal FAEs; however, the substrate specificity of EstBC differed from FAEs.

Benzoate derivatives were generally better hydrolyzed by EstBC than the analogous cinnamates (Tab. 5-1). Studies in context with FAEs and benzoates are rare in the literature. de Vries *et al.* (2002) analyzed methyl gallate using FAEs of *A. niger*, but neither

faeA nor faeB were able to hydrolyze this compound. Within an extensive substrate screening of 26 methyl phenylalkanoates the benzoates methyl 4-hydroxybenzoate and methyl vanillate were tested for seven FAEs (AnFaeA, AnFaeB, FoFaeA, FoFaeB, StFaeB, StFaeC and TsFaeC) – none of the FAEs acted on these benzoates either (Kroon *et al.*, 1997; Topakas *et al.*, 2005; Vafiadi *et al.*, 2006). In the present study AnFaeA was incubated with the benzoates of Tab. 5-1, and no activity was detected likewise. In contrast to FAEs, only few publications described benzoyl esterases. They hydrolyzed benzoates, however, unlike FAEs they did not act on cinnamates (Koseki *et al.*, 2010; Reese *et al.*, 1969; Zimmer *et al.*, 2006). One trait is shared with FAEs and benzoate esterases – both usually exhibit side activities for short chain *p*-nitrophenolates, a typical esterase substrate (Koseki *et al.*, 2010; Kroon *et al.*, 1997; Reese *et al.*, 1969; Topakas *et al.*, 2005; Vafiadi *et al.*, 2006; Zimmer *et al.*, 2006). This characteristic was in line with the *p*-nitrophenyl butanoate esterase side activity of EstBC (0.44 U/mg).

There are no indications of esterases with a substrate specificity comparable to EstBC in the literature. FAEs hydrolyze cinnamates, especially esterified with saccharides, which is usually arabinose in natural substrates. However, FAEs are not capable of acting on benzoates. Chlorogenate hydrolase (EC 3.1.1.42) substrates are hydroxycinnamates, such as chlorogenic acid, but not benzoates. Tannases (EC 3.1.1.20) hydrolyze tannic acids and hydroxybenzoates, such as gallates, however they do not work on benzoic acid esters, methoxy derivatives of benzoic acid and cinnamates. Substrates of benzoyl esterases are benzoates, but not cinnamates. EstBC acted on all tested benzoates and cinnamates efficiently, as long as the alcohol moieties were not too bulky. Lipase activity could be excluded from EstBC as no long chain fatty acids were hydrolyzed from alcohols.

The results of the experimental data were in line with the sequence analyses. Protein database analyses with tryptic peptides of EstBC solely yielded hits regarding hypothetical proteins belonging to the *alpha/beta* hydrolase family; however, the hypothetical proteins had no defined enzyme activities. The best hit of the EstBC fragments was a hypothetical protein (GenBank: EJD51015) from *A. delicata*. The “nucleophilic elbow” consensus motif G-x-S-x-G (G-H-S-Y-G) around the active serine of the catalytic triad Ser174-His298-Asp333 was detected. Udatha *et al.* (2011) stated that the presence of the catalytic triad with the serine containing nucleophilic elbow was an essential criterion for being a putative FAE.

The order of the predicted catalytic triad of FAEs was mostly characterized by Ser-Asp-His (77% out of 321 sequences), followed by Asp-Ser-His (12%) and His-Ser-Asp (11%) (Udatha *et al.*, 2011). The differing catalytic triad order Ser-His-Asp of EJD51015 as well as the missing homology to benzoyl esterases, FAEs and other enzymes confirmed EJD51015, and thus also EstBC to be a novel enzyme type.

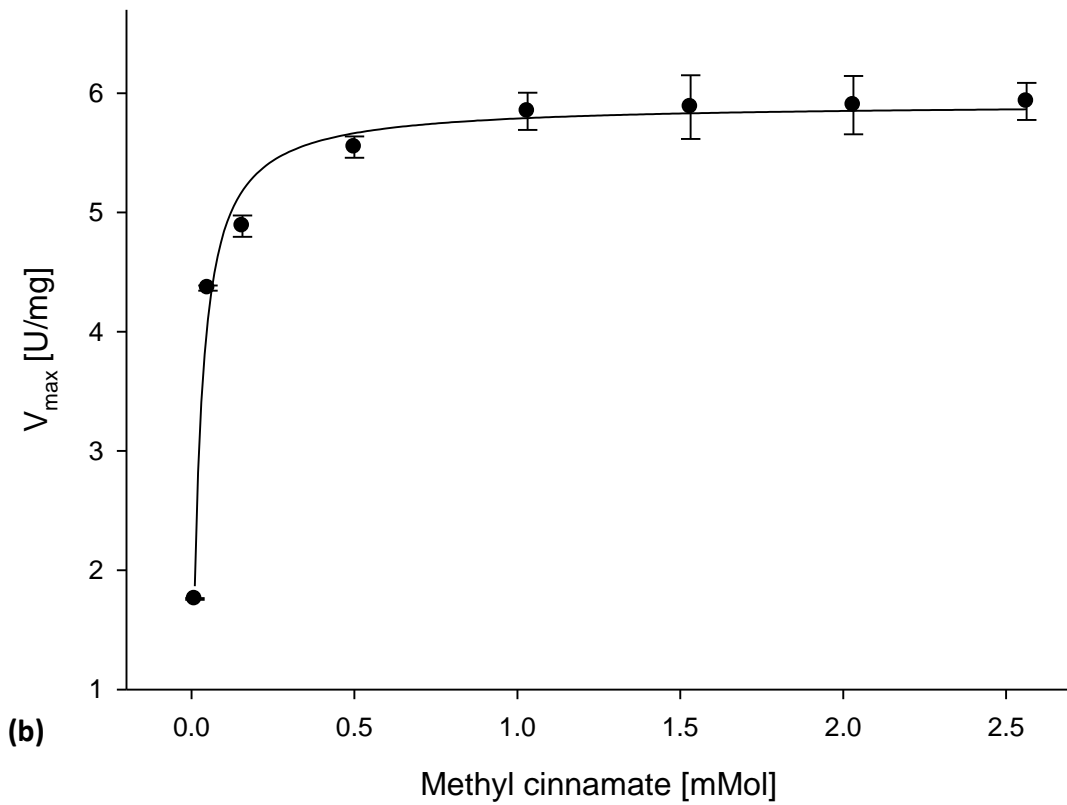
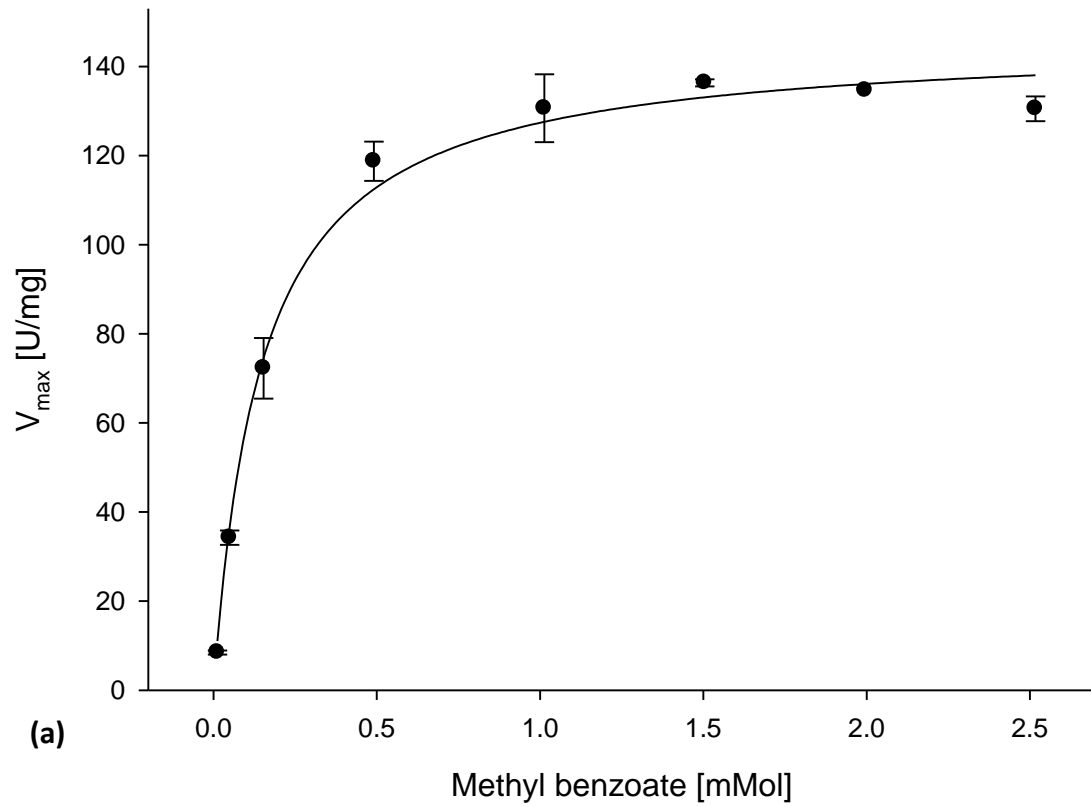
The biological function of EstBC is not clear yet. Although methyl esters and other alkyl esters of cinnamates are not the natural substrates of FAEs, these substances are naturally occurring. CA-ME, for instance, accounts for up to 99% of the *Eucalyptus* and up to 70% of the basil (*Ocimum*) essential oil (Gilles *et al.*, 2009; Kathirvel *et al.*, 2012). Methyl salicylate, which is rapidly hydrolyzed by EstBC, is abundantly present in many essential oils and other plant materials e.g. birch (*Betula*) and alder (*Alnus*) (Blande *et al.*, 2010). As *A. auricula-judae* may infest trees of the order *Fagales*, the fungus might have evolved EstBC to metabolize alkyl benzoates and cinnamates.

EstBC is the first characterized esterase exhibiting both benzoate and cinnamate derivative activity combined with broad pH and temperature windows. The unique substrate profile and the lack of sequence homology to known enzymes established EstBC as a member of a new class of enzymes of possible industrial relevance. Future applications may be the hydrolysis as well as the synthesis of benzoylated and feruloylated compounds, such as flavors, fine chemicals and pharmaceuticals (Henke *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2005).

Acknowledgements

Support of the work by the Federal Ministry of Education and Research cluster Biokatalyse2021 (P 37) and M. Bunzel (KIT, Karlsruhe, Germany) is gratefully acknowledged.

Appendix. Supplementary data.



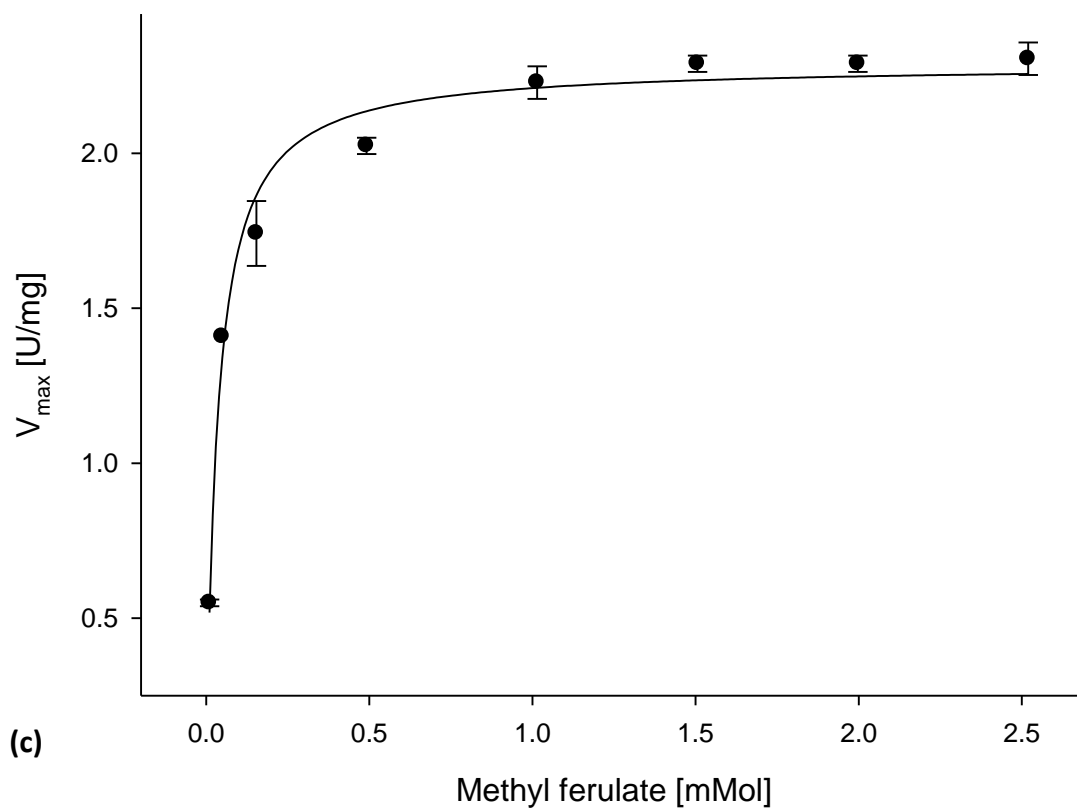


Fig. 5-5 | Kinetics of EstBC for the substrates methyl benzoate (a), cinnamate (b) and ferulate (c)

Kinetic parameters were determined from the 45 min hydrolysis of eight different substrate concentrations from 0.01 mM to 2.5 mM at 37 °C and pH 6.5.

6. Ausblick

Die in dieser Arbeit erzielten wissenschaftlichen Erkenntnisse zeigen das umfassende Potential von Basidiomyceten zur Sekretion von FAE und eröffnen einen Fundus an interessanten Anschlussarbeiten. Diese könnten sich mit der Aufreinigung und Charakterisierung neuer FAE aus Basidiomyceten befassen. Neben der Analyse der biochemischen Parameter wäre die Aminosäuresequenz basidiomycetischer FAE von Interesse. Die Primärstruktur der Proteine wäre nach der Ermittlung der codierenden DNA-Sequenz bzw. mRNA und nachfolgender Translation zugänglich.

Neuere Arbeiten mit basidiomycetischen FAE-Sequenzen aus *Pleurotus sapidus* und *Pleurotus eryngii* zeigen eine von allen übrigen bisher sequenzierten FAE abweichende katalytische Triade (Ser-His-Glu statt Ser-His-Asp). Es besteht somit ein verstärktes Interesse an der Detektion weiterer FAE-Sequenzen, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu anderen fungalen und bakteriellen FAE ausarbeiten zu können. Aus einer großen Anzahl basidiomycetischer Gensequenzen könnten konservierte Bereiche von FAE abgeleitet werden, so dass zur Detektion neuer FAE sondenbasierte Verfahren Anwendung finden könnten.

Um für biotechnologische Prozesse FAE in ausreichender und kostengünstiger Form feilbieten zu können, wäre die Nutzung heterologer Expressionssysteme denkbar. Hiermit könnten FAE ertragreich und selektiv, z. B. durch Nutzung eines Protein-*tags* wie dem *His-tag*, produziert werden.

Weitere Arbeiten könnten sich mit biotechnologischen Applikationsstudien befassen. FAE aus Basidiomyceten sind insbesondere für Einsatzbereiche im Lebensmittelsektor prädestiniert, da ihre Herkunft aus Speisepilzen eine gesteigerte Verbraucherakzeptanz mit sich bringt. Neben den in der Einleitung beschriebenen biotechnologischen Anwendungen ist auch die reverse Veresterung denkbar. In einer gelenkten FAE-Veresterung mit Sacchariden wäre der FA-Substitutionsgrad einstellbar; durch eine nachgeschaltete oxidative Vernetzung – beispielsweise unter Einsatz von Laccasen – könnten maßgeschneiderte Gele mit neuen rheologischen Eigenschaften erzeugt werden.

Die Ergebnisse um das Enzym EstBC aus *Auricularia auricula-judae* zeigen neue und interessante biochemische Eigenschaften. Insbesondere das ungewöhnliche Substratspektrum bietet Anlass für weitere Forschung. Zukünftige Arbeiten könnten sich mit der Analyse des Gens von EstBC beschäftigen. Die Auswertung der DNA- respektive Aminosäure-Sequenz könnte zusätzliche Hinweise auf die Natur des katalytischen Mechanismus ergeben. Zudem wären Sequenzvergleiche mit Gen- und Proteindatenbanken möglich, so dass homologe Enzyme gefunden und exprimiert werden könnten.

Um eine ausführliche Beschreibung und Charakterisierung der mit EstBC neu begründeten Enzymklasse zu ermöglichen ist die Detektion weiterer verwandter Proteine notwendig. EstBC-ähnliche Enzyme könnten entweder in einem Screening mit Pilzkulturen oder mittels Sequenzsuche homologer Proteine detektiert werden.

Bisher wurden noch keine biotechnologischen Applikationsversuche mit EstBC durchgeführt; verschiedene Einsatzgebiete sind jedoch denkbar. So könnten beispielsweise Cinnamate, aber auch Benzoate wie *p*-Hydroxybenzoate (Parabene), Salicylate und Vanillate hydrolysiert oder verestert werden. Diese Verbindungsklassen finden – insbesondere in biotechnologisch produzierter und somit natürlicher Form – vielfältige Verwendung als Aromastoffe, Feinchemikalien oder Pharmazeutika.

7. 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, 1276-1286.

Baldrian, P., (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 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, 1494-1511.

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

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

Bertrand, G., (1896) Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 123, 463-465.

Biely, P., Mastihubova, M., van Zyl, W.H., Prior, B.A., (2002) Differentiation of feruloyl esterases on synthetic substrates in α -arabinofuranosidase-coupled and ultraviolet-spectrophotometric assays. *Anal. Biochem.* 311, 68-75.

Blackwell, M., (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 98, 426-438.

Blaich, R., Esser, K., (1975) Function of enzymes in wood destroying fungi. II. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Arch. Microbiol.* 103, 271-277.

Blande, J.D., Korjus, M., Holopainen, J.K., (2010) Foliar methyl salicylate emissions indicate prolonged aphid infestation on silver birch and black alder. *Tree Physiol.* 30, 404-416.

Blum, D.L., Schubot, F.D., Ljungdahl, L.G., Rose, J.P., Wang, B.-C., (2000) Crystallization and preliminary x-ray analysis of the *Clostridium thermocellum* cellulosome xylanase Z feruloyl esterase domain. *Acta Crystallogr., Sect. D Biol. Crystallogr.* D56, 1027-1029.

Borneman, W.S., Hartley, R.D., Himmelsbach, D.S., Ljungdahl, L.G., (1990a) Assay for *trans-p*-coumaroyl esterase using a specific substrate from plant cell walls. *Anal. Biochem.* 190, 129-133.

Borneman, W.S., Hartley, R.D., Morrison, W.H., Akin, D.E., Ljungdahl, L.G., (1990b) Feruloyl and *p*-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 345-351.

Boudet, A.-M., (2000) Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiol. Biochem.* 38, 81-96.

Bouid, O., Navarro, D., Roche, M., Asther, M., Haon, M., Delattre, M., . . . Lesage-Meessen, L., (2005) Fungal enzymes as a powerful tool to release simple phenolic compounds from olive oil by-product. *Process Biochem.* 40, 1855-1862.

- Brink, J., de Vries, R.P., (2011) Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1477-1492.
- Buanafina, M.M.d.O., (2009) Feruloylation in grasses: Current and future perspectives. *Mol. Plant* 2, 861-872.
- Bunzel, M., (2010) Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochem. Rev.* 9, 47-64.
- Claus, H., (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron.* 35, 93-96.
- Crepin, V.F., Faulds, C.B., Connerton, I.F., (2004a) Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 647-652.
- Crepin, V.F., Faulds, C.B., Connerton, I.F., (2004b) Identification of a type-D feruloyl esterase from *Neurospora crassa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 567-570.
- Dalrymple, B.P., Swadling, Y., Cybinski, D.H., Xue, G.-P., (1996) Cloning of a gene encoding cinnamoyl ester hydrolase from the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* E14 by a novel method. *FEMS Microbiol. Lett.* 143, 115-120.
- Damáso, A.R.L., Braga, C.M.P., Brenelli, L.B., Citadini, A.P., Mandelli, F., Cota, J., . . . Squina, F.M., (2013) Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6759-6767.
- de Vries, R.P., VanKuyk, P.A., Kester, H.C.M., Visser, J., (2002) The *Aspergillus niger faeB* gene encodes a second feruloyl esterase involved in pectin and xylan degradation and is specifically induced in the presence of aromatic compounds. *Biochem. J.* 363, 377-386.
- Dias, A.A., Freitas, G.S., Marques, G.S.M., Sampaio, A., Fraga, I.S., Rodrigues, M.A.M., . . . Bezerra, R.M.F., (2010) Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 101, 6045-6050.
- Dinis, M.J., Bezerra, R.M.F., Nunes, F., Dias, A.A., Guedes, C.V., Ferreira, L.M.M., . . . Rodrigues, M.A.M., (2009) Modification of wheat straw lignin by solid state fermentation with white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 100, 4829-4835.
- Dobberstein, D., Bunzel, M., (2010) Separation and detection of cell wall-bound ferulic acid dehydrodimers and dehydrotrimers in cereals and other plant materials by reversed phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8927-8935.
- Donaghy, J., Kelly, P.F., McKay, A.M., (1998) Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 257-260.
- Donaghy, J.A., Kelly, P.F., McKay, A., (1999) Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurized apple juice. *J. Sci. Food Agric.* 79, 453-456.
- Donaghy, J.A., McKay, A.M., (1994) Novel screening assay for the detection of phenolic acid esterases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 41-44.

- Donaghy, J.A., McKay, A.M., (1995) Production of feruloyl/*p*-coumaroyl esterase activity by *Penicillium expansum*, *Penicillium brevicompactum* and *Aspergillus niger*. J. Appl. Bacteriol. 79, 657-662.
- Eastwood, D.C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., . . . Watkinson, S.C., (2011) The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. Science 333, 762-765.
- Farrell, A.E., Plevin, R.J., Turner, B.T., Jones, A.D., O'Hare, M., Kammen, D.M., (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals. Science 311, 506-508.
- Faulds, C.B., Kroon, P.A., Saulnier, L., Thibault, J.-F., Williamson, G., (1995) Release of ferulic acid from maize bran and derived oligosaccharides by *Aspergillus niger* esterases. Carbohydr. Polym. 27, 187-190.
- Faulds, C.B., Molina, R., Gonzalez, R., Husband, F., Juge, N., Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J.A., (2005) Probing the determinants of substrate specificity of a feruloyl esterase, AnFaeA, from *Aspergillus niger*. Febs J. 272, 4362-4371.
- Faulds, C.B., Sancho, A.I., Bartolome, B., (2002) Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60, 489-494.
- Faulds, C.B., Williamson, G., (1993) Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: Purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. Biotechnol. Appl. Biochem. 17, 349-359.
- 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, 779-787.
- Faulds, C.B., Zanichelli, D., Crepin, V.F., Connerton, I.F., Juge, N., Bhat, M.K., Waldron, K.W., (2003) Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase. J. Cereal Sci. 38, 281-288.
- Felici, M., Artemi, F., Luna, M., Speranza, M., (1985) Determination of laccase activity with various aromatic substrates by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 320, 435-439.
- Ferreira, P., Diez, N., Faulds, C.B., Soliveri, J., Copa-Patiño, J.L., (2007) Release of ferulic acid and feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by *Streptomyces tendae*. Bioresour. Technol. 98, 1522-1528.
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R.A., Henrissat, B., . . . Hibbett, D.S., (2012) The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. Science 336, 1715-1719.
- Ford, C.W., Hartley, R.D., (1990) Cyclodimers of *p*-coumaric and ferulic acids in the cell walls of tropical grasses. J. Sci. Food Agric. 50, 29-43.
- Garcia-Conesa, M.-T., Crepin, V.F., Goldson, A.J., Williamson, G., Cummings, N.J., Connerton, I.F., . . . Kroon, P.A., (2004) The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: production of three discrete feruloyl esterases, including a novel enzyme, TsFaeC, with a broad substrate specificity. J. Biotechnol. 108, 227-241.
- Gilles, M., Zhao, J., An, M., Agboola, S., (2009) Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. Food Chem. 119, 731-737.

Goldstone, D.C., Villas-Bôas, S.G., Till, M., Kelly, W.J., Attwood, G.T., Arcus, V.L., (2010) Structural and functional characterization of a promiscuous feruloyl esterase (Est1E) from the rumen bacterium *Butyrivibrio proteoclasticus*. *Proteins Struct., Funct., Bioinf.* 78, 1457-1469.

Graf, E., (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radical Biol. Med.* 13, 435-448.

Guglielmetti, S., De Noni, I., Caracciolo, F., Molinari, F., Parini, C., Mora, D., (2008) Bacterial cinnamoyl esterase activity screening for the production of a novel functional food product. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1284-1288.

Harris, P.J., Trethewey, J.A.K., (2010) The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochem. Rev.* 9, 19-33.

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, 1722-1724.

Hatakka, A., (2001) Biodegradation of lignin. In: Hofrichter, M., Steinbuechel, A. (Eds.), *Biopolymers*. Wiley-VCH, Germany, 129-180.

Hatfield, R.D., Helm, R.F., Ralph, J., (1991) Synthesis of methyl 5-O-*trans*-feruloyl- α -L-arabinofuranoside and its use as a substrate to assess feruloyl esterase activity. *Anal. Biochem.* 194, 25-33.

Hegde, S., Srinivas, P., Muralikrishna, G., (2009) Single-step synthesis of 4-nitrophenyl ferulate for spectrophotometric assay of feruloyl esterases. *Anal. Biochem.* 387, 128-129.

Henke, E., Bornscheuer, U.T., (2002) Esterases from *Bacillus subtilis* and *B. stearothermophilus* share high sequence homology but differ substantially in their properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 320-326.

Henriette, C., Zinebi, S., Aumaitre, M.F., Petitdemange, E., Petitdemange, H., (1993) Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens* (532 S). *J. Ind. Microbiol.* 12, 129-135.

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, 495-506.

Irbe, I., Elisashvili, V., Asatiani, M.D., Janberga, A., Andersone, I., Andersons, B., . . . Grinins, J., (2014) Lignocellulolytic activity of *Coniophora puteana* and *Trametes versicolor* in fermentation of wheat bran and decay of hydrothermally modified hardwoods. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 86, 71-78.

Jacques, N.A., Jacques, V.L., Wolf, A.C., Wittenberger, C.L., (1985) Does an increase in membrane unsaturated fatty acids account for Tween 80 stimulation of glucosyltransferase secretion by *Streptococcus salivarius*? *J. Gen. Microbiol.* 131, 67-72.

Janes, L.E., Lowendahl, A.C., Kazlauskas, R.J., (1998) Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: identifying active and enantioselective hydrolases. *Chem.-Eur. J.* 4, 2324-2331.

Ji, S.-G., Chai, Y.-F., Wu, Y.-T., Yin, X.-P., Liang, D.-S., Xu, Z.-M., Xiao, L., (1999) Determination of ferulic acid in *Angelica sinensis* and *Chuanxiong* by capillary zone electrophoresis. *Biomed. Chromatogr.* 13, 333-334.

- Kathirvel, P., Ravi, S., (2012) Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its *in vitro* cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Nat. Prod. Res.* 26, 1112-1118.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Taniguchi, H., (2002) Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2161-2168.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A., (2008) *Dictionary of the fungi*, 10th Edition. CABI, Wallingford.
- Koseki, T., Fushinobu, S., Ardiansyah, Shirakawa, H., Komai, M., (2009) Occurrence, properties, and applications of feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 803-810.
- Koseki, T., Mihara, K., Murayama, T., Shiono, Y., (2010) A novel *Aspergillus oryzae* esterase that hydrolyzes 4-hydroxybenzoic acid esters. *FEBS Lett.* 584, 4032-4036.
- Kroon, P.A., Faulds, C.B., Brezillon, C., Williamson, G., (1997) Methyl phenylalkanoates as substrates to probe the active sites of esterases. *Eur. J. Biochem.* 248, 245-251.
- Kroon, P.A., Williamson, G., (1996) Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23, 263-267.
- Kroon, P.A., Williamson, G., (1999) Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 79, 355-361.
- Lai, K.K., Lorca, G.L., Gonzalez, C.F., (2009) Biochemical properties of two cinnamoyl esterases purified from a *Lactobacillus johnsonii* strain isolated from stool samples of diabetes-resistant rats. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5018-5024.
- Latha, G.M., Srinivas, P., Muralikrishna, G., (2007) Purification and characterization of ferulic acid esterase from malted finger millet (*Eleusine coracana*, Indaf-15). *J. Agric. Food Chem.* 55, 9704-9712.
- Lesage-Meessen, L., Lomascolo, A., Bonnin, E., Thibault, J.-F., Buleon, A., Roller, M., . . . Asther, M., (2002) A biotechnological process involving filamentous fungi to produce natural crystalline vanillin from maize bran. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102-103, 141-153.
- Linke, D., Matthes, R., Nimtz, M., Zorn, H., Bunzel, M., Berger, R.G., (2013) An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7241-7251.
- Lortie, R., (1997) Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnol. Adv.* 15, 1-15.
- Lüttge, U., Kluge, M., Thiel, G., (2010) *Botanik - Die umfassende Biologie der Pflanzen*. Wiley-VCH, Weinheim.
- MacKenzie, C.R., Bilous, D., (1988) Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1170-1173.
- MacKenzie, C.R., Bilous, D., Schneider, H., Johnson, K.G., (1987) Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2835-2839.

- Majcherczyk, A., Johannes, C., Huttermann, A., (1999) Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation radical and dication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 267-276.
- Majeau, J.-A., Brar, S.K., Tyagi, R.D., (2010) Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour. Technol.* 101, 2331-2350.
- Markwalder, H.U., Neukom, H., (1976) Diferulic acid as a possible crosslink in hemicelluloses from wheat germ. *Phytochemistry* 15, 836-837.
- Martínez, Á.T., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., del Río, J.C., Gutiérrez, A., (2009) Enzymatic delignification of plant cell wall: From nature to mill. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 348-357.
- Mastihuba, V.r., Kremnický, L.r., Mastihubová, M., Willett, J.L., Côté, G.L., (2002) A spectrophotometric assay for feruloyl esterases. *Anal. Biochem.* 309, 96-101.
- Mathew, S., Abraham, T., (2004) Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24, 59-83.
- Mathew, S., Abraham, T.E., (2006) Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Crit. Rev. Microbiol.* 32, 115-125.
- Mayer, A.M., Staples, R.C., (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551-565.
- Messerschmidt, A., (1997) Multi-Copper Oxidases. World Scientific, Singapore.
- Mitsuhashi, K., Yamashita, M., Hwan, Y.S., Ihara, F., Nihira, T., Yamada, Y., (1999) Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acinetobacter* nov. sp. strain KM109. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 63, 1959-1964.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Shleev, S.V., Yaropolov, Y.I., (2007) Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43, 523-535.
- Mukherjee, G., Singh, R.K., Mitra, A., Sen, S.K., (2007) Ferulic acid esterase production by *Streptomyces* sp. *Bioresour. Technol.* 98, 211-213.
- Nardini, M., Dijkstra, B.W., (1999) α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 732-737.
- Nieter, A., Haase-Aschoff, P., Linke, D., Nimtz, M., Berger, R.G., (2014) A halotolerant type A feruloyl esterase from *Pleurotus eryngii*. *Fungal Biology* 118, 348-357.
- O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.-M., Vilgalys, R., (2005) Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5544-5550.
- O'Neill, F.H., Christov, L.P., Botes, P.J., Prior, B.A., (1996) Rapid and simple assay for feruloyl and *p*-coumaroyl esterases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 239-242.
- Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernández, E., Vargas-Arispuro, I., Martínez-Téllez, M.Á., (2012) Plant cell wall polymers: function, structure and biological activity of their derivatives. *Polymerization*, 63-86.

- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., . . . et al., (1992) The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, 197-211.
- Palma, M.B., Pinto, A.L., Gombert, A.K., Seitz, K.H., Kivatinitz, S.C., Castilho, L.R., Freire, D.M.G., (2000) Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86, 1137-1145.
- Panda, T., Gowrishankar, B.S., (2005) Production and applications of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 160-169.
- Prates, J.A.M., Tarbouriech, N., Charnock, S.J., Fontes, C.M.G.A., Ferreira, L.s.M.A., Davies, G.J., (2001) The structure of the feruloyl esterase module of xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* provides insights into substrate recognition. *Structure* 9, 1183-1190.
- Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbuchel, A., (2001) Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 296-314.
- Ralet, M.-C., Faulds, C.B., Williamson, G., Thibault, J.-F., (1994a) Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.* 263, 257-269.
- Ralet, M.-C., Thibault, J.-F., Faulds, C.B., Williamson, G., (1994b) Isolation and purification of feruloylated oligosaccharides from cell walls of sugar-beet pulp. *Carbohydr. Res.* 263, 227-241.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Lu, F., Kim, H., . . . Steinhart, H., (2004) Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochem. Rev.* 3, 79-96.
- Ramirez, L., Arrizon, J., Sandoval, G., Cardador, A., Bello-Mendoza, R., Lappe, P., Mateos-Diaz, J.C., (2008) A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases, and chlorogenate esterases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 711-723.
- Rashamuse, K., Ronneburg, T., Sanyika, W., Mathiba, K., Mmutlane, E., Brady, D., (2013) Metagenomic mining of feruloyl esterases from termite enteric flora. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, doi: 10.1007/s00253-00013-04909-00257.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., (2006) *Biologie der Pflanzen*, 4. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin.
- Record, E., Asther, M., Sigoillot, C., Pages, S., Punt, P.J., Delattre, M., . . . Asther, M., (2003) Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 349-355.
- Reese, E.T., Maguire, A.H., Parrish, F.W., (1969) Benzoyl esterases of fungi. *Can. J. Biochem.* 47, 511-516.
- Robbins, R.J., (2003) Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866-2887.
- Rodgers, C.J., Blanford, C.F., Giddens, S.R., Skamnioti, P., Armstrong, F.A., Gurr, S.J., (2010) Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends Biotechnol.* 28, 63-72.
- Römpp-Lexikon, (2013). Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

- Saha, B.C., (2003) Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279-291.
- Sancho, A.I., Faulds, C.B., Bartolome, B., Williamson, G., (1999) Characterization of feruloyl esterase activity in barley. *J. Sci. Food Agric.* 79, 447-449.
- Saulnier, L., Thibault, J.-F., (1999) Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric.* 79, 396-402.
- Schmidt, G., Krings, U., Nimtz, M., Berger, R.G., (2012) A surfactant tolerant laccase of *Meripilus giganteus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1623-1632.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Soehngen, C., Rother, M., Lang, M., . . . Schomburg, D., (2013) BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Res.* 41, D764-D772.
- Schubot, F.D., Kataeva, I.A., Blum, D.L., Shah, A.K., Ljungdahl, L.G., Rose, J.P., Wang, B.-C., (2001) Structural basis for the substrate specificity of the feruloyl esterase domain of the cellulosomal xylanase Z from *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry* 40, 12524-12532.
- Schwantes, H.O., (1996) *Biologie der Pilze*. Ulmer, Stuttgart.
- SciFinder, (2013) Chemical Abstracts Service. <https://scifinder.cas.org>, 25.11.2013.
- 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, 897-902.
- Takehara, M., Kinoshita, K., Miyamoto, M., Hirohara, H., (2012) A novel alkaline esterase from *Sporosarcina* sp. nov. Strain eSP04 catalyzing the hydrolysis of a wide variety of aryl-carboxylic acid esters. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 76, 1721-1727.
- Thurston, C.F., (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.
- Topakas, E., Christakopoulos, P., Faulds, C.B., (2005) Comparison of mesophilic and thermophilic feruloyl esterases: Characterization of their substrate specificity for methyl phenylalkanoates. *J. Biotechnol.* 115, 355-366.
- Topakas, E., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., (2003a) Production and partial characterization of feruloyl esterase by *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation. *Process Biochem.* 38, 1539-1543.
- Topakas, E., Stamatis, H., Mastihubova, M., Biely, P., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., (2003b) Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters. *Enzyme Microb. Technol.* 33, 729-737.
- Topakas, E., Vafiadi, C., Christakopoulos, P., (2007) Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochem.* 42, 497-509.

- Udatha, D.B.R.K.G., Kouskoumvekaki, I., Olsson, L., Panagiotou, G., (2011) The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases. *Biotechnol. Adv.* 29, 94-110.
- Vafiadi, C., Topakas, E., Christakopoulos, P., Faulds, C.B., (2006) The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: Determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsFaeC. *J. Biotechnol.* 125, 210-221.
- van Tilbeurgh, H., Claeysens, M., (1985) Detection and differentiation of cellulase components using low molecular mass fluorogenic substrates. *FEBS Lett.* 187, 283-288.
- von Hlasiwetz, H., Barth, L., (1866) Mittheilungen aus dem chemischen Laboratorium in Innsbruck: Ueber einige Harze [Zersetzungsproducte derselben durch schmelzendes Kali]. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 138, 61-76.
- Wagschal, K., Lee, C.C., (2012) Microplate-based active/inactive 1° screen for biomass degrading enzyme library purification and gene discovery. *J. Microbiol. Methods* 89, 83-85.
- Wallace, G., Fry, S.C., (1995) *In vitro* peroxidase-catalyzed oxidation of ferulic acid esters. *Phytochemistry* 39, 1293-1299.
- Walton, N.J., Narbad, A., Faulds, C.B., Williamson, G., (2000) Novel approaches to the biosynthesis of vanillin. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 490-496.
- Yoshida, H., (1883) Chemistry of lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc., Trans.* 43, 472-486.
- Zhang, S.-B., Ma, X.-F., Pei, X.-Q., Liu, J.-Y., Shao, H.-W., Wu, Z.-L., (2012) A practical high-throughput screening system for feruloyl esterases: Substrate design and evaluation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74, 36-40.
- Zimmer, C., Platz, T., Cadez, N., Giffhorn, F., Kohring, G.-W., (2006) A cold active (2*R*,3*R*)-(-)-di-*O*-benzoyl-tartrate hydrolyzing esterase from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 132-140.
- Zucca, P., Rescigno, A., Olianas, A., Maccioni, S., Sollai, F.A., Sanjust, E., (2011) Induction, purification, and characterization of a laccase isozyme from *Pleurotus sajor-caju* and the potential in decolorization of textile dyes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 68, 216-222.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Paul Haase-Aschoff
10.12.1982 in Bad Kreuznach

SCHULBILDUNG

1989 – 1993 Grundschule Hofgartenstraße, Bad Kreuznach
1993 – 2003 Gymnasium an der Stadtmauer, Bad Kreuznach
04/2003 Abitur; Prüfungsfächer: Chemie, Mathematik, Deutsch, Erdkunde

WEITERER WERDEGANG

07/2003 – 04/2004 Zivildienstleistender im Sana Rheumazentrum Rheinland-Pfalz AG, Bad Kreuznach
04/2004 – 03/2006 Grundstudium der Lebensmittelchemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Vordiplom
04/2006 – 03/2008 Hauptstudium der Lebensmittelchemie an der Universität Stuttgart-Hohenheim; 1. Staatsexamen
05/2008 – 01/2009 Wissenschaftliche Abschlussarbeit (Diplomarbeit) „Bestimmung halogener Naturstoffe im Meerwasser der australischen Ostküste mittels passiver Probenahme“;
Die praktische Durchführung der Diplomarbeit erfolgte am National Research Centre for Environmental Toxicology (EnTox), University of Queensland, Brisbane, Australien;
Akademischer Grad: Diplom-Lebensmittelchemiker
02/2009 – 04/2009 Sachverständiger des Labor Dr. Haase-Aschoff: Aromastoffanalytik mittels GC-MS, Begutachtung von Getränken, Qualitätssicherung
05/2009 – 04/2010 Berufspraktisches Jahr für Lebensmittelchemiker (2. Staatsexamen) am Chemischen- und Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Stuttgart; Berufsbezeichnung: Staatlich geprüfter Lebensmittelchemiker
07/2010 – 06/2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover; Promotion im Bereich der Biotechnologie