

**Identifizierung, Expression und Charakterisierung waschaktiver  
Enzyme aus Basidiomycota**

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

**Doktor der Naturwissenschaften**

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

**Christoph Jan Behrens, M.Sc.**

geboren am 13.04.1987 in Achim

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Ralf Günter Berger

Korreferent: apl. Prof. Dr. rer. nat. Ursula Rinas

**Tag der Promotion: 15.01.2018**

## **Danksagung**

Herzlichst bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Ralf G. Berger für die Möglichkeit einer Promotion unter hervorragenden Bedingungen, einen großen Freiraum zur Bearbeitung meines Themas sowie für die vielen hilfreichen Anregungen und Lösungsvorschläge.

Frau Dr. Linke danke ich dafür, dass ihre Tür für mich immer offen stand und die vielen tollen und konstruktiven Gespräche, bei denen sie mir immer mit Rat zur Seite stand.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Rinas (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) für die Übernahme des Koreferats, sowie bei Prof. Dr. Turgay (Institut für Mikrobiologie, Leibniz Universität Hannover) für die Bereitschaft, den Vorsitz meiner Disputation zu führen, bedanken.

Der Firma Henkel AG & Co KGaA möchte ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danken.

Einen besonderen Dank gilt meinen Kollegen, die mit mir gemeinsam viele fachliche Diskussionen geführt haben und aus denen immer hervorragende Vorschläge erwachsen sind, für die tolle Arbeitsatmosphäre, den großartigen Zusammenhalt und die gemeinsam verbrachte Zeit.

Als letztes möchte ich mich besonders bei meinen Eltern Helga und Reiner Behrens bedanken, die mich schon früh förderten, mir mein Studium ermöglichten und mich immer wieder im Laufe meines Lebens ermutigten, meinem Drang nach Wissen nachzugehen.

## Zusammenfassung

Enzyme gehören durch ihre Substratspezifität und Aktivität unter milden Bedingungen zu den bedeutendsten Inhaltsstoffe moderner Waschmittel, sodass ein großes Interesse an immer neuen und verbesserten Enzymen besteht. Wichtige Lieferanten von neuen Proteinen sind dabei die verschiedensten Gattungen der Basidiomycota, da diese noch wenig beforscht sind und aufgrund ihrer Lebensräume eine Vielfalt an Enzymen aufweisen.

Vier verschiedene basidiomycotische Dye-decolorizing Peroxidasen (BaDyP, AajDyP, MsP2 und PoDyP) wurden in *E. coli* mittels eines speziellen Niedrigtemperatursystems exprimiert, um diese anschließend auf ihr Entfärbungspotential von Carotenoiden zu testen. Die Expression der Peroxidasen erfolgte erstmals ohne die Induktion von zusätzlichen, faltungshelfenden Chaperonen oder den Zusatz von Cofaktoren wie Hemin. Anschließende *Downstream*-Prozesse konnten hierdurch vereinfacht werden. Die Präsenz der nativen Signalsequenz hatte dabei großen Einfluss sowohl auf die Expressionsrate als auch auf die Möglichkeit der Reinigung mittels HexaHis-Tags. Drei der vier produzierten Proteine katalysierten den Abbau des Carotenoids Norbixin, wobei sie ein pH- Optimum zwischen vier und sieben aufwiesen.

Darüber hinaus wurde eine Laccase aus *Pleurotus pulmonarius* aufgrund ihrer Anthocyan abbauenden Aktivität identifiziert, wobei sich diese durch die Präsenz einer für *Pleurotus*-Laccasen spezifischen C-terminalen Sequenz auszeichnete. Im Gegensatz zu anderen beschriebenen Laccasen hatte die Deletion von bis zu 13 Aminosäure keinen Einfluss auf die Aktivität oder die Spezifität des Enzyms. Verschiedene Expressionsstrategien in *P. pastoris* zeigten geringe Unterschiede zwischen den Signalsequenzen, während eine Codonoptimierung der DNA Sequenz die Aktivität um den Faktor sechs auf 7000 U/L steigerte. Alle Varianten bleichen Triarylmethan- sowie Azofarbstoffe. Zusätzlich konnte der Abbau der Carotenoide  $\beta$ -Carotin sowie Norbixin erstmal erfolgreich mittels einer Laccase durchgeführt werden.

Die Glucosidase BadGluc aus *Bjerkandera adusta* wurde ebenfalls als Anthocyanase identifiziert. Die identifizierte Proteinsequenz wies dabei nur geringe Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Glucosidasen sowie ein bisher unbekanntes Motiv des aktiven Zentrums auf. Die heterologe Expression in *P. pastoris* konnte Aktivitäten von 100 U/L erzielen, wobei das produzierte Protein eine gute Hitzestabilität sowie ein breites pH-Optimum aufwies. Die bevorzugten Substrate waren Delphinidin-3-Glucosid und Cyanidin-3-Glucosid. BadGluc war ebenfalls in der Lage vorgefärbte Lämpchen zu bleichen, was sie zur ersten Waschmittel geeigneten Anthocyanase macht.

Schlagerworte: Waschaktive Enzyme, Basidiomyceten, Heterologe Expression

## Abstract

Enzymes have a broad substrate specificity and an activity under mild conditions making them one of the main ingredients of modern laundry detergents which results in a constant interest for new and improved proteins. An important source for new proteins are the genera of Basidiomycota which are not researched in deep so far in spite of their broad range of various enzymes, an adaptation to their specific habitats.

Four different basidiomycotic DyPs (BaDyP, AajDyP, MsP2 and PoDyP) were produced in *E. coli* using a low temperature expression system and tested for their destaining capability of carotenoids. The production of all four enzymes was performed for the first time without the induction of additional chaperones or the addition of co-factors like hemin, leading to a simplified downstream process. The presence of the native signal sequence had a huge impact on the expression rate as well as the efficiency of the hexaHis-Tag purification. Three out of four enzymes were capable of degrading the carotene norbixin having an optimal pH between 4 and 7.

Furthermore a laccase from *Pleurotus pulmonarius* was identified as an anthocyanase which had a unique C-terminal tail region that can only be found in laccases from the *Pleurotus* genus. In contrast to other known laccases a deletion of up to 13 amino acids in this region had no influence on the activity or the specificity. A comparison between different expression strategies in *P. pastoris* showed only little differences between the tested signal sequences, while a codon optimization led to an increase of activity by the factor of six up to 7000 U/L. All tested variants were able to bleach triarylmethan- as well as azodyes. Additionally for the first time a degradation of the carotenes  $\beta$ -carotene as well as norbixin using a laccase could be demonstrated.

The glucosidase BadGluc from *Bjerkandera adusta* was identified as an anthocyanase. The obtained protein sequence had only a low similarity to other known glucosidases and an unique active site motif that was only found in a few hypothetical proteins. heterologous expression in *P. pastoris* yielded activities of up to 100 U/L. The obtained protein had a good heat stability and a broad pH range using artificial substrates. The best natural substrates were delphinidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside in liquid solutions. Additionally, the enzyme was able to bleach pre-stained fabrics making it the first known candidate anthocyanase for applications in the detergent and food industries.

Keywords: wash-active enzymes, Basidiomycota, heterologous expression

## Vorbemerkung

Diese Arbeit basiert auf zwei in *peer reviewed* Zeitschriften veröffentlichten Artikel, sowie einem in einer *peer reviewed* Zeitschrift einzureichenden Artikel.

- Behrens, C.J., Zelena, K., and Berger, R.G. (2016). Comparative Cold Shock Expression and Characterization of Fungal Dye-Decolorizing Peroxidases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1404-1417.
- Behrens, C.J., Linke, D., Allister, A.B., Zelena, K., and Berger, R.G. (2017). Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 137, 34-42.
- Behrens, C.J., Krahe, N.K., Linke, D., Berger, R.G (2017). BadGluc, a  $\beta$ -Glucosidase from *Bjerkandera adusta* with anthocyanase properties.

Nachfolgend gelistete Veröffentlichungen, Vorträge, Poster sowie Patente sind im Rahmen dieser Doktorarbeit entstanden, jedoch nicht Teil dieser Dissertationsschrift.

### Artikel:

Kolwek, J.; Behrens, C; Linke, D.; Krings, U.; Berger, R.G. (2017) Cell-free one-pot conversion of (+)-valencene to (+)-nootkatone by a unique dye-decolorizing peroxidase combined with a laccase from *Funalia trogii*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*

### Vorträge:

Behrens, C., Leonhardt, R., Kelle, S., Zelena, K, Berger, R.G. (2016) Expression of basidiomycetous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by spacer regions between the signal peptide and the protein sequence, *Pichia 2016*, 3-6.4.2016, Antalya, Türkei

### Poster:

Behrens, C., Leonhardt, R., Kelle, S., Zelena, K, Berger, R.G. (2016) Expression of basidiomycetous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by spacer regions between the signal peptide and the protein sequence, 8<sup>th</sup> International Congress on Biocatalyse, 28.8-1.9.2016, Hamburg, Deutschland.

Patente:

Mussmann, N., O'Connell, T., Herbst, D., Prueser, I., Berger, R.G., Linke, D., and Behrens, C. A laccase from *Pleurotus pulmonarius* suitable for use in laundry detergents to improve wash performance. PCT Int. Appl., 41pp. WO2016193335A1

Mussmann, N., O'Connell, T., Herbst, D., Prueser, I., Berger, R., Linke, D., and Behrens, C. A laccase from *Lentinula edodes* suitable for use in laundry detergents to improve wash performance. Ger. Offen., 19pp. DE 102015210368 (A1)

Mussmann, N., O'Connell, T., Herbst, D., Prueser, I., Berger, R.G., Linke, D., and Behrens, C. A laccase from *Pleurotus ostreatus* var. *florida* suitable for use in laundry detergents to improve wash performance. Ger. Offen., 18pp. DE 102015210369 (A1)

Mussmann, N., O'Connell, T., Herbst, D., Prueser, I., Berger, R.G., Linke, D., and Behrens, C. A laccase from *Trametes* suitable for use in laundry detergents to improve wash performance. Ger. Offen., 19pp., DE102015210367 (A1)

Mussmann, N., O'Connell, T., Herbst, D., Prueser, I., Berger, R.G., Linke, D. and Behrens, C. (2016). A laccase from *Pleurotus pulmonarius* suitable for use in laundry detergents to improve wash performance, 19pp. DE 102015210370 (A1)

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	III
Zusammenfassung.....	IV
Abstract.....	V
Vorbemerkung.....	VI
Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
<b>1. Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur.....</b>	<b>1</b>
1.1. Waschmittel im Wandel der Zeit.....	1
1.2. Nachhaltigkeit von Waschmitteln.....	2
1.3. Enzyme als Biokatalysatoren.....	3
1.3.1. Basidiomycota als Quelle von Enzymen.....	5
1.3.2. Peroxidasen.....	7
1.3.3. Laccasen.....	10
1.3.4. $\beta$ -Glukosidasen.....	13
1.4. Heterologe Expressionssysteme.....	16
1.4.1. <i>Escherichia coli</i> .....	18
1.4.2. <i>Pichia pastoris</i> .....	20
1.5. Ziele der Arbeit.....	22
<b>2. Vorwort zur Publikation „Comparative cold shock expression and characterization of fungal dye decolorizing peroxidases”.....</b>	<b>23</b>
<b>3. Comparative cold shock expression and characterization of fungal dye decolorizing peroxidases.....</b>	<b>24</b>
3.1. Abstract.....	24
3.2. Keywords.....	24
3.3. Introduction.....	25
3.4. Methods.....	26
3.4.1. Chemicals and Materials.....	26
3.4.2. Strains and culture conditions.....	26
3.4.3. RNA extraction and cDNA synthesis.....	26
3.4.4. Primer Design, PCR and Cloning.....	27
3.4.5. Cultivation of the production strains and DyP expression.....	28
3.4.6. Chaperones co-expression.....	28
3.4.7. Expression analysis.....	29
3.4.8. Purification of recombinant DyP peroxidases.....	29



3.4.9.	ABTS Assay .....	29
3.4.10.	Application assay .....	30
3.5.	Results and discussion.....	30
3.5.1.	Amplification of target genes MsP2, BaDyP, AajDyP and PoDyP.....	30
3.5.2.	Expression of the DyP peroxidases and optimization of the culture conditions.....	32
3.5.3.	Purification .....	34
3.5.4.	Biochemical characterization .....	35
3.5.5.	Annatto degradation .....	36
3.6.	Conclusion.....	38
3.7.	Acknowledgments .....	38
4.	<b>Vorwort zur Publikation “Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from <i>Pleurotus pulmonarius</i> expressed in <i>Pichia pastoris</i>” .....</b>	<b>39</b>
5.	<b>Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from <i>Pleurotus pulmonarius</i> expressed in <i>Pichia pastoris</i>.....</b>	<b>40</b>
5.1.	Abstract .....	40
5.2.	Introduction .....	40
5.3.	Methods.....	41
5.3.1.	Chemicals and Materials .....	41
5.3.2.	Strains and culture conditions .....	41
5.3.3.	Purification .....	42
5.3.4.	ESI tandem MS analysis .....	42
5.3.5.	Amplification of PpuLcc.....	42
5.3.6.	Expression analysis .....	43
5.3.7.	His-Tag purification of the heterologously expressed protein.....	43
5.3.8.	Activity assays.....	43
5.3.9.	Decolourization assays .....	44
5.3.10.	Gel electrophoresis .....	44
5.4.	Results and discussion.....	45
5.4.1.	Purification and identification of laccase activity .....	45
5.4.2.	Primer Design, PCR and Cloning .....	45
5.4.3.	Construction of expression constructs.....	48
5.4.4.	Expression analysis of the different constructs .....	48
5.4.5.	Characterization of the expressed proteins.....	50
5.4.6.	Degradation of dyes .....	53
5.5.	Conclusion.....	54
5.6.	Supplement.....	55

6.	<b>Vorwort zur Publikation “BadGluc, a <math>\beta</math>-Glucosidase from <i>Bjerkandera adusta</i> with anthocyanase properties”</b> .....	58
7.	<b>BadGluc, a <math>\beta</math>-Glucosidase from <i>Bjerkandera adusta</i> with anthocyanase properties</b> .....	59
7.1.	Abstract .....	59
7.2.	Introduction .....	60
7.3.	Methods .....	61
7.3.1.	Chemicals and Materials .....	61
7.3.2.	Strains and culture conditions .....	61
7.3.3.	Purification strategy of wildtype glycosidase .....	61
7.3.4.	Gel electrophoresis .....	62
7.3.5.	ESI tandem MS analysis .....	62
7.3.6.	Amplification of BadGluc .....	62
7.3.7.	Expression analysis .....	63
7.3.8.	Activity assays.....	63
7.3.9.	Anthocyanin degradation .....	64
7.3.10.	Washing assay .....	64
7.3.11.	Purification strategy of recombinant BadGluc .....	64
7.3.12.	Sequence accession numbers .....	65
7.4.	Results and discussion.....	65
7.4.1.	Purification and identification of the glucosidase activity.....	65
7.4.2.	Amplification of the anthocyanase of <i>B. adusta</i> .....	66
7.4.3.	Construction of expression constructs.....	69
7.4.4.	Purification of the expressed BadGluc .....	69
7.4.5.	Characterization of the expressed proteins.....	70
7.4.6.	Hydrolysis of anthocyanins .....	72
7.5.	Conclusion.....	73
8.	Ausblick .....	74
9.	<b>Vorwort zum Abschnitt “Establishing the CRISPR-Cas9 system for the use of Basidiomycota”</b> .....	76
10.	<b>Establishing the CRISPR-Cas9 system for the use of Basidiomycota</b> .....	77
10.1.	Introduction .....	77
10.2.	Methods .....	78
10.2.1.	Chemicals and materials.....	78
10.2.2.	Strains and culture conditions .....	78
10.2.3.	Vector construction .....	78

10.2.4.	<i>U. maydis</i> transformation protocol.....	79
10.2.5.	Evaluation of the mutation rate .....	80
10.3.	Results and discussion.....	81
10.4.	Conclusion.....	83
11.	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	84
12.	<b>Lebenslauf</b> .....	106

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)</i> (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AOX1	Alkoholoxidase 1-codierendes Gen
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMM	<i>Buffered minimal media</i> (Gepuffertes Minimalmedium)
CAZY	<i>Carbohydrate Active enZYme</i> (Kohlenhydrat aktives Enzyme)
Da	Dalton
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
DyP	<i>Dye decolorizing peroxidase</i> (Farbstoff entfärbende Peroxidase)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Electrosprayionisierung)
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kcat	Katalytische Produktivität
Km	Michaeliskonstante
LB	<i>Lysogeny broth</i> (Lysogene Brühe)
LiP	Ligninperoxidasen
LRET	<i>Long range electron transfer</i> (Langdistanzelektronentransfer)
MCO	<i>Multi copper oxidases</i> (Multi Kupfer Oxidasen)
MnP	Manganperoxidasen
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i> (Molekülmassengrenze)
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i> (Nationales Zentrum für Biotechnologische Informationen)

Ni-NTA	<i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i> (Nickel-Nitrilotriessigsäure)
OD	Optische Dichte
P <sub>AOX1</sub>	Promotor des AOX1 Gens
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDB	<i>Protein data bank</i> (Proteindatenbank)
PES	Poly(oxy-1,4-phenylsulfonyl-1,4-phenyl)
QTOF	<i>Quadrupole time of flight</i> (Quadropol-Flugzeitmassenspektrometer)
RBV	Remazol brilliant violet
Sd	<i>Standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfate)
SNL	<i>Standard nutrient liquid medium</i> (Standardnährflüssigkeit)
TNC	<i>Trinuclear copper complex</i> (trinuklearen Kupferkomplex)
Vp	Versatile Peroxidasen
YEPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i> (Hefeextrakt Peptone Glucose)

## **1. Einordnung der Forschungsthemen und wichtigsten Erkenntnisse aus den Publikationen im Kontext der wissenschaftlichen Literatur**

### **1.1. Waschmittel im Wandel der Zeit**

Die Geschichte des Waschens ist eng mit der Entwicklung der Zivilisation verbunden. Die ersten Zeugnisse waschaktiver Zusätze fanden sich im vorderen Orient mit der Verwendung von Pottasche und Soda bereits um das Jahr 4500 v. Chr.. Auf etwa 2000 Jahre später lässt sich die Erwähnung von Seife mittels sumerischer Tontafeln datieren. Anschließend sollte es noch einmal bis ins Jahre 167 n. Chr. dauern, bis Seife als Waschmittel bei den Römern Verwendung fand. Die zu dieser Zeit hergestellten Seifen waren noch relativ unrein, jedoch wurde die Herstellung und Qualität durch neue Kenntnisse der Mauren im siebten Jahrhundert und ständige Weiterentwicklung durch organisierte Seifer in Europa deutlich verbessert. Die industrielle Herstellung von Seifen wurde erst durch die künstliche Herstellung von Soda durch Leblanc (1789) und die Verbesserung der Synthese durch Solvay (1863) möglich. Im Jahre 1878 wurde dann das erste Waschmittel in Pulverform in Deutschland auf den Markt gebracht, was heute als Beginn der modernen Waschmittelentwicklung definiert werden kann [1]. Nur wenige Jahrzehnte (1907) später wurde das erste Vollwaschmittel namens „Persil“ entwickelt, welches zusätzlich noch Bleiche enthielt. Durch diese Weiterentwicklung konnte auf die langwierige und wetterabhängige Rasenbleichung verzichtet werden, die damals zu den mühsamen und langwierigen Tätigkeiten des Waschens gehörte [2].

Eine Zäsur in der Entwicklung der Waschmittel war das Aufkommen elektrischer Waschmaschinen nach 1945, die eine Anpassung der Rezepturen erforderlich machte. Im Zuge der Entwicklung von maschinen-geeigneten Waschmitteln setzten sich ebenfalls die modernen Tenside durch. Diese wurden zwar bereits 1932 zum ersten Mal im Feinwaschmittel „Fewa“ eingesetzt, um die Seife zu ersetzen, konnten sich jedoch erst mit der neuen Generation an Waschmitteln am Markt etablieren [3]. Zusätzlich zur Ersetzung der Seife durch Tenside musste auch nach neuen Möglichkeiten der Wasserenthärtung gesucht werden, da das Ausfällen mittels Soda für Waschmaschinen ungeeignet war [1]. Hier setzten sich zuerst Polyphosphate durch, welche später beispielsweise durch Zeolith A ersetzt wurden. Ein weiterer Fortschritt war die Entdeckung der Bleichaktivatoren im Jahre 1977, die ein Waschen bei niedrigeren Temperaturen ermöglichten [4].

Zusätzlich zu diesen chemischen Komponenten gewinnen Enzyme seit den 1960 Jahren eine immer größer werdende Bedeutung im Waschprozess, was sie zu einem guten Ziel für die Weiterentwicklung von Waschmitteln macht [5].

## 1.2. Nachhaltigkeit von Waschmitteln

Ein Fokus der Waschmittelenwicklung war stets der Aspekt der Nachhaltigkeit bzw. der Umweltverträglichkeit. Etwa mit Beginn der 1960er Jahre traten die durch Waschmittel verursachten Umweltschäden in den Vordergrund. Die unzureichende biologische Abbaubarkeit des damals verwendeten Tensides Tetrapropylenbenzensulfonat führte zu den bekannten Schaumbergen in Flüssen und Seen [3]. Für große Probleme sorgten auch die für die Wasserenthärtung benutzten Polyphosphate, die eine Überdüngung von Gewässern und ihre daraus resultierende Eutrophierung zur Folge hatte [6]. Während diese Probleme mittlerweile durch den Einsatz alternativer Inhaltsstoffe behoben sind, liegt der Fokus der Forschung auf verringertem Waschmittel- aber auch Wasser- und Energieverbrauch. So konnte der Verbrauch von 8,9 kg (1990) auf 7,1 kg Waschmittel pro Jahr und Person im Jahre 2009 gesenkt werden [1]. Noch drastischer ist der Wasserverbrauch pro Waschgang von etwa 180 L auf nur noch 50 L innerhalb der letzten 30 Jahre gesunken [7]. Durch weiterentwickelte Rezepturen der Waschmittel konnte auch die durchschnittliche Waschtemperatur von 63 °C auf 46 °C gesenkt werden [1]. Wird bei jeder Wäsche jeweils ein um eine Stufe kälteres Waschprogramm genutzt, lässt sich hierdurch der Energiebedarf um etwa 37 % senken [8]. Mit diesem Wissen hat beispielweise die Firma *Procter & Gamble*, einer der größten Produzenten von Waschmitteln weltweit, das Ziel, dass bis 2020 70 % aller Waschladungen mit Kaltwasser gewaschen werden [9]. Der Trend zum Waschen bei niedrigen Temperaturen wurde dabei durch zwei wichtige Entwicklungen möglich: Zum einen die bereits erwähnten Bleichaktivatoren, die eine effektive Bleichung auch bei niedrigeren Temperaturen erlauben, zum anderen jedoch überwiegend durch den vermehrten Einsatz von Enzymen, die ihr Wirkoptimum in der Regel zwischen 20 °C und 40 °C besitzen und somit optimal bei niedrigeren Temperaturen eingesetzt werden können.

### 1.3. Enzyme als Biokatalysatoren

Erstmals wurden Enzyme im Jahre 1913 im Waschmittel „Burnus“ verwendet, wobei es sich um die Protease Trypsin aus dem Schweinepankreas handelte. Diese war jedoch unter den vorhandenen Konditionen weder besonders aktiv noch stabil, sodass es bis zum Jahr 1963 dauern sollte, bis durch die Vermarktung einer verbesserten Protease der Firma Nova der Markt des Heimwaschmittels erschlossen wurde [5]. Bereits fünf Jahre später enthielten 50 % aller Starkreiniger Enzyme zur Verbesserung der Waschleistung [10]. In den 1970er Jahre kamen dann die ersten  $\alpha$ -Amylasen, Mitte der 80er Jahre Cellulasen [5] und die erste Lipase 1988 auf den Markt [11].

Eine wichtige Voraussetzung für diese Entwicklung waren die Fortschritte in der Biotechnologie. So wurden am Anfang der Entwicklung die Enzyme von ihrem natürlichen Wirt produziert (homologe Produktion), sodass eine Produktionssteigerung nur durch eine Verbesserung des Produktionsstammes erreicht werden konnte. Dies geschah durch Mutagene, wie beispielsweise UV-Strahlung und war ungerichtet. Später kamen gerichtete Mutationsmöglichkeiten hinzu, die gezielte Veränderungen der DNA erlaubten, wodurch die Entwicklung von neuen Stämmen deutlich beschleunigt werden konnte [5]. Dem gegenüber steht die heterologe Produktion von Enzymen in fremden Wirten. Diese ist notwendig, wenn der Quellorganismus des Proteins dieses nur in kleinen Mengen synthetisiert oder eine industrielle Verwendung des Organismus nicht möglich ist.

Der Vorteil des Einsatzes von Enzymen in Waschmitteln liegt dabei auf der Hand. Durch ihre hohe Substratspezifität richtet sich die Enzymaktivität ausschließlich gegen die Verschmutzung und nicht gegen das Waschgut, wobei es hier auch (gewollte) Ausnahmen gibt. Ebenfalls wichtig ist die Tatsache, dass Enzyme als Biokatalysatoren fungieren und in der Reaktion nicht verbraucht werden, wodurch sie im Waschmittel ein gutes Volumen/Wirkungs-Verhältnis besitzen [12]. Zusätzlich sorgen sie durch ihre Effektivität dafür, dass die Waschzeiten verkürzt und somit der Energie- sowie Wasserverbrauch gesenkt werden konnte. Durch ihre gute Aktivität auch bei niedrigeren bis neutralen pH-Werten helfen sie umweltfreundlicher und somit nachhaltiger zu waschen, da zum einen die Abflüsse weniger stark basisch sind und zum anderen weniger Base in die Waschmittel zugesetzt werden muss [13]. Ein weiteres Beispiel für diese Nachhaltigkeit ist die Multienzymlösung LipoClean, deren Einsatz etwa 25 % der Tenside im Waschmittel ersetzen kann [11].

Während die Wirkung von Enzymen zwar prinzipiell auf dem Abbau des Substrates beruht, so ist der vollständige Abbau des Substrates während des Waschprozesses nicht notwendig. Die Hauptaufgabe dieser Agenzien im Waschmittel ist das Loslösen des Schmutzes von der Matrix,



sodass dieser durch die abiotischen Faktoren des Waschens, wie mechanische Belastungen, Wasserfluss oder auch Tenside, vollständig entfernt werden kann [14].

Die gegenwärtig am häufigsten verwendeten Enzyme in Waschmitteln sind Peptidasen, die zum Abbau von organischen Flecken wie Gras, Blut, Ei und Schweiß genutzt werden [15]. Ebenfalls wichtig sind Amylasen, die etwa 30 % des Enzymumsatzes ausmachen. Diese Enzyme bauen die schwer lösliche Stärke zu leicht löslichen Einfach- und Mehrfachzuckern ab, wodurch die Löslichkeit der Verschmutzungen erhöht wird [16]. Zusätzlich können noch Lipasen enthalten sein, die Fette und Öle abbauen. Des Weiteren werden dem Waschmittel Cellulasen zugesetzt, welche die Cellulosefäden des Waschguts modifizieren, wodurch eine Farbaufhellung sowie eine weichere Textur erreicht wird [13].

Diese waschmittelgeeigneten Enzyme verbinden dabei mehrere Gemeinsamkeiten: Hohe Stabilität gegenüber thermischen Einflüssen, sowohl während des Waschvorganges als auch während der Lagerung, eine breite Spezifität für ein großes Wirkspektrum, sowie eine optimale Aktivität bei standardmäßig in Waschmitteln verwendeten pH-Werten [17]. Dabei entscheiden zusätzlich noch die Zusammensetzung und Dosierung des Waschmittels, der pH und die Pufferkapazität, die Wasserhärte sowie die Waschdauer und das Material des Waschguts über die Leistung des Waschenzyms [14].

Zur weiteren Verbesserung von Enzymen im Allgemeinen, aber auch für Waschmittel im Speziellen, stehen prinzipiell zwei Wege offen: Zum einen die Optimierung von bereits bekannten und etablierten Proteinen durch gezielte oder zufällige Mutationen, die die Charakteristika des Enzyms verbessern [18]. Zum anderen durch die Identifizierung von neuen Enzymen aus bisher nicht oder nicht hinreichend erforschten Enzymquellen wie beispielweise den Basidiomycota [19].

### 1.3.1. Basidiomycota als Quelle von Enzymen

Die Basidiomycota repräsentieren zusammen mit den Ascomycota die größten Abteilungen der Pilze. Es wird davon ausgegangen, dass insgesamt etwa 1,5-5 Millionen Arten existieren, wovon nur etwa 100.000 beschrieben und hiervon auch nur etwa 10 % charakterisiert sind [20]. Dabei entfiel das größte Interesse bislang auf die Ascomyceten, die 70 % der charakterisierten Pilze ausmachen, obwohl Basidiomyceten in den Bereichen der Kohlenstoffkreisläufe, Ökosystemabläufe, aber auch medizinischen Anwendungen eine wichtige Rolle besitzen [21]. Dieser Fokus verschiebt sich gerade mehr in Richtung der Basidiomyceten, wobei sich das steigende Interesse dabei an der stark steigenden Anzahl an bekannten Genomen erkennen lässt. So listet das Joint Genome Institute [22] gegenwärtig mehr als 290 basidiomycetische Genome auf, während dies vor einigen Jahren weniger als 10 waren [21]. Dieser rasche Fortschritt ist auf der einen Seite sicherlich durch die Vereinfachung von *de novo* Sequenzierungen bedingt, auf der anderen Seite aber auch durch zielgerichtete Programme wie das „1000 Fungal Genomes“ [23].

Basidiomyceten sind in einer Vielzahl von ökologischen Nischen anzutreffen und wachsen auf Substraten wie (abgestorbenen) Nadel- und Laubbäumen, Streu, Feldfrüchten, Rasendecken oder Pflanzenwurzeln [24]. Holzabbauende Pilze werden dabei in die Gruppe der Weißfäulepilze, die etwa 90 % aller Arten beinhaltet, sowie in Braunfäulepilze eingeteilt [25]. Während Weißfäulepilze sowohl Lignin als auch Polysaccharide wie Cellulose und Hemicellulose abbauen, ist dies bei Braunfäulepilzen nicht der Fall. Interessanterweise ist dabei das Aufkommen der Vorläufer der Weißfäulepilze für das Ende der Kohlebildung im Zeitalter des Tertiär verantwortlich, da diese als erste Organismen Lignin in nennenswerter Weise abbauen konnten, welches vorher für die Bildung der Kohleflöze verantwortlich war [26].

Das Besiedeln dieser diversen Lebensräume der Basidiomyceten ist dabei nur durch die Existenz einer Vielzahl von spezialisierten Enzymen möglich. Allein für den Abbau von Lignin setzen Basidiomyceten dabei Enzyme wie verschiedene Varianten der Peroxidasen (Lignin Peroxidasen, manganabhängige Peroxidasen, versatile Peroxidasen, Dye-decolorizing Peroxidasen) für die Oxidierung des Substrates, sowie Oxidoreduktasen (Aryl-Alkohol Oxidasen oder auch Glyoxal Oxidasen) für die Generierung des Cosubstrates Wasserstoffperoxid ein. Zusätzlich zu diesen Enzymen werden ebenfalls Laccasen sekretiert, die direkt molekularen Sauerstoff nutzen können, um Lignin zu oxidieren [27]. Weiterhin degradieren Pilze Cellulose und Hemicellulose durch eine Vielzahl von Cellulasen. Hierzu gehören Glucanhydrolasen, Cellobiohydrolasen, Cellodextrinasen sowie  $\beta$ -Glukosidasen [28]. Neben diesen wichtigen Enzymen des Primärmetabolismus unterscheiden sich Basidiomyceten

von anderen Organismen ebenfalls signifikant in ihrem Sekundärmetabolismus [29]. So wurden beispielweise hunderte verschiedene Terpene beschrieben, von denen viele nur in Basidiomyceten nachgewiesen wurden und von einer großen Zahl an Sesquiterpensynthesen hergestellt werden [21].

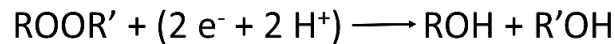
Da neben den Pilzen nur einige wenige Arten von Bakterien Lignin abbauende Enzyme produzieren [30], erfahren diese Pilze beispielweise zur Optimierung der Erzeugung von Biokraftstoffen großes industrielles Interesse [31]. Die Enzyme des Cellulasesystems werden dabei ebenfalls in diesem Bereich eingesetzt, um die aus der Cellulose entstehenden Monomere nutzen zu können [28].

Ein weiteres Feld von möglichen Anwendungen ist die Behandlung von kontaminierten Abwässern, die durch den Einsatz von isolierten Enzymen wie Laccasen oder Tyrosinasen, oder auch durch Ganzzellsysteme erfolgen könnte [32].

Zusätzlich zu diesen Anwendungen lässt sich über den Einsatz von basidiomycetischen Enzymen in der Waschmittelindustrie nachdenken. So konnten bereits waschaktive Peptidasen [19] oder auch Peroxidasen [33] aus Basidiomyceten isoliert werden. Zusätzlich zu den in Kapitel 1.3 bereits beschriebenen Enzymen, die gegen die großen Gruppen von pflanzlichen Inhaltsstoffen wie Stärke, Proteine oder Lipide wirken, sollten die Produkte des Sekundärmetabolismus ebenfalls nicht vernachlässigt werden. So besitzen pflanzliche Farbstoffe wie beispielsweise Carotinoide oder Anthocyane ebenfalls die Fähigkeit sich im Waschgut dauerhaft festzusetzen, sodass eine zielgerichtete Behandlung dieser Stoffklassen notwendig ist. Hierfür eignen sich die Enzymklassen der Peroxidasen, Laccasen oder Glycosidasen, die in großer Vielfalt in Basidiomyceten vorhanden sind.

### 1.3.2. Peroxidasen

Die Gruppe der Peroxidasen [EC 1.11.1] ist ein wichtiger Vertreter der Oxidoreduktasen, wobei diese Enzyme ubiquitär in der Natur vorhanden sind und dort vielfältige Aufgaben haben. Peroxidasen folgen dabei prinzipiell folgendem Reaktionsschema:



Während sie in vielen Fällen bei der Bewältigung von oxidativem Stress beispielsweise in pflanzlichen Zellen helfen [34], können sie auch als Redoxsensor oder in der Signaltransduktion Verwendung finden [35]. Ein weiteres großes Einsatzgebiet von Peroxidasen in der Natur wurde etwa ab den 1980er intensiv beforscht. Dabei handelt es sich um den Abbau von Lignin, einem der meistverbreiteten Biomoleküle der Welt. Besonders im Vordergrund stehen dabei die Klassen der Ligninperoxidasen (LiP, EC 1.11.1.14), Manganperoxidasen (MnP, EC 1.11.1.13) sowie der versatilen Peroxidasen (VP, 1.11.1.16) [35]. Interessanterweise lassen sich in allen bisher sequenzierten Genomen der Klasse der Weißfäulepilze aus der Abteilung der Basidiomycota Ligninperoxidasen nachweisen, während dies bei den Braunfäulepilzen nicht der Fall ist [36], die diese Enzyme im Laufe der Evolution wieder verloren haben [21].

Zusätzlich zu diesen stark beforschten Peroxidasen gibt es die relativ neu eingeführte Klasse der *Dye decolorizing* Peroxidasen (DyPs). Während die ursprüngliche Klassifizierung der Peroxidasen nur zwei Superfamilien aufwies (pflanzliche Peroxidasen & tierische Peroxidasen) [37], musste diese Systematik verändert werden. Der erste Vertreter dieser neuen Familie wurde 1999 isoliert, wobei sich herausstellte, dass diese Peroxidasen nur wenig Gemeinsamkeiten mit den restlichen Peroxidasen besitzen [38]. Da DyPs überwiegend in Bakterien vorkommen und deutlich weniger Vertreter in Pilzen oder höheren Eukaryonten vertreten sind, wurde im Jahre 2010 vorgeschlagen, diese Familie in bakterielle Peroxidasen mit insgesamt vier Subklassen (A-D) umzubenennen [39]. Während in den Klassen B und C überwiegend intrazelluläre Proteine enthalten sind, lassen sich in Typ A DyPs Tat-abhängige Exportsignale finden, wodurch diese in der Regel im Sekretom zu finden sind. Der Subklasse der Typ D DyPs sind dabei überwiegend pilzliche DyPs zugeordnet [40]. Bereits kurze Zeit später wurde diese Klassifizierung jedoch wieder in Frage gestellt. So wurde vorgeschlagen, diese auf drei Subklassen (P, I, V) zu begrenzen [41], sodass die Klassifizierung der DyPs noch nicht abschließend geklärt ist. Wesentliche Unterschiede der DyPs zu den restlichen Peroxidasen sind dabei die Fähigkeit, bei deutlich niedrigeren pH-Werten aktiv zu sein, eine geringe Homologie zu anderen Peroxidasen, sowie eine breite Substratspezifität [42]. Neben den für Peroxidasen typischen Substraten können sie beispielsweise noch hydroxylfreies Anthrachinon abbauen, welches ein Grundbaustein der Anthrachinonfarbstoffe ist. Da diese Farbstoffe Umweltschäden

in Abwässern verursachen und somit entfernt werden müssen, besteht ein großes Interesse an einem effektiven und zielgerichtetem Abbau [43]. Die Fähigkeit, diese Farbstoffe als bisher einziges Enzym abzubauen, gab dabei den DyPs ihren Namen [38].

Typische DyPs haben eine Masse zwischen 50-60 kDa, wobei verschiedenste Oligomerformen beobachtet wurden, die von Monomeren bis zu Hexameren reichen [40]. Dabei zeigte sich hier ein Unterschied zwischen den eher als Monomeren vorkommenden basidiomycotischen DyPs und den häufiger als Oligomer vorkommenden bakteriellen DyPs [44]. Während DyPs bereits auf Basis der Primärsequenz nur wenig Ähnlichkeit zu den anderen Klassen der Peroxidasen besitzen, zeigt sich dies noch einmal deutlich in der Tertiärstruktur. Obwohl die Subklassen der DyPs nur wenig Sequenzidentität aufweisen, ist die Struktur erstaunlich konserviert und besteht in der Regel aus zwei Domänen, die wiederum aus  $\alpha$ -Helices und antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut sind [40]. Dies steht im Gegensatz zu den pflanzlichen und tierischen Peroxidasen, die in der Regel nur aus  $\alpha$ -Helices bestehen [45]. Die Struktur ist dabei von zwei Ferredoxin-ähnlichen Elementen geprägt, welche aus jeweils vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen (vgl. Abbildung 1.1). Oberhalb dieser beiden Strukturen liegt dabei ein Häm-Molekül eingebettet, welches als Co-Faktor an der Reaktion beteiligt ist [44].

In diesem Aufbau zeigen sich die Unterschiede in der Wirkungsweise des katalytischen Zentrums. DyPs fehlt die typische Häm-Bindedomäne der pflanzlichen Peroxidasen, grenzen sich jedoch auch durch die kovalente Bindung der Hämgruppe von den tierischen Peroxidasen ab [46]. So besitzen alle bekannten DyPs das konservierte Motiv „GXXDG“, welches Teil der Häm-Bindedomäne ist. Die Bedeutung dieses Motives zeigte sich dabei in der Tatsache, dass durch den Austausch des Aspartates mit Alanin

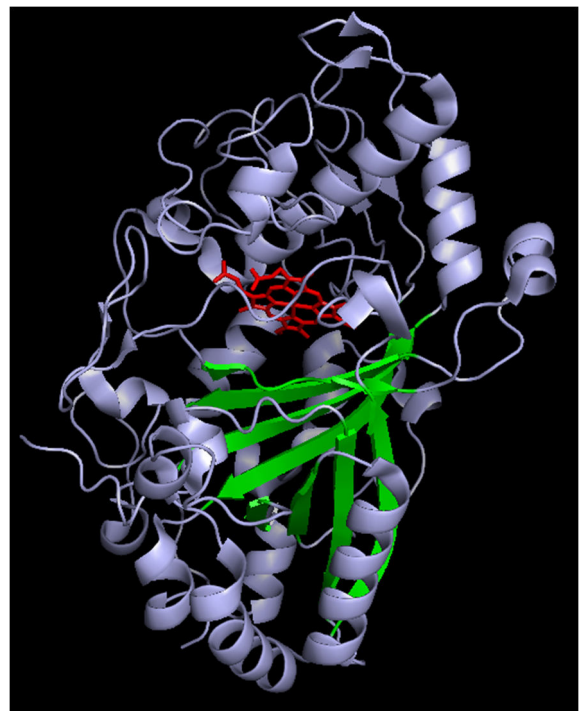


Abbildung 1.1: 3D-Struktur der Dyp aus *Bjerkandera adusta*. Grün: Ferredoxin-ähnliche Strukturen. Rot: Häm-Molekül. Nach Yosihade *et al*, 2011

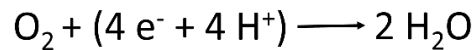
oder Asparagin zwar die Häm-Bindung erhalten bleibt, die katalytische Aktivität jedoch verloren geht [47], wobei auch hierfür bereits Ausnahmen gefunden wurden [48]. Die Funktion des Aspartates liegt dabei in der Flexibilität, die zuerst eine Bindung des Cofaktors  $H_2O_2$  mit der Häm-Gruppe erlaubt, und nach dieser Bindung zurückschwingt, um ein Wasserstoff aufzunehmen [49].

Eine Besonderheit der DyPs ist die Eigenschaft, auch Substrate zu oxidieren, die zu groß für die aktive Tasche sind und nicht direkt mit dem Häm interagieren können. Dies wird durch das Enzym erreicht, indem es mittels eines LRET-Systems (*long-range electron transfer*, Langdistanz Elektronen Transfer) die Entfernung zwischen Häm und Substrat überbrückt [50]. Dabei wird die Ladung beispielsweise bei der AajDyP wahrscheinlich von einem dem Häm zugänglichen Histidin über ein Isoleucin, zwei Arginine und einem Prolin auf ein außenliegendes Tryptophan übertragen, welches die Ladung in einer Tasche auf die Substrate überträgt. Die Aminosäuren Tryptophan, Prolin sowie Arginin sind dabei bei basidiomycotischen DyPs hochgradig konserviert (90-100 %, n=65) [44].

Diese Fähigkeit, dass das zu modifizierende Substrat dabei nicht in das aktive Zentrum passen muss, um mit dem Enzym zu reagieren, könnte einer der Gründe für das breite Substratspektrum der DyPs sein. Neben dem Abbau der bereits erwähnten artifiziellen Farbstoffe konnten dabei auch noch andere Substrate identifiziert werden. Während viele DyPs verschiedene Azo- sowie Triethylamine-Farbstoffe abbauen können [43,51], ist auch der Abbau von beispielweise Lignin [52], die Oxidation von Mangankationen [53] oder auch eine Verwendung für eine enzymatisch basierte Bleichung von Eukalyptuszellstoff [54] für DyPs beschrieben. Zusätzlich hierzu wurde eine DyP beschrieben, die den Pflanzen- bzw. Lebensmittelfarbstoff  $\beta$ -Carotin abbaut [55] und in großem Maßstab in der Industrie für die Bleichung von Annatto haltiger Molke Anwendung findet [56]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Verwendung von DyPs zur Bleichung von Textilien in Waschprozessen möglich ist [33], wobei die Forschung in diesem Bereich jedoch noch am Anfang steht und nur unzureichend betrieben wird.

### 1.3.3. Laccasen

Laccasen [EC 1.10.3.2], als Teil der blauen Multikupferoxidasen (MCO), gehören neben den bereits erwähnten Peroxidasen ebenfalls zu den Oxidoreduktasen und werden systematisch auch als Dihydroxybenzol:Sauerstoff Oxidoreduktasen bezeichnet. Laccasen folgen dabei prinzipiell folgendem Reaktionsschema [57]:



Die direkte Reduktion von Sauerstoff, ohne dass dabei Zwischenprodukte wie beispielsweise Peroxide entstehen, ist dabei ein wichtiges Merkmal dieser Enzymklasse. So können von den über 200 bekannten Varianten der Oxidasen nur sechs Klassen diese Art der Reaktion katalysieren [58]. Erstmals beschrieben wurden Laccasen bereits vor über 100 Jahren im Saft des Lackbaumes (*Rhus vernicifera*) [59]. Seit dieser Zeit wurden sie zusätzlich in Bakterien, Insekten, Ascomyceten und vor allem in Basidiomyceten identifiziert. Die Funktion, die diese Enzyme dabei ausüben, ist stark vom jeweiligen Wirt abhängig. In Bakterien finden Laccasen beispielsweise in der Morphogenese, der Synthese von UV-Licht absorbierenden Komponenten [60] aber auch in der Kupferhomöostase Verwendung [61]. Bei Insektenzellen lässt sich eine Beteiligung bei der Sklerotisierung, einer Polymerisationsreaktion aminoreicher Strukturproteine, nachweisen [62]. Eine ähnliche Aufgabe haben Laccasen auch in krautigen Pflanzen, wo sie bei der Ligninbiosynthese beteiligt sind [63]. Das genaue Gegenteil ist bei den Weißfäulepilzen der Fall, die Laccasen für den Ligninabbau nutzen [64]. Laccasen wurden dabei zusammen mit anderen Multikupferoxidasen zuerst in insgesamt acht Superfamilien eingeteilt [65], wobei diese Klassifizierung später auf insgesamt 16 Superfamilien ergänzt wurde [66]. Dabei werden die Laccasen in Basidiomyceten-, Ascomyceten-, Insekten- und Pflanzenlaccasen unterteilt. Zusätzlich muss noch die Familie der bakteriellen CopA Proteine erwähnt werden, in der 83 % der Mitglieder laut Genbank als Laccasen klassifiziert sind. Die restlichen Familien, die ebenfalls noch Laccasen bzw. Laccase-ähnliche Strukturen in kleiner Anzahl enthalten, bestehen aus anderen Vertretern der MCO [66]. Die Diskriminierung der Laccasen von den restlichen Multikupferoxidasen erfolgte dabei mit Hilfe von hoch konservierten Signatursequenzen, die die kupferbindenden Aminosäuren enthalten [67].

Der Großteil der Laccasen sind monomere, extrazelluläre Proteine mit einer Molmasse zwischen 60-70 kDa. Sie sind in der Regel glykosyliert, wobei dies zwischen 10 und 25 %, seltener bis zu 45%, der Masse ausmacht [58]. Der hohe Grad an Glykosylierungen ist dabei wahrscheinlich verantwortlich für die Stabilität des Enzyms, als auch für den Schutz vor freien Radikalen [68].

Der Aufbau von Laccasen ist hoch konserviert. Sie bestehen meistens aus etwa 500 Aminosäuren, welche für drei aufeinander folgende Cupredoxin-ähnliche Domänen kodieren [69]. Diese bestehen aus zwei  $\beta$ -Faltblättern, die aus insgesamt sieben Strängen bestehen und in der Kupferbindung eine Rolle spielen [61]. Die daran beteiligten Aminosäuren sind in Abbildung 1.2 grün dargestellt.

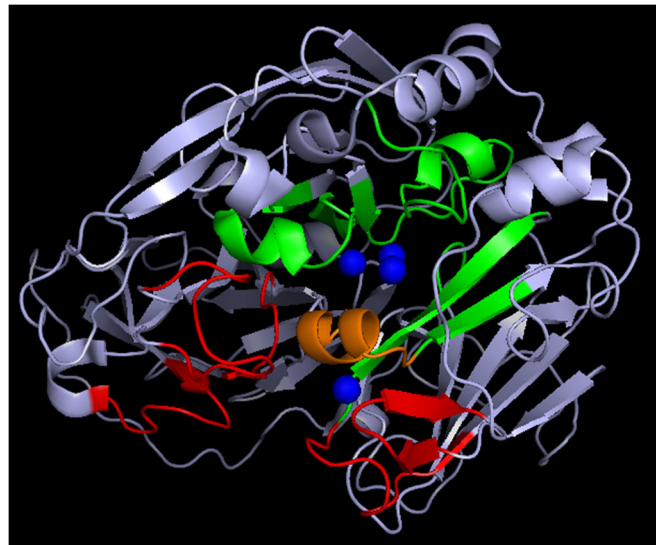


Abbildung 1.2: 3D Modell einer Laccase aus dem Basidiomyceten *Corioloopsis gallica*. Blau= Kupferatome, Grün= Kupferbindedomäne, Rot= Substratbindedomäne, Orange= Sequenz die sowohl an der Kupfer- als auch Substratbindung beteiligt ist. Nach La Mora *et al.*, 2012

Laccasen besitzen als Co-Faktor insgesamt vier Kupferatome, die verschiedene Aufgaben besitzen. Das Typ 1 (T1) Kupfer gibt der Gruppe der blauen MCO dabei durch sein charakteristisches Absorptionsspektrum ihren Namen [70]. Neben einem Typ 2 Kupfer existieren noch jeweils zwei Typ 3 Kupfer in Laccasen, wobei die drei Kupfer des Typs 2 und 3 einen trinuklearen Kupferkomplex (TNC) bilden. Während das Enzym am T1 Kupfer von verschiedensten Donoren Elektronen aufnehmen kann, werden diese Elektronen über eine His-Cys-His Brücke an den TNC weitergeben, wo sie in einer dreistufigen Reaktion auf Sauerstoff übertragen werden [69]. Der konservierte Bereich der Substratbindetasche ist dabei in Abbildung 1.2 rot dargestellt [71].

Die Reaktion des T1-Kupfers mit dem Substrat ist der limitierende Schritt der Reaktion, welcher sich durch die Übertragungsgeschwindigkeit der Elektronen beschreiben lässt. Diese ist abhängig von der Differenz der Spannung zwischen dem Kupferatom und dem Substrat, sodass Laccasen nach ihrem Redoxpotential klassifiziert werden können [72]. Hierbei wird zwischen Niedrig-, Mittel- und Hochredoxpotentiallaccasen unterschieden. Während die pflanzlichen und bakteriellen Laccasen zu den Niedrigredoxpotentiallaccasen gehören, stellen die pilzlichen Laccase die restlichen beiden Gruppen dar [73]. Durch das hohe Redoxpotential erzeugen diese Gruppen auch das größte Interesse für anwendungsbezogene Forschung, da ein hohes Redoxpotential die Reaktion mit einer großen Anzahl an Substraten ermöglicht [74].



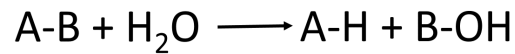
Typische Substrate von Laccasen sind dabei Phenole, Aromaten sowie aliphatische Amine, denen durch das T1 Kupfer Elektronen entzogen werden, wodurch sie in ihre Radikalform überführt werden [75]. Weiterhin können Substrate, die entweder zu groß für das aktive Zentrum des Enzyms sind, oder aufgrund ihres hohen Redoxpotentials nicht direkt oxidiert werden können, mit Hilfe von Mediatoren oxidiert werden. Dabei oxidiert die Laccase zuerst den Mediator, der anschließend das Substrat oxidiert [76].

Die breite Substratspezifität und die Möglichkeit Laccasen sowohl für Polymerisationsreaktionen als auch für den Abbau von Substraten nutzen zu können, ermöglicht dabei verschiedenste Anwendungen. Werden die Anzahl der publizierten Artikel zu Grunde gelegt, besteht das größte Interesse an Bioremediation, gefolgt von Biokraftstoffen, der Textilindustrie, der Papierindustrie sowie der Lebensmittelindustrie [73]. Beispiele hierfür sind im Bereich der Lebensmittelverarbeitung die Wein- und Bierstabilisierung, die Fruchtsaftklärung, die Gelierung von Zuckerrübenpektin, wie auch allgemein die Verbesserung von sensorischen Parametern [77]. In der Papierverarbeitung können Laccasen für den Abbau von Lignin genutzt werden, während dies auch das Ziel bei der Biokraftstoffgewinnung ist [73]. Der Einsatz von Laccasen in der Textilindustrie ist fokussiert auf den Abbau von Farbstoffen, die sich in Abwässern nach der Färbung der Textilien befinden und abgebaut werden müssen [78]. Ebenfalls werden die Laccasen in der Bleichung von Textilien genutzt, wie beispielweise Denim-Jeans [79], aber auch zur Unterstützung der konventionellen Peroxid Bleichung von Fasern [80].

Durch die Aktivität von Laccase mit sperrigen Substraten wie Textilfasern, liegt eine mögliche Verwendung in der Waschmittelindustrie nahe. Frühere Experimente zeigten, dass Laccasen Anthocyane abbauen können, indem sie die aromatische Ringstruktur des Anthocyanidin oxidieren. Anthocyane sind in diesem Bereich von großem Interesse, da sie Verschmutzungen durch beispielweise Wein oder Fruchtflecken darstellen und bislang nur schwer abbaubar sind [81].

#### 1.3.4. $\beta$ -Glukosidasen

$\beta$ -Glukosidasen [E.C.3.2.1.21] gehören zur Gruppe der Hydrolasen und katalysieren die Abspaltung von nichtreduzierenden, endständigen Glukosylresten, Glykosiden oder auch Oligosacchariden [82]. Die allgemeine Reaktionsgleichung lautet.



Glukosidasen kommen dabei universal in allen Domänen des Lebens vor, wo sie verschiedenste Rollen und Funktionen besitzen. Beispiele hierfür sind die Biomassekonversion in Bakterien, Abbau von Glycolipiden sowie exogener Glukoside in Tieren, Katabolismus von Zellwandoligosacchariden in Pflanzen, Abwehrreaktionen gegen Fressfeinde, aber auch die Phytohormonaktivierung [82,83]. Die vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten dieser Enzymklasse in der Zelle lassen sich dabei durch die große Vielfalt an Stoffen mit nichtreduzierenden, endständigen Glykosylresten erklären [84]. Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet von Glukosidasen ist dabei auch der Celluloseabbau. So katalysieren Glukosidasen den essentiellen letzten Schritt des Cellulase-Systems, wodurch Glucose freigesetzt wird [85]. Da Cellulose das meistvorkommende Polysaccharid auf der Erde ist und überwiegend von Basidiomyceten abgebaut wird, ist bei diesen Organismen eine große Divergenz an  $\beta$ -Glukosidasen vorhanden [86].

$\beta$ -Glukosidasen besitzen häufig Nebenaktivitäten für ähnliche Substrate wie  $\beta$ -D-Fucoside (E.C. 3.2.1.38),  $\beta$ -D-Galactoside (E.C. 3.2.1.23) oder auch  $\beta$ -D-Mannoside (E.C. 3.2.1.25), sodass die Aussagekraft der E.C. Nummern über das vollständige Substratspektrum limitiert ist. Aus diesem Grund werden Glycosidhydrolasen im allgemeinen nach einem System auf Basis der Aminosäuresequenz klassifiziert [87,88]. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren 145 verschiedene Familien in der häufig aktualisierten, für Glycosidhydrolasen spezifischen Datenbank CAZY (Carbohydrate Active enZYme) [89]. Von diesen 145 Familien enthalten acht Familien Enzyme mit einer  $\beta$ -Glukosidase Aktivität, wobei die beiden größten Gruppen die GH1, sowie die GH3 mit jeweils etwa 15.000 bekannten Vertretern sind.

Der Aufbau der Glukosidasen ist je nach Familie unterschiedlich, wobei dieser jedoch innerhalb der Familie konserviert ist [82]. Hierbei zeigt sich erneut der Zusammenhang zwischen dem Vorkommen bzw. der Funktion des Enzyms und der Struktur. So sind  $\beta$ -Glukosidasen von 35-640 kDa bekannt, wobei die kleineren, etwa 100 kDa großen Varianten in der Regel monomerisch sind und extrazellulär vorliegen [86], während die größeren Varianten wie beispielsweise die 450 kDa große zellwandassoziierte  $\beta$ -Glukosidase aus *Termitomyces clypeatus* aus 110 kDa großen Monomeren aufgebaut ist [90].

Die Vertreter der Gruppe GH1 wurden dabei überwiegend aus Archaeen, Pflanzen und Säugetieren isoliert, während die Gruppe GH3 Vertreter aus Bakterien, Pilzen und Hefen enthält [91]. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich dabei bereits in der Primärstruktur deutlich. Glukosidasen der Gruppe GH1 besitzen eine  $(\alpha/\beta)_6$ -Fasstruktur, welche das aktive Zentrum enthält [92]. Im Gegensatz hierzu besitzen die GH3 Glukosidasen in der Regel eine mit einer  $(\alpha/\beta)_8$ - und einer  $(\alpha/\beta)_6$ -Domäne insgesamt zwei Domänen, zwischen denen das aktive Zentrum liegt [93]. Zusätzlich zu diesem klassischen Aufbau sind auch GH3 Glukosidasen mit drei Domänen bekannt, die zusätzlich eine Fibronectin Type II ähnliche Domäne am Ende des Proteins enthalten, wobei die Funktion dieser Domäne noch nicht bekannt ist [94,95].

Abbildung 1.3 zeigt eine  $\beta$ -Glukosidase aus der GH3 Familie, die dem klassischen Aufbau folgt. Die charakteristische  $(\alpha/\beta)_8$ -Domäne ist rot eingefärbt, während die  $(\alpha/\beta)_6$ -Domäne grün dargestellt ist. Zur Visualisierung des aktiven Zentrums befindet sich in diesem ein gelb gefärbtes Glucosemolekül, während die für die eigentliche enzymatische Reaktion notwendigen Aminosäuren blau dargestellt sind.

Die Reaktion läuft dabei in der Regel in zwei Schritten ab: Die Glykosylierung und anschließende Deglykosylierung. Zuerst greift ein nucleophiles Glutamat das anomere Kohlenstoffatom an, wodurch ein Enzym-Glucose Intermediat entsteht. Dieses Glutamat ist dabei bei allen Glukosidasen konserviert [96].

Anschließend greift ein Wassermolekül, welches zuerst durch eine als Säure/Base Katalysator funktionierende Asparaginsäure im Falle von

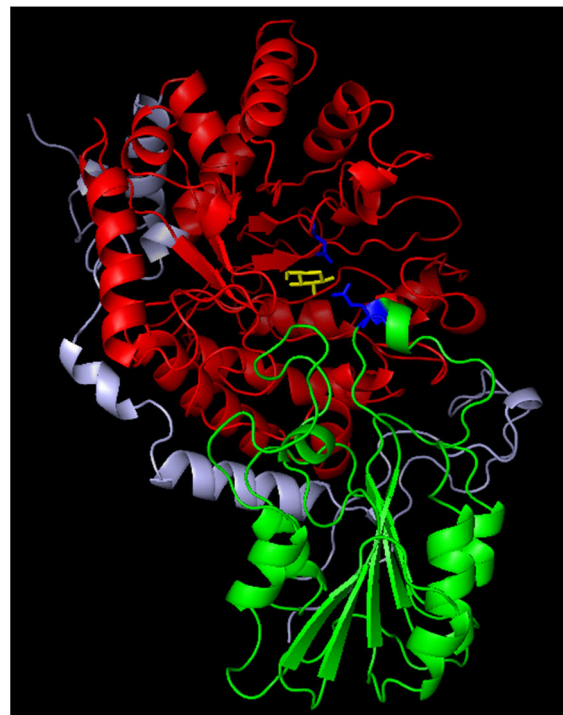


Abbildung 1.3: 3D Modell einer GH3-Glucosidase aus der Gerste (*Hordeum vulgare*). Rot:  $(\alpha/\beta)_8$ -Domäne, Grün:  $(\alpha/\beta)_6$ -Domäne, Blau: Aminosäuren, des aktiven Zentrums, Gelb: Glucose. Darstellung nach Varghese, Hrmova & Fincher, 1999

GH3 [93,97] bzw. eines Glutamats in Falle von GH1 [91], aktiviert wurde, die glycosidische Bindung an. Dadurch wird diese aufgespalten, wodurch Glucose frei gesetzt und das Enzym wieder regeneriert wird [98].

Die Substratspezifität der Enzyme ist von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen spielt die Ausformung des katalytischen Zentrums bzw. der Substratbindetasche eine Rolle. Diese ist so geformt, dass die Tiefe und Breite der Länge der Ausgangsgruppe entspricht [99]. Da die für die Zuckerbindung verantwortlichen vier Aminosäuren konserviert sind und mit diesen

verschiedene Zuckerreste gebunden werden können [100], müssen andere Faktoren die Substratspezifität bedingen. Vier weitere Aminosäuren wurden in einer Glukosidase aus Mais identifiziert, die verantwortlich für die Bindung der Aglycone sind [92]. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Position dieser Aglyconbindestellen variabler ist, und andere Aminosäuren ebenfalls an der direkten Bindung beteiligt sein können [84]. Des Weiteren können angrenzende Aminosäuren eine Rolle spielen. So entscheidet die Präsenz eines Tryptophans in einer Glukosidase aus *Zea mays*, ob das Enzym das cyanogene Glycosid Dhurrin umsetzen kann. Dabei ist das Tryptophan nicht direkt an der Substratbindung beteiligt, sondern bildet lediglich eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer an der Substratbindung beteiligten Aminosäure aus [101].

Durch die breite Substratspezifität von diversen Glukosidasen und der Fähigkeit, sowohl für den Abbau als auch für die Synthese genutzt werden zu können, besitzen diese Enzyme ein großes Potential für die industrielle Anwendung [83]. Neben ihrer Verwendung in der Ethanol bzw. Biokraftstoffherzeugung [102], können sie auch für die Freisetzung von aromatischen Komponenten in Fruchtsäften [103] oder fermentierten Produkten genutzt werden [104]. Weiterhin sind Glukosidasen die Schlüsselenzyme zur Freisetzung von diversen Aromen aus glycosidierten Vorstufen in Pflanzen, sodass durch den Einsatz dieser Enzyme die Qualität von daraus produzierten Lebensmitteln verbessert werden kann [105]. Ebenfalls interessant ist die Verwendung von Glukosidasen in der Waschmittelindustrie, da sie wie die bereits erwähnten Laccase Anthocyane abbauen können [106]. Der Abbau dieser Farbstoffe ist dabei relevant, da sie in vielfältigen Lebensmitteln wie Beeren, Kirschen oder auch Pflaumen vorkommen [107]. Die Wirkung beruht dabei auf dem Abspalten des Zuckerrestes vom Aglycon, wodurch dieses entweder spontan zerfällt, oder von anderen Enzymen leichter abgebaut werden kann [108].

#### 1.4. Heterologe Expressionssysteme

Die Proteinproduktion mittels heterologer Genexpression ist eines der wichtigsten Werkzeuge der modernen Biochemie. Während früher häufig mehrere Kilogramm tierischer oder pflanzlicher Gewebe aufgeschlossen werden mussten, um nur geringe Mengen an Protein zu isolieren, ist dies durch den Einsatz dieser Technik nicht mehr notwendig [109]. Dabei erlaubt die heterologe Expression die Produktion von großen Mengen aktiven Enzyms mittels einfacher Kulturmedien zu günstigen Preisen, die den Einsatz von Enzymen in industriellen Anwendungen erlauben [110].

Im Unterschied zur homologen Proteinproduktion, bei der ein Gen in dem Organismus exprimiert wird, aus dem es stammt, wird bei der heterologen Proteinproduktion das Gen in einem anderen Wirt zur Expression gebracht. Die Vorteile dieser Expressionsmethode sind dabei vielfältig. Die Genome sowie Sekretome der Wirtsorganismen sind bekannt, sodass in der Regel eine Vielzahl an molekularbiologischen Methoden vorhanden sind, die ein einfaches und zielgerichtetes Arbeiten möglich machen. Zusätzlich hierzu sind die Generationszeiten in der Regel kürzer, die Proteinausbeuten höher und die Handhabung der Organismen einfacher [111]. Auch die Möglichkeit sich einer Vielzahl verschiedener Tags zu bedienen, die an das Enzym fusioniert werden und die Proteinreinigung deutlich vereinfachen, ist nur mittels der heterologen Proteinexpression möglich [112].

Für die Expression stehen dabei mittlerweile verschiedenste Expressionssysteme zur Auswahl. Das wohl bekannteste und älteste ist dabei das Bakterium *Escherichia coli*, welches bereits 1982 zur Produktion des ersten rekombinanten humanen Insulins als Therapeutikum genutzt wurde [111]. Zusätzlich stehen beispielweise als bakterielle Expressionssysteme noch verschiedene *Bacillus*-Stämme, das Gram-negative Bakterium *Caulobacter crescentus*, oder auch verschiedene *Streptomyces*-Stämme zur Verfügung [113]. Da sich diese Systeme jedoch nicht für jedes Protein eignen, gerade wenn dieses komplexe posttranslationale Modifikationen benötigt oder sehr groß ist, wurden ebenfalls eine Vielzahl an eukaryotischen Systemen wie Hefen, filamentöse Pilze, aber auch Zellkultursysteme wie Insektenzellen oder auch Säugerzellen etabliert [114]. Zusätzlich zu diesen klassischen Methoden der heterologen Expression wurden auch zellfreie Systeme auf Basis von lysierten *E. coli* Kulturen [115] oder Weizenkeimen entwickelt [116].

Einer der wichtigsten Punkte, der einer Entscheidung für oder gegen ein System zu Grunde liegt, ist dabei die Frage nach der Notwendigkeit von posttranslationalen Modifikationen [109]. Während der genetische Code in der überwältigen Mehrheit der Organismen konserviert ist, ist

dies für die anschließenden Modifikationen des Proteins nicht der Fall. So besitzt beispielsweise *E. coli* hierfür nur eine rudimentäre Maschinerie, sodass viele Enzyme, die Modifikationen zur Faltung oder Aktivierung benötigen, in diesem Wirt nicht oder nur durch großen Aufwand produziert werden können [117]. Die Komplexität der Modifikationen ist dabei häufig abhängig von der Komplexität des Ursprungsorganismus.

Bei der industriellen Produktion werden hauptsächlich *Bacillus* Spezies genutzt [118]. Die Fokussierung der Industrie auf prokaryotische Wirte liegt dabei neben den geringen Kosten sicherlich auch in der Tatsache, dass über 50 % aller industriell produzierten Enzyme mikrobiologischen Ursprungs sind. Diese können dementsprechend einfach in nahen verwandten Wirten produziert werden, da sie nur wenig bis gar keine Modifikationen benötigen [119].

In der akademischen Forschung dominiert dagegen weiterhin klar *E. coli* als Wirt der Wahl. So wurden etwa 88,6 % aller heterolog produzierten Enzyme laut der Protein Data Bank (PDB) mittels *E. coli* hergestellt, während die Expression durch komplexe Zellkulturen wie Insektenzellen (4,65 %) oder auch Säugerzellen (2,54 %) deutlich seltener genutzt werden. Mit gerade einmal 2,2 % aller produzierten Proteine machen Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder auch *Komagatelli pfaffii* zwar nur einen kleinen Bruchteil aus [120], sind aber durch die Kombination aus der Möglichkeit der posttranslationalen Modifikationen und günstiger Kultivierung ebenfalls für die Forschung interessant [121].

Nachfolgend sollen die Systeme *E. coli* als Vertreter der Prokaryoten sowie *K. pfaffii* als Vertreter der Eukaryoten näher vorgestellt werden, da beide in der vorliegenden Arbeit Verwendung fanden.

#### 1.4.1. *Escherichia coli*

Bereits im Jahre 1884 im Darm des Menschen entdeckt und zuerst als *Bacterium coli commune* benannt [122], entwickelte sich das heute als *Escherichia coli* bekannte Bakterium zu dem am besten erforschten Organismus der Welt. *E. coli* ist ein 1  $\mu\text{m}$  langes und 0,35  $\mu\text{m}$  breites Gram-negatives fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium. Abhängig vom betrachteten Stamm unterscheidet sich die Morphologie deutlich. So kann es wie in Abbildung 1.4 gezeigt Flagellen zur Bewegung oder Haar-ähnliche Pili zur Interaktion mit seiner Umwelt aufweisen, während dies bei anderen Stämmen nicht der Fall sein muss [123].

Während *E. coli* gewöhnlich symbiotisch mit seinem Wirt zusammenlebt [124], gibt es auch eine Vielzahl pathogener Stämme [125]. Diese Variabilität des Phänotyps ist dabei durch eine hohe Plastizität des Genotyps begründet. So zeigte sich, dass nur etwa 20 % des Genoms der untersuchten *E. coli* Stämme übereinstimmte, während die restlichen 80 % variabel waren [126].

Mit Hilfe dieses Bakteriums wurden elementare biologische Erkenntnisse über den genetischen Code, Transkription, Translation sowie die Replikation der DNA erforscht. Die dabei gewonnen Erkenntnisse und die

entwickelten molekularbiologischen Techniken erlauben heute die Verwendung von *E. coli* in der akademischen sowie industriellen Gentechnik, der experimentellen Evolution oder auch der Produktion von Pharmazeutika [123]. So sind gegenwärtig mehr als 150 therapeutische Proteine auf dem Markt, von denen etwa ein Drittel mittels *E. coli* synthetisiert wird [127]. Für eine Produktion in *E. coli* spricht die einfache Handhabung, geringe Kosten für Medien, eine reichhaltige Auswahl an verschiedenen Expressionsstrategien, sowie einfache *Upstream*-Prozesse [128]. Ebenfalls wichtig sind die extrem schnelle Wachstumsrate, sowie die große Biomasse, die durch spezielle Hochzelldichtekultivierungen erhalten werden kann [109]. Neben diesen vielen Vorteilen besitzt *E. coli* als Expressionswirt ebenfalls auch einige Nachteile. Die Translation ist eng mit der Transkription verknüpft, was gerade bei eukaryotischen Proteinen, die häufig eine langsamere Faltung unter Zuhilfenahme von Chaperonen benötigen, zur Ausbildung von großen Mengen an teil- oder auch ungefaltetem Protein führt [114]. Ein

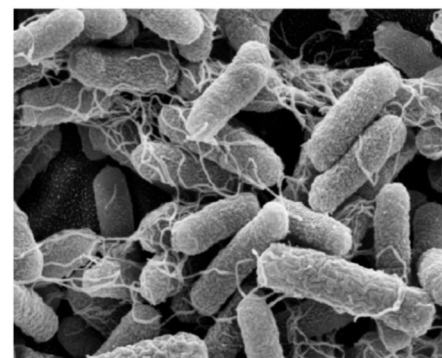
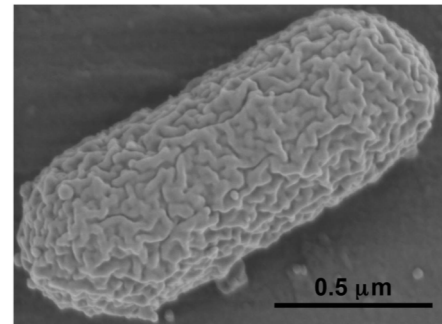


Abbildung 1.4: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *E. coli*. Oben: Laborstamm REL606. Unten: Pathogener Stamm O119:HND. Verändert nach Blount, 2015 sowie Nascimento *et al.*, 2014

weiteres Hindernis bei der Expression von eukaryotischen Proteinen in *E. coli* sind die posttranslationalen Modifizierungen wie zum Beispiel Glykosylierungen. Da in prokaryotischen Zellen in der Regel keine Maschinerie hierfür vorhanden ist, um diese Modifikationen vorzunehmen, ist eine Produktion in *E. coli* schwierig [129]. Ein weiterer Aspekt ist die reduzierende Umgebung innerhalb des Cytoplasmas, die eine effektive Ausbildung von Disulfidbrücken erschwert, wodurch die Faltung ebenfalls Fehler aufweisen kann [130].

Im Laufe der Zeit wurde versucht, diese Nachteile durch optimale Kulturbedingungen oder durch genetische Modifizierungen der Zellen auszugleichen. So zeigte sich, dass eine Absenkung der Kulturtemperatur zu einer deutlichen Erhöhung der Löslichkeit und Verbesserung der Faltung der produzierten Proteine führt [131]. Dieser Effekt kann bei der Nutzung von speziellen Promotoren, die gerade bei niedrigen Temperaturen aktiv sind, noch einmal deutlich verbessert werden [132]. Das Problem der fehlenden Disulfidbrücken kann dadurch umgangen werden, dass die Proteine mittels spezieller Signalsequenzen in den periplasmatischen Raum exportiert werden, wo sie mittels co-exprimierter Chaperone sowie Proteindisulfidisomerasen prozessiert werden [133]. Die fehlenden Glykosylierungen können teilweise vernachlässigt werden, wenn Proteine, wie beispielweise das menschliche Interleukin-2, ihre Wirkung bei einem Fehlen der natürlicherweise vorkommenden Zuckerreste nicht verlieren [130]. In anderen Fällen konnte durch das Einbringen verschiedener Glycosyltransferasen aus Eukaryoten sowie einer Oligosaccharyltransferase aus dem Bakterium *Campylobacter jejuni* in *E. coli* eine einfache Glykosylierung erreicht werden [134].

Durch all diese Fortschritte konnte die Anzahl und Breite der in *E. coli* produzierbaren Proteine erhöht werden, jedoch sind weiterhin alternative Wirte nötig, sobald das Zielprotein in der Länge prozessiert werden muss oder auch Modifizierungen wie komplexe Glykosylierungen nötig sind.



#### 1.4.2. *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris*, später neu klassifiziert als *Komagatella pfaffii*, ist ein Vertreter der methylotrophen Hefen, die erstmals 1969 aus natürlichen Quellen isoliert und beschrieben wurden [135].

Die Fähigkeit als einzige Kohlenstoffquelle Methanol zu nutzen, machte sie interessant für die Herstellung von Einzelzellprotein durch die Firma Phillips Petroleum Company, die Medien und Methoden für die Hochzelldichtekultivierung entwickelte [136]. Bereits in den frühen 80er Jahren wurde die Firma Salk

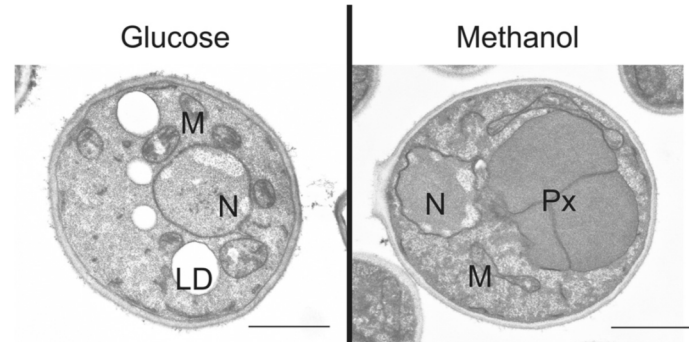


Abbildung 1.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *P. pastoris* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. N: Nucleus, M: Mitochondria, LD: Lipid droplet, Px: Peroxisome. Legende: 1  $\mu$ m. Nach Rußmayer *et al.*, 2015

Institute Biotechnology/ Industrial Associates, Inc beauftragt, aus *P. pastoris* ein Expressionssystem zu entwickeln, was beispielweise durch die Entdeckung von Transformationsmethoden [137] und starken Promotoren wie dem  $P_{AOX1}$  gelang [138]. Dabei kann die Alkoholoxidase, die im Peroxisom lokalisiert, wie in Abbildung 1.5 zu sehen, als Produkt des isolierten Promotors bis zu 35 % des Gesamtproteins der Zelle ausmachen [139]. Im Jahre 1991 wurden die Patente am Expressionssystem an RCT verkauft, gleichzeitig aber das System auch an Invitrogen lizenziert, was den Grundstein für die weitere akademische Forschung legte [140].

Die große Akzeptanz, die dieses System erlangt hat, wird auch daran deutlich, dass bisher über 5.000 verschiedene Proteine heterolog produziert wurden [141]. Gründe hierfür sind dabei die vielfältigen Vorteile von *P. pastoris* als Expressionssystem. So können die Zellen in einfachen Prozessen bereits in kurzer Zeit sehr hohe Zelldichten erreichen. Auf genetischer Ebene spricht für dieses System eine einfache genetische Manipulierbarkeit sowie das Vorhandensein von extrem starken Promotoren, die sich gut regulieren lassen [142]. Neben dem am häufigsten verwendeten und mittels Methanol induzierbaren Promoter  $P_{AOX1}$  existieren weitere induzierbare sowie konstitutive Promotoren, wobei letztere gerade für Prozesse, in denen Methanol ein Problem darstellt, interessant sind [143]. Der wichtigste Aspekt ist dabei jedoch die Fähigkeit, posttranslationale Modifikationen durchzuführen und die modifizierten Proteine anschließend in das Medium zu sekretieren [121]. Da *P. pastoris* nur in geringem Maße eigene Proteine ins Medium sekretiert, können die heterolog produzierten Proteine bis zu 80 % aller Proteine im Medium ausmachen, was den späteren *Downstream*-Prozess vereinfacht [136].

Insgesamt können über 20 g/L Proteinausbeute im technischen Prozess erreicht werden [140]. Während dies im Vergleich mit anderen eukaryotischen Systemen ein hervorragender Wert ist, wird weiterhin versucht die Ausbeute zu erhöhen, wofür bereits mehrere Strategien erprobt wurden. Ein Beispiel hierfür ist die Co-Expression des Transkriptionsfaktors Hac1, welcher bei der Regulierung der Faltungsmaschinerie beteiligt ist. Wird nun Hac1 zusätzlich zum gewünschten Protein überexprimiert, so kann dies zu einer Verdopplung der Proteinausbeute führen [144]. Auch die genutzten Signalsequenzen sind Ziel von Optimierungen. So konnte beispielsweise mittels zielgerichteter Evolution der in *S. cerevisiae* aber auch *P. pastoris* genutzten  $\alpha$ -Faktor Signalsequenz eine 16-fache Steigerung der Proteinsekretion in *S. cerevisiae* erreicht werden [145]. Eine Deletion von Teilen dieser Sequenz führte in *P. pastoris* zu einer deutlichen Effizienzsteigerung [146]. Ebenfalls möglich ist es, ungerichtete Mutationen im Genom zu erzeugen, um anschließend besonders produktive Stämme zu identifizieren [147].

Neben Bestrebungen der reinen Effizienzsteigerung waren noch andere Elemente Ziel von Optimierungen. Die von *P. pastoris* durchgeführten Glykolysierungen, die in der Regel 9-16 Mannosereste umfassen, unterscheiden sich signifikant von Säugerzelllinien [148]. Zur Lösung dieses Problems wurde erst versucht, durch entsprechende Deletionen die Hypermannosierung zu verhindern, jedoch zeigten diese Zellen ein vermindertes Wachstum, da die Glykosylierungen häufig für eine korrekte Faltung des Zielproteins benötigt werden [149]. Als Alternative hierzu wurde ein Stamm entwickelt, der zuerst entsprechende Glykolysierungen durchführt, diese jedoch kurz vor der Sekretion wieder abspaltet [150]. Für Proteine, die für ihre Aktivität ein vollständig humanes Glykosylierungsmuster benötigen, wurde ebenfalls eine Lösung gefunden. So konnte durch die Deletion von vier Genen und das Einbringen von vierzehn heterologen Genen ein vollständiges humanes Glycolysierungsmuster in *P. pastoris* erreicht werden [151].

Durch diese Faktoren ist *P. pastoris* geeignet, diverse Proteine korrekt gefaltet, posttranslational modifiziert und in großer Menge extrazellulär zu produzieren, was dazu führte, dass dieser Organismus das meist genutzte Hefe-basierte Expressionssystem ist [152].

### 1.5. Ziele der Arbeit

In der heutigen Gesellschaft, die einen immer größeren Fokus auf Umweltschutz durch das Einsparen von Chemikalien sowie Energie legt, besteht eine große Nachfrage an technischen Enzymen. Mittels dieser kann die Waschmittelindustrie, die der größte Abnehmer technischer Enzyme ist, das Verlangen der Verbraucher nach immer sparsameren, aber auch effektiveren Waschmitteln erfüllen.

Da der Genus der Basidiomycota noch wenig beforscht ist und aus diesem Grunde von einem unerschlossenen Potential an Enzyme ausgegangen werden kann, war das erste Ziel dieser Arbeit, mittels Screenings neue Enzyme zu identifizieren, die Potential für spätere Anwendungen, wie beispielsweise das Entfärben von Lebensmittelflecken, aufweisen.

Die dabei identifizierten Enzyme sowie Enzyme aus Vorarbeiten sollten anschließend heterolog exprimiert werden, um zum einen größere Mengen für Applikationstests zu erzeugen. Zum anderen sollten hierfür neuartige Expressionsmethoden an sich, oder auch der Einfluss von Modifikationen am Enzym untersucht werden. Dabei hat die folgende Arbeit drei Themenschwerpunkte:

- Etablierung eines *E. coli* basierten Expressionssystems für die aktive Expression von basidiomycotischen Dye-decolorizing Peroxidasen ohne Zusatz von Additiven wie Hämin.
- Nutzung von *P. pastoris* zur Expression einer Laccase aus *Pleurotus pulmonarius* und anschließende Untersuchung der Funktion von C-terminalen Bereichen dieses Enzyms.
- Expression einer  $\beta$ -Glukosidase aus *Bjerkandera adusta* in *P. pastoris*

Alle isolierten und heterolog exprimierten Enzyme sollten charakterisiert und auf ihr Potential zum Entfärben verschiedener industriell relevanter Substrate getestet werden. Abschließend soll eine Evaluierung der Ergebnisse stattfinden.

## **2. Vorwort zur Publikation „Comparative cold shock expression and characterization of fungal dye decolorizing peroxidases“**

Die Enzymklasse der DyPs besitzt aufgrund ihrer Fähigkeit, Farbstoffe in verschiedensten Matrices wie Zellstoffen, Fasern oder auch Abwässern zu bleichen, ein großes industrielles Potential. Dies ist umso mehr der Fall mit Blick auf den immer wichtiger werdenden Bereich der Bioremediation.

Umso erstaunlicher war es, dass zu Beginn der Forschung nur sieben pilzliche und elf bakterielle DyPs näher charakterisiert und noch weniger heterolog exprimiert waren [44]. Da eine heterologe Expression nur in einem einzigen Fall zu einem aktiven Protein in *E. coli* führte [51], war eines der Ziele der folgenden Arbeit die Etablierung eines allgemeinen Expressionssystems für basidiomycotische DyPs in *E. coli*. Der Expressionswirt *E. coli* wurde neben der Vielzahl seiner Vorteile auch aufgrund der hohen Verbreitung dieses Systems in der Forschung gewählt, sodass die gewonnen Erkenntnisse einer potentiell großen Gruppe zur Verfügung stehen würden (vgl. 1.4.1). Zusätzlich sollten die dabei erhaltenen Proteine auf ihre Fähigkeit der Bleichung von Carotinoiden getestet werden, da diese sowohl in der Käseproduktion als auch in der Waschmittelindustrie große Probleme verursachen und abgebaut werden müssen [56].

Mit dem in der folgenden Publikation gewählten Expressionssystem pCOLD DNA I konnte von allen vier getesteten DyPs aktives Enzym generiert werden, wobei die erhaltene Menge variierte. Zusätzlich konnte dies ohne den Zusatz von Hämin erreicht werden, was besonders aufgrund der Tatsache wichtig ist, dass sich dieses nur schwer vom rekombinanten Protein abtrennen lässt und aufgrund seiner dunklen Eigenfarbe bei Bleichungsprozessen stört [81].

Beim Carotinabbau zeigte keines der Enzyme einen Abbau von  $\beta$ -Carotin, was gerade für die Waschmittelindustrie relevant gewesen wäre, jedoch konnten drei der vier produzierten Enzyme das Carotinoid Bixin abbauen.

Da die vier getesteten Gene bzw. deren Wirtsorganismus aus verschiedenen Ordnungen der Pilze stammen, kann davon ausgegangen werden, dass die folgende Arbeit ein allgemeingültiges Protokoll zur Produktion basidiomycotischer DyPs in *E. coli* darstellt und dem entsprechend einen wichtigen Beitrag zur Erforschung dieser Enzymklasse darstellt.

Anteilig war an dieser Arbeit Frau Dr. Zelena beteiligt, die Teile der Arbeiten bezüglich der MsP1 geleistet hat, sowie Herr Prof. Dr. Berger, der als Arbeitsgruppenleiter für die Projektidee, die Akquise der Drittmittel und die Betreuung im Rahmen der Doktorarbeit verantwortlich war.

### **3. Comparative cold shock expression and characterization of fungal dye decolorizing peroxidases**

Christoph J. Behrens, Kateryna Zelena, Ralf G. Berger

#### **3.1. Abstract**

Dye decolorizing peroxidases (DyPs) from *Auricularia auricula-judae*, *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* and from *Marasmius scorodoni* (Basidiomycota) were expressed in *Escherichia coli* using the cold shock inducible expression system pCOLD I DNA. Functional expression was achieved without the addition of hemin or the co-expression of any chaperones. The presence or absence of the native signal sequence had a strong impact on the success of the expression, but the effect was not consistent for the different DyPs. While BaDyP and AajDyP were stable at 50 °C, the more thermolabile MsP2 and PoDyp, upon catalytic intervention, lend themselves to more rapid thermal inactivation. The bleaching of norbixin (E 160b) using MsP2 was most efficient at pH 4.0, while BaDyP and AajDypP worked best in the weakly acidic to neutral range indicating a choice of DyPs for a broad field of applications in different food matrices.

#### **3.2. Keywords**

Heterologous expression; Dye decolorizing peroxidase (DyP), *Escherichia coli*, Basidomycota

### 3.3. Introduction

Dye-decolorizing peroxidases (DyPs, EC: 1.11.1.19) are a class of heme containing peroxidases named for their peculiar ability to bleach synthetic dyes that were not degradable by other peroxidases. The first DyP was discovered in the fungus *Geotrichum candidum* [38] which was later corrected to *Bjerkandera adusta*. Subsequently, further members were found in fungi and in bacteria [42] forming a new family in the well characterized class of peroxidases. Fungal DyPs were supposed to be a part of the lignin degradation mechanism [52,153], while bacterial DyPs play a role in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protection [154]. The InterPro database [155] suggests that this type of enzyme is more common in bacteria than in eukaryotes. In this protein family database, 5252 hits were found for bacterial DyPs, while there were only 440 hits for eukaryotes. Despite of the large number of known enzymes, only a small number of these DyPs were characterized in their wild type state (seven fungal and eleven bacterial, [44]), and even less were expressed in a heterologous host. The only examples for heterologous expressions in an active and soluble form were described for the DyP of *B. adusta* in *Aspergillus oryzae* [43] and a DyP of *Pleurotus ostreatus* in *Escherichia coli* [51]. Other researchers had to refold the protein to activate the enzyme after expression [156,157]. Because the process of protein refolding can be tedious, it is desirable to express the enzymes in an active and soluble state.

In this work, the cold shock inducible expression system pCOLD I DNA was used, which is based on the promoter of the cold shock protein *cspA* [132]. This system was tested with four different fungi out of three different orders of the Basidiomycota, namely *Auricularia auricula-judae* out of the Auriculariales, *B. adusta* out of Polyporales and *P. ostreatus* as well as *Marasmius scorodoni* as examples for the order of Agaricales. With this choice of donor organisms, it was aspired to establish a more general protocol for the expression of fungal DyPs. The expressed proteins were characterized and tested for their potential use in food colour bleaching, as it is required, for example, to degrade the xanthophyll norbixin in coloured Cheddar cheese whey [158].

### 3.4. Methods

#### 3.4.1. Chemicals and Materials

All chemicals used were obtained from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The enzymes were from Thermo Scientific (Braunschweig, Germany), unless otherwise stated. PCR primers were obtained from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

#### 3.4.2. Strains and culture conditions

The *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used for vector propagation and isolation, and heterologous expression took place in the strain BL21(DE3)Star (Invitrogen). Both strains were cultivated in Luria-Bertani broth (Carl Roth) supplemented with ampicillin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), kanamycin ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) or chloramphenicol ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) as appropriate.

*P. ostreatus* 1020 (DSMZ, Braunschweig, Germany) and *A. auricula-judae* 11326 (DSMZ) strains were cultivated in SNL medium ( $30.0 \text{ g L}^{-1}$  glucose,  $4.5 \text{ g L}^{-1}$  L-asparagine monohydrate,  $3.0 \text{ g L}^{-1}$  yeast extract,  $1.5 \text{ g L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0.5 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ ;  $1.0 \text{ mL L}^{-1}$  trace element solution ( $0.08 \text{ g L}^{-1}$   $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0.09 \text{ g L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0.03 \text{ g L}^{-1}$   $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ,  $0.005 \text{ g L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  EDTA)); the pH was adjusted to 6.0 with 1 M NaOH prior to sterilisation. The pre-cultures were grown for 7 days at  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  and 150 rpm and then diluted 1:10 for the main culture. The expression of the DyPs occurred at  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  and 150 rpm and was induced with 0.4 % (v/v) Tween 80 and  $2 \text{ g L}^{-1}$  lignin (organosolv). Samples were taken from the main cultures at different days of cultivation. Mycelium was harvested by centrifugation. Cell pellets were stored at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for further use.

#### 3.4.3. RNA extraction and cDNA synthesis

For the isolation of RNA from *P. ostreatus* and *A. auricula-judae* 200 mg mycelium were used for each preparation. Total RNA was isolated using the innuSPEED Fungi RNA kit (Analytik Jena, Jena, Germany) according to the manual's instructions. In addition, to avoid DNA contamination,  $1 \mu\text{g}$  RNA each were treated with 1 U DNase I before transcription. Nucleic acid samples were stored at  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  until further use.

The cDNA synthesis was carried out using RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific).  $1 \mu\text{g}$  of total RNA was used for first strand synthesis with oligo-dT primers and the following program:  $42 \text{ }^\circ\text{C}$  60 min;  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  10 min and  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min.

The genes for the *B. adusta* [33] and *M. scorodonius* [156] DyPs were provided by the mentioned authors.

### 3.4.4. Primer Design, PCR and Cloning

The genes of interest were amplified using specific primers (Tab. 3.1) derived from the genome sequences available at the *Joint Genome Institute (JGI, <http://genome.jgi.doe.gov>)*.

All PCRs were performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) and the Master Cycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). The thermal cycler profile was as follows: denaturation for 2 min at 98 °C, 35 cycles at 98 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec and 72 °C for 90 sec, a final step at 72 °C for 10 min, storage at 4 °C.

Table 3.1: Primers for the amplification of the target genes

Primers for initial amplification of the genes from cDNA		
Primer name	Organism	Sequence
AAJ_DyP_for	<i>A. auricula-judae</i>	ATGCGTCTCTCTCCTGTTTT
AAJ_DyP_rev	<i>A. auricula-judae</i>	CTAGGCAGAAAGCCGTCCGC
POS_DyP_for	<i>P. ostreatus</i>	ATGCGCTGGTGGACTACCTG
POS_DyP_rev	<i>P. ostreatus</i>	TTAAGCAGCGATTTTGTGCAAG
Primers for integration of restriction cloning sites		
MsP2_for_long_NdeI	<i>M. scorodoni</i>	GAATTCGGCTTCATATGCGGCTCA
MsP2_for_short_NdeI	<i>M. scorodoni</i>	CAGGCTTCCACTCATATGGCTTCTGTG
MsP2_rev_XbaI	<i>M. scorodoni</i>	CTGCAGAATTTCTAGATCAAACAGAAAGC
BAD_DyP_rev_PstI	<i>B. adusta</i>	TTTTTCTGCAGTCAAGCCGCGATAGTG TTTTTTCATATGCGTCTTTCGCTGTTG
BAD_DyP_for_long_NdeI	<i>B. adusta</i>	TTTTTCATATGGCTAAACTCGGTGCGA
BAD_DyP_for_short_NdeI	<i>B. adusta</i>	
POS_DyP_for_long_NdeI	<i>P. ostreatus</i>	TTTTTTCATATGCGCTGGTGGACTACCTGCG
POS_DyP_for_short_NdeI	<i>P. ostreatus</i>	TTTTTTCATATGCCAGTTATGGGTTCACTCT
POS_DyP_rev_XbaI	<i>P. ostreatus</i>	TTTTTCTAGATTAAGCAGCGATTTTGTGCA
AAJ_DYP_for_long_NdeI	<i>A. auricula-judae</i>	TTTTTTCATATGCGTCTCTCTCCTGTTTT
AAJ_DyP_for_short_NdeI	<i>A. auricula-judae</i>	TTTTTTCATATGCGTTCTGTGCTCCTCGCGT
AAJ_DyP_rev_XbaI	<i>A. auricula-judae</i>	TTTTTCTAGACTAGGCAGAAAGCCGTCCGC

\* Restriction sites are underlined

After purification of PCR fragments from 1.5 % agarose gels using the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), the obtained DNA was cloned into pUC57 vector (Thermo Scientific) previously linearized using the blunt end cutter *EcoRV* (Thermo Scientific) and T4 DNA ligase (Thermo Scientific). Several clones were obtained and analysed using colony PCR. After plasmid DNA propagation in *E. coli* TOP10 cells, isolation with the NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) and sequencing (Seqlab, Göttingen, Germany), the amplified sequences were compared to the reference sequences obtained from JGI.



Subsequently, the target genes were re-amplified from pUC57 constructs with and without the sequence coding for the internal signal peptide identified using the software SignalP [159]. The PCR was done with specific primers containing appropriate restriction sites (Tab. 3.1), and the products were ligated into the *E. coli* expression vector pCOLD DNA I (TaKaRa, Göttingen, Germany) using a molar ration of 5:1 (insert:plasmid).

After purification of PCR fragments and gel elution, the amplificates as well as the plasmids were digested with appropriate restrictions enzymes (Thermo Scientific), and the subsequent ligation resulted in the expression vectors pMsP2\_full, pMsP2\_short, pBaDyP\_full, pBaDyP\_short, pPoDyP\_full, pPoDyP\_short, pAajDyP\_full and pAajDyP\_short. Afterwards the vectors were transformed into *E. coli* TOP10 cells for vector propagation and later into BL21(DE3)Star for the expression using a standard protocol [160].

#### 3.4.5. Cultivation of the production strains and DyP expression

The pilot expression with recombinant *E. coli* cells was performed using 5 mL of LB-Amp at 250 rpm. The scale-up experiments were realized in 150 mL cultures in 0.5 L baffled flasks. *E. coli* cultures containing either recombinant or empty expression vectors were grown over night at 37 °C. Subsequently, cultures were diluted with LB-medium until an OD<sub>600</sub> ~0.1 and grown with vigorous shaking at 37 °C. At an OD<sub>600</sub> 0.4 to 0.6 (mid-log) the cultures were refrigerated at 18 °C for 30 minutes. Afterwards the recombinant protein production was induced by adding 20 to 100 µM IPTG. After induction for 24 hours the cells were harvested by centrifugation (12,000 × g, 4 °C, 5 min), resuspended in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 4.0 and lysed with a Precellys Bead Homogenizer (Peqlab, Göttingen, Germany). Cell debris and insoluble proteins were separated by centrifugation at 12,000 × g and 4 °C for 30 min.

#### 3.4.6. Chaperones co-expression

Chaperone containing plasmids (TaKaRa) were transformed into the *E. coli* BL21(DE3) STAR cells prior to the expression vectors. Following plasmids with various combinations of chaperones were tested: pG-KJE8 (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL), pGro7 (GroES, GroEL), pKJE7 (DnaK, DnaJ, GrpE), pG-Tf2 (GroES, GroEL, Trigger factor (Tf)), and pTf16 (Tf). Chaperones were induced with 1 mg mL<sup>-1</sup> L-arabinose and/or 5 ng mL<sup>-1</sup> tetracycline after the initial dilution step at the beginning of the cultivation.

#### 3.4.7. Expression analysis

To monitor the expression level, the cells from 1 mL *E. coli* cultures, as well as cell lysates and pellets were controlled via denaturing SDS-PAGE. The samples were diluted 1:1 with SDS loading buffer (0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.2 M DTT, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue), denatured for 10 min at 95 °C and loaded onto 12 % polyacrylamide gels as described earlier [161]. After the electrophoresis (20 mA per gel), the gels were stained with Instant Blue (Expedeon, Swavesey Cambridge, United Kingdom). The molecular masses were determined with marker proteins ranging from 10 to 250 kDa (Biorad, München, Germany).

For western blot analysis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) and identified using a specific antibody [55]. Visualization of the protein bands occurred after treating the membrane with the secondary alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG Antibody (Invitrogen).

#### 3.4.8. Purification of recombinant DyP peroxidases

For purification of the His-tag labelled recombinant peroxidases under native conditions, 1 mL slurry of Ni-NTA beads (Macherey & Nagel) were added to the cleared cell lysate of 150 mL culture in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 and slightly stirred for 1 h at 4 °C. After washing with 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 and sodium phosphate buffer pH 6.9 containing 25 mM imidazole, the proteins were eluted from the beads using a 50 mM phosphate buffer pH 6.9 containing 250 mM imidazole. Afterwards the buffer was changed to sodium phosphate pH 6.9 using a PD10 column. For the purification under denaturing conditions 8 M urea was added to all buffers except the elution buffer.

#### 3.4.9. ABTS Assay

The ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) converting activity of the expressed DyPs was assayed in a microplate reader (Eon, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany). Five microliters of sample were mixed with 280 µL 100 mM sodium-tartrate buffer pH 4.0 or Britton-Robinson buffer [162], 5 µL 15 mM ABTS and 10 µL 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The absorbance was measured at 420 nm for 10 min. For the negative controls, the sample was replaced with an equal volume of the buffer solution. All measurements were done in triplicate.

The optimal reaction temperature was determined in prewarmed buffer in a kinetic for five minutes which was started by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For the temperature stability assay the

enzyme was incubated at the given temperature for 60 min and tested under standard conditions at 30 °C.

#### 3.4.10. Application assay

For the bleaching of xanthophylls, 10 µL of norbixin (10 mg mL<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O) were mixed with 260 µL Britton-Robinson Buffer with various pHs, 20 µL enzyme sample, 10 µL 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and incubated for 30 min. Afterwards the pH of the treated samples was adjusted with NaOH to pH 9.5 to increase solubility and to allow the norbixin to form its characteristic absorption spectrum [163]. The degradation was determined by measuring the absorbance at 480 nm in the microplate reader and compared with a negative control with buffer instead of enzyme solution.

### 3.5. Results and discussion

#### 3.5.1. Amplification of target genes MsP2, BaDyP, AajDyP and PoDyP

Based on the cDNAs from *A. auricula-judae* and *P. ostreatus* and using the specific primers (Tab. 3.1), appropriate PCR products were amplified and cloned into the vector pUC57. After verification via sequencing, the obtained *P. ostreatus* and *A. auricula-judae* DyP coding sequences were compared to the reference genes.

The amplified PoDyP gene sequence showed 17 nucleotide exchanges and one change in the amino acid sequence (Thr17Ala) in comparison to the reference gene AM283034.1. The obtained AajDyP sequence showed seven nucleotide exchanges in comparison to the published sequence (JQ650250) leading to three amino acid exchanges (Ala258Gly, Ala349Thr, Val487Ala). These differences in the sequences are most likely a reflection of the genetic space of different strains compared to the reference strains.

All the four DyP genes containing pUC57 plasmids (*P. ostreatus* and *A. auricula-judae* from this study, *B. adusta* from [156], *B. adusta* from [33]) were templates for the production of the expression vectors based on pCOLD DNA I using the primers listed in Tab. 3.1 and the corresponding restriction enzymes. For each gene two different constructs were obtained: with and without the sequence coding for the native signal peptide. The ligation resulted in the expression vectors pMsP2\_full, pMsP2\_short, pBaDyP\_full, pBaDyP\_short, pPoDyP\_full, pPoDyP\_short, pAajDyP\_full and pAajDyP\_short. The amino acid sequences of the peroxidases expressed in the current work were aligned with some other fungal DyPs to show the lack of extensive conserved sequence motifs (Fig. 3.1).

## Comparative cold shock expression and characterization of fungal dye decolorizing peroxidases

G1DyP -----  
 PoDyP MRWWTTCVALTSLIPYALLPSYGF--SLPQQ--LEARQNDYPSGSLLDHYPGQHTLPTL  
 BaDyP MRLSLFVSVVAVFIG-----S-----STHVSAAKLGARQSRTTPLLNFPGQAPLPSL  
 PspDyP MQLKHFLAATAAFSA-----V-----TQS--AFAYHVKRARSSPLIGSFPGQPLPTI  
 TaDyP MQLKNFLAATAAFVA-----L-----SQP--IAAYHVKRARSSPLIVPFPQGALPTA  
 AajDyP MRL--SPVEVALLSG-LLAADLGLARSVAPRVADSPAAVTGTTRKTSLLKNVAGLPVPVPSA  
 MsP2 MRLTYLPLFAGIAIQ-SASA-----LPDFP--KSSVLKPRRTNSLLINPDAQPDLPFTA  
 MsP1 MKLFSASVFAAIIAS-HYAS-----ATAHI-RAPNVKPRRTNSLLTAPPQQPLPSA

G1DyP -----MASTLPPFNANVQGDILVGLPKKVQHYLFFQIDDDVTAFRKRLHLLIPLITTT  
 PoDyP ELIQKLNATNGTFLPLEEIQGDIMIGMRKPKKEIFFFYSIQNPRKFKSVLAKLIYPHITTT  
 BaDyP EQ-HSTQ-RGANTLPLDNIQGDILVGMKKQKERFVFFHVN DATSFKTALKTYVPDHITSA  
 PspDyP AEVQSSS-AGNDSLPPFENIQGDILVGMKKDKEKFVFFHINNATTFKSFLKYAPANITSV  
 TaDyP AQVQSTS-AGDDSI PFENIQADILVGMKKQNEKFVFFHINNAATFKSVLKYAPANITSV  
 AajDyP AQVA-----ATSLNTDDIQGDILVGMHKQKQLFYFFAINDPATFKTHLASDIAPVVASV  
 MsP2 QQAST-A-AASVGLNLDIQGDILIGMKKNKEMFFFFSIADATAFKSHLDSA I LPLITST  
 MsP1 QQAAS-A-SSSAGLNLDIQGDILIGMKKNKELFFFFSITDAATFKAKLGS DILELITST  
 :     :     :     :     :     :     :     :     :     :     :     :     :

G1DyP AQVQDDRAKIAANKKKAELGKAPELLRLSGVNIAFSSQFGLTKLGIKDD-MGDTAFKSGQ  
 PoDyP AQMVCTT-----CTQPSAMLNVAWTSQGLRKLGLVDD-LGDYPFAMGQ  
 BaDyP QTLISDP-----SEQPLAFVNLAFSNTGLQALGVTDS-LGDAQFPNGQ  
 PspDyP QTIIGPA-----SGQPQAFVNLAFSHTGFGALGVADD-LQDTAF TAGQ  
 TaDyP ATLIGPI-----SAQPQAVNVAFSQAGLGLGVTDN-LGDTAFTGGQ  
 AajDyP TQLS-NV-----ATQPLVALNIAFSNTGLLALGVTDN-LGDSLFANGQ  
 MsP2 QQLL-TV-----ATQPTTAVNLAFSQ TGLNALGLASQGLGDSLFASGQ  
 MsP1 NQLL-AV-----ATQPI TAVNVA FSSTGLKALGITDD-LKDPVFEAGM  
 :   :     :     :     :     :     :     :

G1DyP LNDTP-NLGDAGTTVNNKFPVNWINA FK-NQIHGVV IISGDCDLTVAATQATV L G I F N I G  
 PoDyP LNDAAALGDTDPS-----TTWAPGLYANKTDGAF LIAARDWEPIDTLLNQMKSWL---  
 BaDyP FADAS-NLGD-DL-----SQWVAPFTGTAIHG VFLIGSDQDSF LD QFENDI STAF---  
 PspDyP FADAP-SFGD-DT-----STWEEAFKGTNVDGVFLIGSDDVTTTNTQYRDDLKAKL---  
 TaDyP FADASDGLGD-DT-----NTWEPAFKGTNIDGVFLIISDQDSIITQYQDDLQAKL---  
 AajDyP AKDATS--FKEST-----SSWVPQFAGTGIHGVIILASDTTDLIDQQVASIESTF---  
 MsP2 FSG-AESLGD PGT-----SNWVQAFAGTGIHG VFL LASDTIDNVNAELS QIQSIL---  
 MsP1 LSNVAVDLSDPGT-----GNWVPGFVGT SVHG VFL LASDTIDNVNTELANIQITIL---  
 :   \*     :     .     .\*     :     :     :

G1DyP VRITLHEVLTLKGVVRPGDQKGHEHFGFLDGI SQPAVKDFDT--KPNPGQETVRRQGVILC  
 PoDyP -GDAIVETHSNRGAVRPGDAAGKEHFGWLDGFIQPAVAGFAT--STYPGQQLLLPGTLLT  
 BaDyP -GASITEVQALSGSARPGDLAGHEHFGFLDGI SQPAVTGWET--TVFPGQAVVPPGIILT  
 PspDyP -GDAWTVLLDLSAARPGAEGHEHFGYLDG I SNPTIPGFGT---PFPQGQAVVDSGVIFA  
 TaDyP -GDAWTVVYDLGAARPGDQFGHEHFGYLDG I SNPLIKGFGE---PLPGQAFIDPGIILV  
 AajDyP -GSSISKLYSLSASIRPGNEAGHEMFGFLDGI AQPAINGFNT---PLPGQNIVDAGVIIT  
 MsP2 -GTSITEAYRLQGEARPDQOGHEHFGFMDG I SNPAIDGFST---ALPGQAVLSPGLFLL  
 MsP1 -NGSITEIHRLQGEARPGDQOGHEHFGFMDG I SNPAVDGFTPPAEIRPGQALIPPGIMLL  
 :   .     \*     \*     :     :     :     :     :     :     :     :     :     :

G1DyP GREGDVVAGSKPEQPFVRPAWALDGSFLALRYLFQLVPEFDNFKASADP-----TKD  
 PoDyP KEIGDPRR-----AARPAWTKWGSFMAYRQLQELVPEFDNYLMQEAAAL-IQDSSRSVR  
 BaDyP GRDGDP-----TTRPSWALDGSFMAFRHFQQKVPFNA YTLANAIPANSAGNL TQQ  
 PspDyP GRTNDPV-----TNRPSWALDGSFLVFRK LKQLVPEFHKWTLDNALQ-NQAGNL TVE  
 TaDyP GRANDTV-----TTRPAWALDGSFLAFRKLKQLVPEFHKY TLDNALQ-NQSGNLSTE  
 AajDyP GATNDP-----ITRPSWAVGSGFLAFRQLEQLVPEF NKYL LDNAPA---GS-GSLQ  
 MsP2 AEDGDGSS-----SSRPSWAKDGSLLAFRQLEQLVPEF NKFLADNAAAL-----TQ  
 MsP1 GEANDTFQ-----NDRPPWAKDGSFLVFRQMQQRAPEFNKFLQDHALN---MPNMTSE  
 :   \*                             \*     :     \*     :     :     :     :     :     :

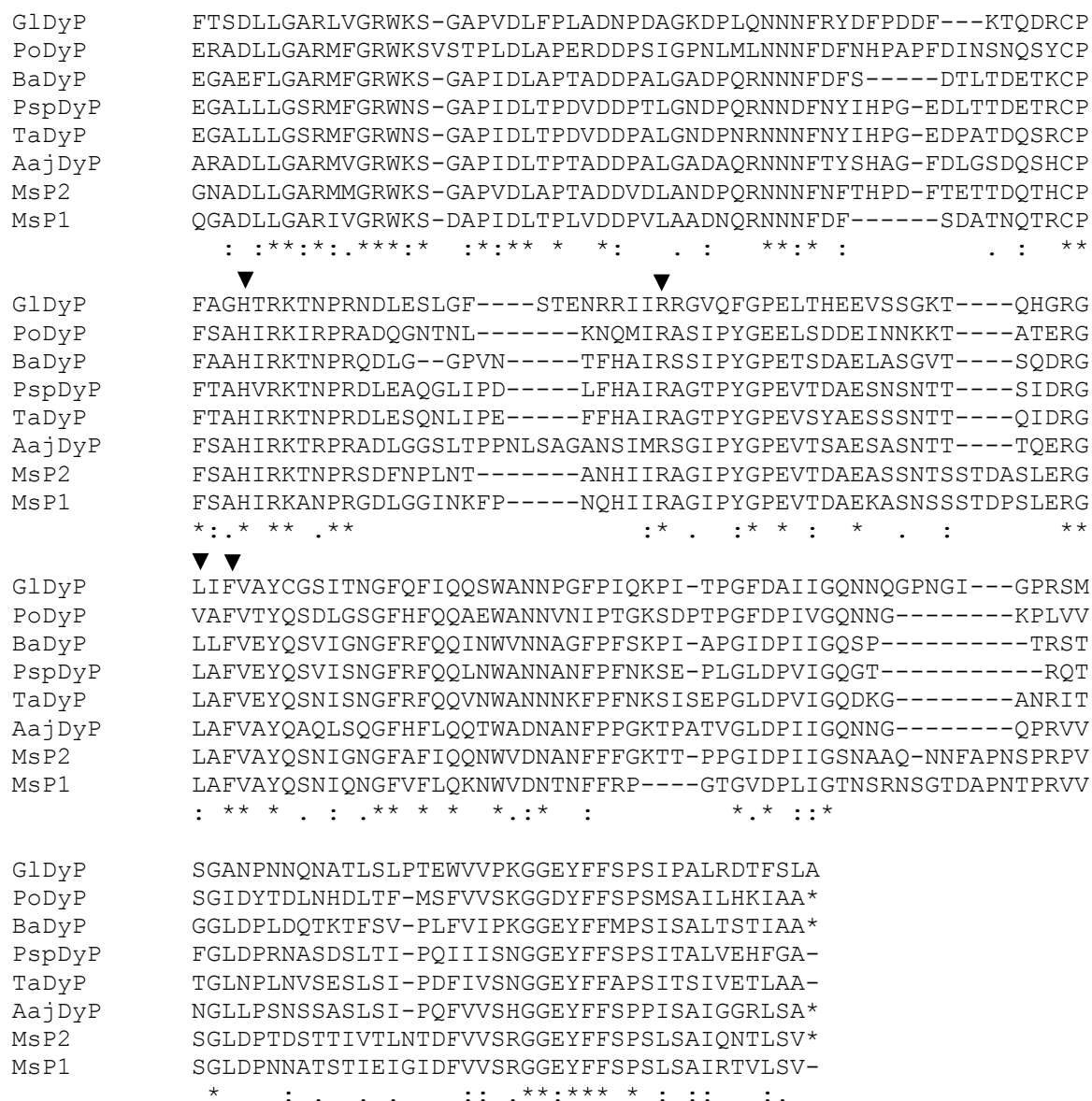


Figure 3.1: Alignment of DyPs expressed in the current work in comparison with other characterized DyPs. G1DyP: *Ganoderma lucidum* (gb: ADN05763.1), PspDyP: *Polyporaceae* sp. (gb: AAB58908.1), TaDyP: *Termitomyces albuminosus* (gb: AAM21606.1) MsP1: *Marasmius scorodoni* (gb: AM921678.1). Black triangles show important amino acids for the heme binding, the black box indicates the GXXDG motif containing the catalytic aspartic acid residue, asterisks indicate conserved residues, and signal peptides are underlined. Alignment was performed with Clustal Omega (European Bioinformatics Institute, Hinxton, UK)

### 3.5.2. Expression of the DyP peroxidases and optimization of the culture conditions

The production efficiency of the different DyP peroxidases was evaluated using five mL cultures induced with 100 μM IPTG at 18 °C for 24 h. After cell disruption, the soluble fractions were tested using the ABTS assay. The short version of BaDyP showed an ABTS activity, while BaDyP\_long was expressed as inactive inclusion bodies. For AajDyP both variants, with and

without the intrinsic signal sequence, were expressed in an active state, while the mutant containing the native signal peptide showed higher activity than the short one. In contrast, the short version of the MsP2 DyP showed a higher activity than the full version. Finally, only the long variant of PoDyP was active (data not shown). It is known, that signal sequences can have an effect on protein folding [164]. Furthermore, the presence of the signal sequence could lead to steric hindrance at the catalytic site and therefore to a decreased activity after heterologous protein production. An example, such a missing processing was described for the C-terminal tails of some laccases [165]. In summary, all of the target DyPs were expressed in a soluble and active form using the pCOLD DNA I based expression system. It is well known that a decrease of temperature resulting in a decrease of metabolic activity can improve the yield of active recombinant proteins [166,167]. This principle can be exploited by using the pCOLD I DNA vector containing the cold shock inducible promoter *cspA* which is especially active at low temperatures [132]. Using this system, other basidiomycotic proteins were actively expressed in *E. coli* recently [167–169] indicating that lowering the temperature of expression may be a general route to better yields.

For each of the proteins the optimal IPTG concentration was determined separately. In general, higher IPTG concentrations led to an increased total amount of produced protein. This increase ended at a point at which an increase of the IPTG concentration led to the formation of insoluble inclusion bodies and a decrease of active protein. The highest activity for recombinant PoDyP, MsP2 and BaDyP was obtained after induction with 100  $\mu\text{M}$  IPTG, while the required IPTG concentration for AajDyP was considerable lower (20  $\mu\text{M}$ ). The use of chaperones did not lead to an increase of active protein (data not shown).

An important advantage of the presented expression system is the fact that the cells produce heme-containing peroxidases without the addition of hemin during the cultivation. In this work hemin was added with a concentration of 20  $\mu\text{M}$  during cultivation, but none of the four tested DyPs showed a significantly higher activity compared to the respective controls without hemin. Until now, it was necessary to add hemin in other expression systems, for example to *E. coli* for the production of basidiomycotal DyPs [51] or for other types of peroxidases [170,171], as well as in *Aspergillus* hosts [172,173]. Others had to use hemin during the refolding process to restore the activity [156,157]. In many cases, the use of hemin was the only choice to achieve a successful production of active enzyme. Nevertheless, it is tedious work with up to five separation steps to purify the enzyme from the hemin. Such a purification would be mandatory for bleaching applications, were the colour of hemin would counteract the effects of the bleaching by deepening the colour, for example during the bleaching of pulp [81]. Another

possibility would be a genetic engineering of the hosts cells to increase the ability to produce hem containing enzymes [174]. In their work they introduced the genes from *Salmonella typhimurium* LT2 for the enzymes *hemA* and *hemL* into *E. coli* which produced the heme precursor 5-aminolevulinic acid.

While the expression of BaDyP was achieved without the addition of hemin in *Aspergillus oryzae* [43], this work presents the first report of an expression of a basidiomycotal DyP without hemin in a prokaryotic host.

### 3.5.3. Purification

In order to obtain pure proteins for further biochemical characterization, each of the concentrated cell lysates from 125 mL cultures of *E. coli* BL21(DE3)Star was purified via affinity chromatography using the His-tag. Except the PoDyP, which was not produced in a soluble form as the short variant, all the DyP variants without the native signal peptides were successfully purified with this protocol, whereas the variants containing the signal sequences did not bind on the Ni-NTA matrix (data not shown). Likewise, [175] found an inaccessible N-terminal His-tag in combination with the presence of the signal sequence .

To substantiate this hypothesis the proteins were purified under denaturing conditions by the use of 8 M urea. Then, BaDyP\_short, MsP2\_short and AajDyP\_short were successfully purified as comparable to native conditions. The obtained proteins had the expected molecular masses (52.8 kDa, 50.3 kDa, 52.9 kDa). No protein band was detected for the PoDyP\_long even after concentration of the solution (Fig. 3.2A).

A western blot was performed with MsP2 as an example to verify the presence of the desired protein in the purified fraction. Two distinctive bands at about 30 kDa and 50 kDa became visible (Fig. 3.2B). While the lower one was most likely caused by a side-specificity of the polyclonal antibody, the larger one showed the expected size of the target protein.

### 3.5.4. Biochemical characterization

The biochemical characterization was done using ABTS assay with the His-tag purified AajDyP, BaDyP, and MsP2 and the cell lysate for the PoDyP. The heat stability was assayed after an incubation for one h at different temperatures (Fig. 3.3A). Recombinant MsP2 and PoDyP were stable at a temperature of 30 °C, but a sharp decrease was detected after the incubation at 40 °C. In contrast, a highly similar DyP from *P. ostreatus* [51] heterologously produced in *E. coli* BL21(DE3)pLysS was stable at 45 °C without loss of activity. The differing heat stability was probably caused by the differences in the experimental conditions (10 min incubation vs. 60 min).

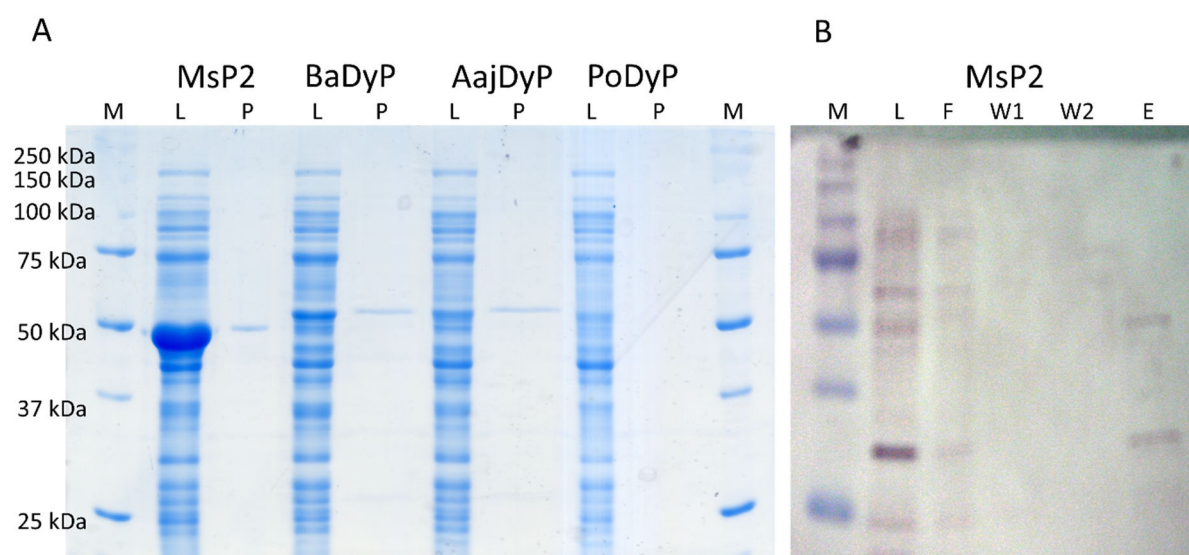


Figure 3.2: Expression and purification of the recombinant DyPs produced in *E. coli* BL21(DE3)Star. Induction occurred with 20  $\mu$ M (HajDyP) respectively 100  $\mu$ M IPTG (BaDyP, MsP2, PoDyP) at 18 °C for 24 h. A) Purification was done under denaturing conditions (8 M urea) via Ni-NTA-chromatography. The 12 % SDS gel was stained with InstantBlue. B) Western blot of the MsP2 DyP. Purification was done under native conditions via Ni-NTA-chromatography. Visualization via western-blotting with the MsP2 specific antibody, M: marker proteins, L: lysate, P: His-tag purified enzyme, F: flow through, W: wash fraction, E: elution fraction.

Recombinant BaDyP and AajDyP peroxidases were relative stable at higher temperatures with a residual activity of ca. 80 % after incubation at 50 °C. A further increase of the temperature led to a sharp loss of activity. For all peroxidases almost no activity was detected at 60 °C which was in accordance to the results obtained for the wild type of AajDyP [157].

The temperature optimum for the recombinant DyP peroxidases was assayed over five min. The maximal activity for PoDyP was reached between 30 to 40 °C, the maximum for MsP2 ranged between 40 to 60 °C and the activity of BaDyP and AajDyP rose with the increase of the temperature (Fig. 3.3B).

The pH optimum for the enzymes was tested in the Britton-Robinson buffer [162]. While the pH optimum of the MsP2 DyP was at 2.5, the optima of the other three peroxidases were in the



weak acid range between 4.0 pH 5.0 (Fig. 3.3C). The results are consistent with previous studies of the wild type AajDyP peroxidase from *A. auricula-judae* [52] and with a refolded AajDyP variant [157] heterologously produced in *E. coli* BL21(DE3)Star. The recombinant PoDyP [51] had its optimum for ABTS degradation at pH 3.5 under similar conditions. The exact sequence of the mentioned PoDyP is currently inaccessible (KP973935). Therefore it is not known, if the native signal sequence or possible tags were present in the enzyme. A known difference is the purification via FLPC in their work [51].

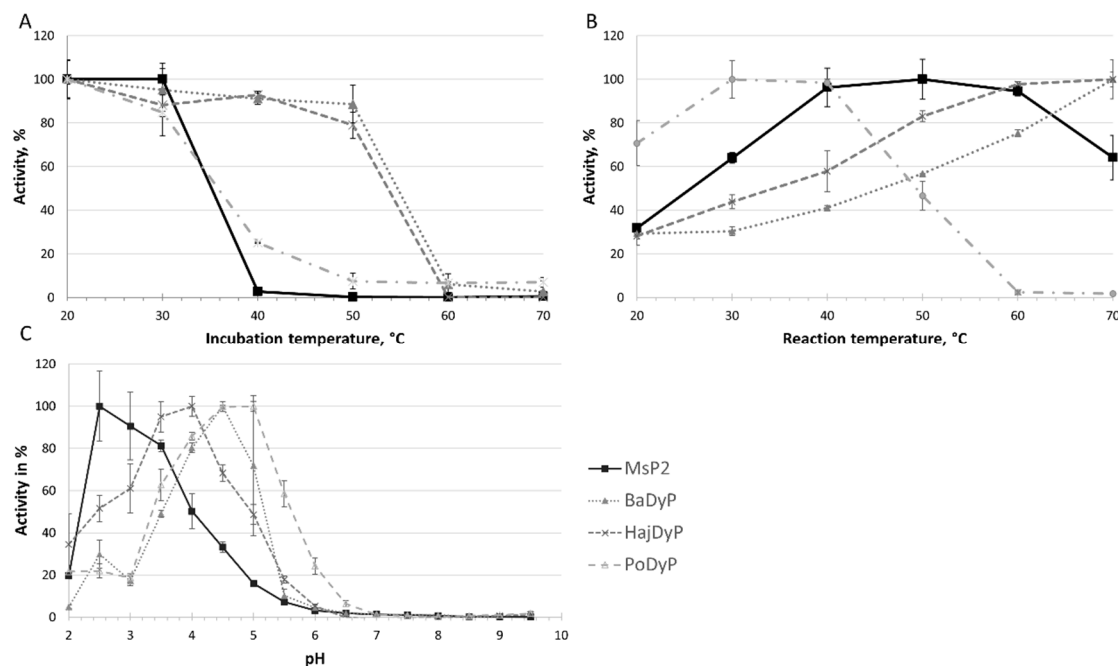


Figure 3.3: Biochemical characterization of the recombinant DyP peroxidases using the ABTS activity assay. A: Heat stability of the heterologously expressed proteins. Samples were incubated for 1 h at the given temperature followed by the activity assay at 30 °C. B: Temperature optima of the heterologously expressed proteins; C: pH optima of the expressed proteins. Britton-Robinson buffer was used in the ABTS-assay.

### 3.5.5. Annatto degradation

The DyP-type peroxidase MsP1 from *M. scorodoni* is used on an industrial scale for the destaining of whey from Cheddar cheese production ('Maxibright') [56]. Native MsP1 peroxidase was able to degrade  $\beta$ -carotene and the complex substrate annatto. Annatto, with bixin and norbixin as the main constituents, is known as the food additive E 160b. It is widely used in the food industry, for example for colouring cheese curd. During this application 80 % to 85 % of the colour is transferred to the cheese, while the rest remains in the cheese whey and must be removed to separate colourless lactose and other valuable constituents from the whey [176]. To test the DyP peroxidases, which were expressed in this study for a possible use in destaining applications, this was assayed using norbixin as the substrate. The norbixin solution

had a broad absorption range between 400 and 500 nm at pH 9.5 or above, with distinctive peaks at 450 and 480 nm. For the quantitative measurements, the second peak at 480 nm was used due to the low signal to background ratio after the enzyme treatment (Fig. 3.4A).

Table 3.2: Biochemical characterisation of the expressed DyPs using ABTS as substrate

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
BaDyP	152.1	0.96	6.31
AajDyP	187.5	1.15	6.12
MsP2	8.5	0.02	2.43
PoDyP	1587.3	n.d.	n.d.

The degradation of the norbixin solution was tested with a standardized activity and was achieved with BaDyP, AajDyP and MsP2, but not with PoDyP. After the enzymatic annatto degradation, a small residual absorption without a distinctive peak was detected. The results were identical for all three DyPs and are shown exemplary for BaDyP (Fig. 3.4A).

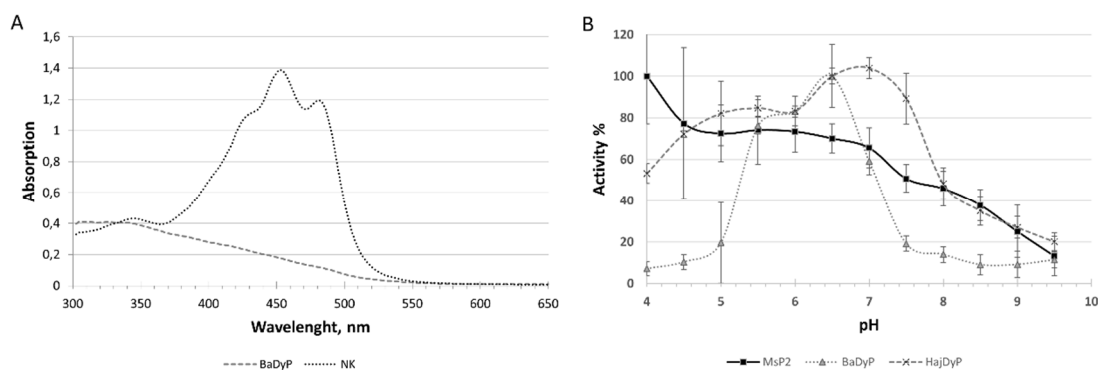


Figure 3.4: Annatto degrading assay. A: spectra of the annatto solution before and after enzymatic degradation with BaDyP (1 mU / 300  $\mu\text{g}$  norbixin, 30 min). B: pH optima of the expressed proteins. Britton- Robinson buffer was used in the annatto assay.

This enzymatic degradation process differed from the degradation of bixin by photobleaching [177], which resulted in products with roughly the same or slightly shifted absorption spectra due to the presence of several cis- or all trans-isomers. Complete degradation by photobleaching was not achieved under these conditions. For the degradation by heat, the same small shifts in the absorption spectra were detected, but, in addition, an all-trans-C17 molecule with a maximum between 400-420 nm was identified [178].

The pH optima of the enzymes differed strongly. While BaDyP and AajDyP showed an optimum in the neutral range (pH 6.5 and pH 7.0, respectively), MsP2 was able to degrade bixin at pH 4.0 or below. The differences in the pH-optima of DyPs for different substrates are a well-known property [51,52]. Due to the fact that MsP2 as well as AajDyP possess a bixin destaining

activity over a broad pH range, both might be applied to cheese whey (pH 4.7 to 5.4 [179]), which is currently done with hydrogen peroxide or benzoyl peroxide [158], if not with MsP1.

### **3.6. Conclusion**

Using the cold shock expression system pCOLD I DNA and IPTG concentrations above 20  $\mu$ M, four basidiomycotic DyPs of different taxonomic origins were functionally expressed using a general protocol in *E. coli*. The unpredictable impact of the native signal sequence on the success of the expression calls for further refinements. The addition of hemin was not necessary during or after cultivation, a major advantage because of the otherwise inevitable interference of the coloured hemin with destaining applications. After the successful expression and characterization, three out of four enzymes were shown to degrade the natural food colour norbixin (E160b) and to exhibit a potential for the removal of undesired carotenoid pigments in food. Possible applications beyond the established whey bleaching could be, for example, in bakery (bleaching of dough) and in wine processing (bleaching of base wines for coolers).

### **3.7. Acknowledgments**

Support of the work by the BMBF cluster Biokatalyse2021 (FKZ0315172B) is gratefully acknowledged, as are helpful discussions with D. Linke.

#### **4. Vorwort zur Publikation “Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*”**

Anthocyane als große Gruppe der sekundären Metabolite sind in vielen Früchten und Blüten vorhanden und stellen wichtige pflanzliche Farbstoffe dar [180]. Zur Bleichung von anthocyanhaltigen Flecken sollten Enzyme aus pilzlichen Überständen mittels eines Screening isoliert und anschließend identifiziert werden. Hierbei wurde eine Laccase identifiziert, die, wie gewünscht, Anthocyane abbaute und weitere interessante Merkmale aufwies.

So konnte mittels Sequenzvergleich mit bereits bekannten Laccasen eine für *Pleurotus* Spezies charakteristische 16 Aminosäure lange N-terminale Sequenz identifiziert werden, bei der vermutet wurde, dass diese einen großen Einfluss auf die Aktivität des Proteins besitzt [165]. Um dies zu untersuchen, wurde der Fokus der Arbeit von der reinen Identifizierung waschmittelaktiver Enzyme auf Deletionsstudien des Enzyms verschoben. Hierdurch sollte untersucht werden, ob die Deletionen entweder Einfluss auf die Aktivität im allgemeinen oder auf die für bestimmte Substrate spezifische Aktivität haben, da dies für eine andere Laccase beschrieben wurde [181]. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die durchgeführten Deletionen die Stabilität oder das Wirkungsoptimum verändern.

Als letztes sollte getestet werden, ob und welche artifiziellen und natürlichen Farbstoffe die Laccase abbauen konnte.

Die durchgeführten intensiven Vergleichsstudien der Laccasevarianten zeigten für die Expression in *P. pastoris* keine Unterschiede in der Produktionsrate. Im Gegensatz hierzu konnten bei der Bestimmung des Optimums für verschiedene Substrate leichte Unterschiede identifiziert werden, sodass der N-terminale Bereich hier eine Funktion haben muss. Bei der Analyse des Substratspektrums zeigte sich für alle Varianten, dass eine vielfältige Auswahl an Farbstoffen gebleicht wurde. Erstmals konnte die Bleichung von Carotenoiden mittels einer Laccase nachgewiesen werden. Dies ist besonders im Kontext der gegenwärtigen Bleichung von Carotenoiden in Abwässern wichtig, wo problematische Co-Substrate wie Wasserstoffperoxid genutzt werden [56]. Weiterhin konnte hierdurch der Mehrwert für die Waschmittelindustrie verbessert werden.

An dieser Arbeit war Frau Dr. Linke beteiligt, die die Identifizierung sowie Aufreinigung der Laccase durchführte, sowie Herr Allister, der Teile der praktischen Klonierungsaufgaben übernahm. Frau Dr. Zelena steuerte Ideen zur Umsetzung bei während Herr Prof. Dr. Berger für die Akquise der Drittmittel und die Betreuung im Rahmen der Doktorarbeit verantwortlich war.

## 5. Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*

Christoph J. Behrens, Diana Linke, Aldrige B. Allister, Katerina Zelena, Ralf G. Berger

### 5.1. Abstract

A laccase purified from the basidiomycete *Pleurotus pulmonarius* (PpuLcc) was found to have strong decolorizing activity on natural and artificial dyes. Therefore recombinant, His-Tagged, versions of this PpuLcc were expressed using *Pichia pastoris*. Codon optimization increased the level of secretion of the PpuLcc activity by six fold, to 7,000 U/L with ABTS as substrate. In contrast to reports on other laccases, alternative secretion signals and C-terminal truncations missing up to 13 AA had no effect on the level of activity. All of the recombinant PpuLcc's degraded triarylmethane and azo dyes; and, rapid bleaching of  $\beta$ -carotene and the polyene acid, norbixin, by a laccase were demonstrated for the first time. This PpuLcc may be useful for decolorizing unwanted polyene pigments, for example, from cheese processing, bakery products, deserts, ice cream or colored casings.

### 5.2. Introduction

Laccases (EC 1.10.3.2) are well-researched multi-copper enzymes first discovered in the sap of the Japanese lacquer tree *Rhus vernicifera* [59]. Until now, laccases were described in plants, fungi and insects as well as in some prokaryotes [182]. According to the law of mass action, laccases can polymerise free phenols or depolymerise crosslinked phenylpropanoids. In plant cells they drive lignification, while white-rot fungi use laccases for delignification [183]. The catalytic action of the enzyme depends on four copper ions which perform four single-electron oxidations of the substrate, causing a reductive cleavage of the dioxygen bond. Three copper ions are arranged in a trinuclear cluster to couple their electron potential which consists of one type two and two type three copper ions, while the one type one copper is located in the active site [184]. Laccases use the distinctive redox ability of the copper ions to catalyze the oxidation of a wide range of aromatic compounds reducing molecular oxygen to water [69]. The substrate of the laccase is oxidized directly or, if the substrate does not fit into the active site or if the redox potential is too high, with the aid of an intermediate electron transporter, called mediator [75]. In general, laccases oxidize a wide range of substrates comprising *ortho*- and *para*-diphenols, aromatic and aliphatic amines as well as some inorganic ions [185]. This wide range of substrates is even expanded in the presence of a mediator [76].

In view of their wide substrate specificity and good stability, many industrial applications were envisaged. They were suggested for wine and beer stabilization, fruit juice clarification, but also for bleaching of fibres in the textile industry [77,186]. Furthermore, numerous laccases were found to degrade a diverse variety of natural and synthetic dyes [79]. Overall, the abilities of this enzyme class led to an increase in industrial processes using laccases [73] To satisfy the demand for more versatile laccases, the fungus *Pleurotus pulmonarius*, a member of a genus known to produce dye decolouring laccases [79], was screened for interesting candidate genes. No *P. pulmonarius* laccases have been expressed heterologously or examined for dye-degrading activities; thus, the aim of the present study is to test *Pichia pastoris* as a host for expression of a potent laccase for co-factor free degradation of polyene pigments.

### **5.3. Methods**

#### **5.3.1. Chemicals and Materials**

All chemicals used were obtained from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The enzymes were from Thermo Scientific (Braunschweig, Germany), unless otherwise stated. PCR primers were obtained from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

#### **5.3.2. Strains and culture conditions**

Cultivation of the *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), used for vector propagation and isolation, took place in Luria-Bertani broth (LB, Carl Roth) supplemented with 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ampicillin. *P. pulmonarius* (No. 5331, DSMZ, Braunschweig) was cultivated in standard nutrient liquid medium (SNL) as previously described [19]. Pre-cultures were grown for 7 days at 24 °C and 150 rpm. For the production of laccase activity, 250 mL SNL plus 200 mg Remazol brilliant violet 5R as an inducer were inoculated with 25 mL of pre-culture, which were then incubated at 150 rpm and 24 °C. At the time of maximum extracellular ABTS activity, the supernatant was separated from the mycelium by filtration under reduced pressure.

### 5.3.3. Purification

50 ml of culture supernatant was concentrated 10 fold by ultrafiltration (10k MWCO PES filter, Millipore, Darmstadt Germany), diluted 2 fold with 20 mM sodium acetate, pH 4.0 and loaded on a 1 ml SP-FF column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Elution with NaCl (10% steps of 15 ml each at 1 ml/min) generated 1 ml fractions that were pooled and concentrated to 250  $\mu$ l for 2 rounds of chromatography on Superdex 75 (10/300GL, GE Healthcare, 20 mM sodium acetate buffer pH 4.0, at a flow rate of 0.4 mL/min. Mass determination was performed by comparison with standard proteins.

### 5.3.4. ESI tandem MS analysis

Amino acid sequences of tryptic peptides were derived by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) using a maXis quadrupole time of flight (QTOF) mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) [187]. Similarity searches against public databases were performed using NCBI BLAST (blastp program).

### 5.3.5. Amplification of PpuLcc

Extraction of total RNA from the mycelium of *P. pulmonarius* from culture day eight days as described above as well as cDNA synthesis were performed as previously described [188] using the primer GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV for reverse transcription.

Amplification of the complete *P. pulmonarius* laccase gene was achieved with primers shown in Tab. 5.1 (supplemental data), and the obtained sequence was uploaded to the European Nucleotide Archive with the accession number LT595005.

The PCR as well as the ligation conditions were as described previously [188]. The resulting gene, based on the obtained cDNA, was codon optimized by GeneArt AG (Regensburg, Germany). Subsequently, different versions of the optimized gene were designed using primers shown in Tab. 5.1 of the supplement. As a successive step after the amplification, the PCR products were ligated into the corresponding vectors (pPIC9k or pPIC3.5k) using *EcoRI*, *NotI* and *SnaBI* for the restriction digestion

The resulting expression plasmids shown in Tab. 5.2 of the supplement were transformed into *E. coli* TOP10 cells for vector propagation [160], isolated (NucleoSpin, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and subsequently transformed into *P. pastoris* GS115 cells (Invitrogen) using a standard protocol [189]. Afterwards a second screening with geneticin containing agar-plates (1 to 4 mg mL<sup>-1</sup>) was performed.

### 5.3.6. Expression analysis

To select the best transformants, up to 48 colonies per construct with the highest geneticin resistance were grown in 96 deep well plates (600  $\mu$ L YEPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose) at 300 rpm and 28 °C for 72 h. Afterwards, the medium was changed to BMM (1.34 % yeast nitrogen base, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0,  $4 \times 10^{-5}$  % biotin, 0.8 % L-alanine, 500  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) [190], and the expression was induced with a daily addition of 1 % methanol for 120 h at 20 °C. The enzyme activity was measured using the supernatant of each well in an ABTS assay.

### 5.3.7. His-Tag purification of the heterologously expressed protein

150 mL culture supernatant were tenfold concentrated using Vivaspin 20 centricons (MWCO 10 kDa, Sartorius, Göttingen, Germany). Three mL of sixfold binding buffer (300 mM sodium phosphate buffer, pH 6.9) and one mL Ni-NTA-slurry (Protino, Macherey-Nagel) were mixed and slightly stirred for one hour at four °C. After washing with 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 and 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 containing 25 mM imidazole, the proteins were eluted from the beads using a 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 containing 250 mM imidazole. Afterwards the buffer was changed to 100 mM sodium acetate buffer pH 4.5 using a PD10 column (GE Lifesciences, Freiburg, Germany).

### 5.3.8. Activity assays

The activity was assayed photometrically (10 min, 30 °C, Eon, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany) with ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid, 420 nm, 0.5 mM) as substrate unless otherwise stated. Additionally, the substrates guaiacol (2-methoxyphenol, 460 nm, 10 mM) and syringol (2,6-dimethoxyphenol, 477 nm, 5 mM) [165] were used. The sample was mixed with sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5) for standard activity assays or Britton-Robinson buffer [162] for the pH optima determination containing the substrate. For the negative control, the sample was replaced by an equal volume of the buffer solution. All measurements were done in triplicate.

The temperature stability was assayed by incubating the enzyme at the given temperature for 60 min and afterwards tested under standard conditions at 30 °C using ABTS as substrate. For the optimal reaction temperature, the kinetics were performed in prewarmed buffer in a kinetic mode for ten minutes.



### 5.3.9. Decolourization assays

For the decolorization of methylorange (150  $\mu$ M, 462 nm), bromophenole blue (75  $\mu$ M, 592 nm) and crystal violet (50  $\mu$ M, 584 nm), the dyes were mixed with three mU enzyme, 30  $\mu$ L 100 mM sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5) and filled up with water to a total volume of 300  $\mu$ L. The degradation was measured at 30 °C over 16 hours photometrically.

A  $\beta$ -carotene emulsion was prepared as previously described [33] and normalized to a final absorbance of 1.0 in the assay. Norbixin (900  $\mu$ M, 480 nm) as well as  $\beta$ -carotene (450 nm) were mixed with sodium acetate buffer (100 mM, pH 4.5) and degraded with 30 mU enzyme per 300  $\mu$ L for two hours. Furthermore, the impact of ABTS as a mediator was assayed for all dyes at a concentration of 10  $\mu$ M.

### 5.3.10. Gel electrophoresis

SDS-PAGE analysis was performed on a 12 % polyacrylamide separation gel as described at [33]. The molecular masses were determined with marker proteins ranging from 10 to 250 kDa (Biorad, München, Germany).

For semi native-PAGE, non-denaturing conditions were applied: No DTT was added to the loading buffer, and no boiling step was performed. After electrophoresis (10 mA per gel), the gels were stained with 0.5 mM ABTS solution in Britton-Robinson buffer, pH 2.0.

Western analysis of the expressed proteins were performed as previously described [168] using an anti 5xHis antibody (Quiagen, Germany, #34660)

## 5.4. Results and discussion

### 5.4.1. Purification and identification of laccase activity

*P. pulmonarius* was cultivated in standard nutrient liquid medium in the presence of 0.8 % (w/v) Remazol Brilliant Violet 5R (RBV) under shaking conditions and harvested on day eight with a total ABTS activity of 3.700 U L<sup>-1</sup>, which was comparable to yields of the genetically related *P. sapidus* [191]. Purification of PpuLcc was carried out by cationic exchange, where the enzyme eluted at 20 % NaCl using SP-Sepharose Fast Flow. Active fractions were pooled, concentrated, and fractionated by repeated size exclusion chromatography resulting in an improved separation (Tab. 5.1). Semi native-PAGE indicated one ABTS-stained band, and a corresponding Coomassie-stained protein band at 56 kDa was determined by means of SDS-PAGE, which was confirmed by a calculated mass of 57.8 kDa (pI Tool of ExPASy) of the later amplified primary sequence (data not shown).

Table 5.1: Enzyme activities during the purification strategy

	volume (ml)	activity (U/l)	activity (mU)	Recovery (%)
culture supernatant	50	3.711	185.55	100.0
SP-Sepharose	12	5.405	64.86	35.0
1st SEC	1	24.8	24.80	13.4
2nd SEC	1	11.4	11.40	6.1

The protein band was excised from the denaturing gel, and tryptic peptides were sequenced *ab initio* (P1: GTLNIANK, P2: STVLAGGSYPGPLIK; P3: SAGSSTYNYENPVR, P4: DAHDLAPAGSIYDIK, P5: SLNGPASPLYVMNVVK, P6: DVVSIQDDPTDNVTIR, P7: ANPNSGDPGFANQMNSAILR). Similarity searches against public databases identified the enzyme as a member of fungal laccases with a 17 % sequence coverage compared to a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* 'Florida' (CAA06292.1).

### 5.4.2. Primer Design, PCR and Cloning

For the determination of amplification primers, the following similar sequences were used for the alignment: *P. ostreatus* 'Florida' poxA1b (CAA06292.1), *P. ostreatus* Laccase-2 (Q12739.1), and *P. eryngii* var. *ferulae* Laccase B (KP246839.1). The PpuLcc coding sequence was amplified in several steps starting with the combination of Ppu\_lcc\_1f and Ppu\_lcc\_1r primers leading to a sequence with two gaps at the ends of the sequence. The missing sequence information was complemented using the primer pairs Ppu\_lcc\_2f and Ppu\_lcc\_2r at the 5' end and Ppu\_lcc\_3f and Anchor Primer at the 3' end. Then, the coding PpuLcc sequence was amplified using Ppu\_lcc\_for\_complete and Ppu\_lcc\_rev\_complete primers yielding a sequence

of 1602 base pairs and 533 amino acids. The same primers were used for the amplification of the gene from genomic DNA resulting in a 2470 base pairs long sequence, containing 15 introns ranging from 50 to 68 base pairs. This number of introns was in accordance to other known laccase genes from *Pleurotus* species, ranging from 14 to 21 introns [192]. Subsequently, the sequence was codon optimized for *P. pastoris* expression. To this end, the GC content was reduced from 55 % to 47 %, which was supposed to increase the heterologous protein production [193,194].

An alignment of the identified PpuLcc sequence with different basidiomycetous as well as ascomycetous laccases is presented in Fig. 5.1. While the overall identity between PpuLcc and the other non-*Pleurotus* laccases was ranging between 27.6 % and 55.6 %, the identity increased from 93.6 % to 96.2 %, when compared to the laccases from the *Pleurotus* species mentioned above. The signal sequence of PpuLcc was determined using SignalP4.1 [159] and found to comprise twenty amino acids. The conserved regions of the copper binding sites, differing only in single amino acids between all analysed laccases, can be seen in the alignment (Fig. 5.1). The PpuLcc included a characteristic prolonged C-terminal tail of 16 amino acids, as it was found in the laccase POXA1B from *P. ostreatus* [195] or the laccase Ery4 from *P. eryngii* [165]. In contrast, other basidiomycetous laccases, such as En3 from *Ganoderma* sp. [196] or Lcc2 from *Trametes villosa* [197] did not possess such a sequence, as it can be seen in Fig. 5.1. Nevertheless, similar C-terminal tails, which were cleaved off at a conserved Asp-Ser-Gly-(Leu/Val/Ile) motif after expression [198], were also found in ascomycetous laccases, such as *Thielavia terrestris* or *Myceliophthora thermophila* [199].



#### 5.4.3. Construction of expression constructs

The codon optimized sequence (named “p” = *Pichia* optimized) was used as template for the production of the expression constructs using the vectors pPIC9K and pPIC3.5K. It is well known that the choice of the signal peptide targeting the recombinant protein to the extracellular space is a crucial factor during the heterologous production in *P. pastoris* [142]. For some basidiomycetous laccases the sufficiency of the intrinsic signal peptide has already been proven [190,201,202]; on the other hand, several laccases were extracellularly produced employing the alpha-factor as signal sequence [193,203,204]. Hence, different constructs, containing solely the native signal sequence (named “ns”) or the alpha-factor (named “af”) as well as combination of both sequences (named “af\_ns”) were created. The characteristic prolonged C-terminal tail of laccases, such as MaL, was believed to form a plug closing an access channel to the trinuclear cluster, therefore inactivating the enzyme in an unprocessed form [198]. Cleaving off the last eleven amino acids of a laccase from *Trametes versicolor* influenced the electron transfer rates of the active site [205]. For the Ery4 laccase from *P. eryngii* showing 94 % identity on the amino acid level to the PpuLcc laccase, the last two amino acids had to be cleaved off to achieve an active protein, when *Saccharomyces cerevisiae* served as a host. On the other hand, the cleavage of the last four or eleven amino acids of the laccase POXA1B from *P. ostreatus* reduced the specific activity [181]. To determine the effect of the tail on the properties of PpuLcc, different variations at the C-terminal tail were established (unmodified, -2 AA, -5 AA, -13 AA). For the truncated variants, the codons encoding the last two, five or thirteen amino acids were omitted and a stop codon was introduced instead (named “2, 5, 13, unmod”). To control the effect of the codon optimization, four additional constructs based on the wild type sequence (named “no”=not optimized) were created and transformed into *P. pastoris*.

#### 5.4.4. Expression analysis of the different constructs

The initial expression of all twelve codon optimized constructs with or without the C-terminal truncations in deep-well plates showed expression rates of 4,000 to 5,600 mU mL<sup>-1</sup> in the media after five days of cultivation (Tab. 5.2). Unlike in previous expression experiments, where a working native signal sequence led to a higher activity in the media [206,207], the activity of the truncated as well as the non truncated constructs was independent of the secretion signal used. When both secretion signals were combined, a decreased activity of roughly 4,000 mU mL<sup>-1</sup> was observed. Comparing single colonies, activities of up to 7,000 mU mL<sup>-1</sup> were reached. For further experiments, the colonies with the highest expression were chosen.

## Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*

Table 5.2: Expression of the recombinant PpuLcc variants in deep well plates. For each construct 16 colonies were tested. Induction was performed with daily addition of 1 % methanol in BMM medium.

	alpha-factor			alpha-factor + native signal peptide			native signal peptide			alpha factor (non- optimized laccase)		
	mean*	sd**	best colony	mean	sd	best colony	mean	sd	best colony	mean	sd	best colony
unmodified	5382.6	406.2	6020.9	4259.8	590.2	5702.4	5065.2	1459.9	6662.3	749.1	344.3	1260.2
-2 AA	5278.1	792.6	6301.5	4446.1	747.6	6282.1	4915.7	900.6	6328.3	963.4	236.6	1297.6
-5 AA	5258.3	701.4	6323.8	4167.7	458.2	4948.7	3841.9	2086.4	6212.4	888.9	260.6	1406.2
-13 AA	5691.2	1657.8	7108.2	4174.4	745.6	5753.0	5698.9	578.3	6641.4	161.0	81.9	833.3

\*Mean: mean value of all tested colonies per construct; \*\*sd: standard deviation. All activities are given in mU mL<sup>-1</sup> of ABTS degrading activity measured at pH 4.5 in 100 mM sodium acetate buffer.

To investigate the effect of the codon optimization on the expression of the PpuLcc gene in *P. pastoris*, constructs with a non-codon optimized form were also examined (PPu\_lcc\_Af\_unmod\_no - PPu\_lcc\_Af\_13\_no). The expression showed significantly lower extracellular laccase activities between 750 and 960 mU mL<sup>-1</sup>. It was concluded that the codon optimization of the gene was successful, resulting in an increase of activity by a factor of six. Surprisingly, the expression of construct PPu\_lcc\_Af\_13\_no resulted only in 160 mU mL<sup>-1</sup> laccase activity, which was four times lower than the other non-optimized constructs. A possible reason could be a lower mRNA stability of the construct in comparison to the others. While PPu\_lcc\_Af\_unmod\_no as well as the variants, where two and 5 amino acids were omitted, had a free energy of the thermodynamic ensemble of around - 649 kcal mol<sup>-1</sup>, the free energy of PPu\_lcc\_Af\_13\_no of -633 kcal mol<sup>-1</sup> was considerable lower (calculated with RNA fold, [208]). A difference in the protein folding of the various protein modifications was rather unlikely, as the codon optimized forms did not show a decrease of activity for the -13 variant. *In silico* analysis of possible glycosylation sites showed four N- glycosylation sites on the *P. pulmonarius* laccase [209]. To visualize the expressed protein, a semi-native SDS-PAGE with the subsequent ABTS activity overlay was performed for the truncated gene optimized laccase variant PPu\_lcc\_Af\_13 (Fig. 5.2). It was shown that the secreted recombinant laccase was heavily and heterogeneously glycosylated and did not form a distinctive band on the gel. Such complex glycosylation patterns were described for other fungal proteins heterologously

expressed in *Pichia*, for example for the endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum* [210]. After the treatment with endoglycosidase H, the apparent molecular mass of the PpuLcc protein dropped from a smear from 75 to 250 kDa to a sharp band at 40 kDa. Thus, up to 80 apparent mass% of the primary heterologous product were carbohydrate; peptidoglycan congeners were formed rather than a glycoprotein. A difference between the observed apparent molecular mass of 40 kDa and the calculated mass of 57 kDa was observed. This discrepancy can be explained by the fact that non-denatured proteins have often a more compact spherical form and therefore, show a different migratory behaviour in SDS-gels than an unfolded protein.

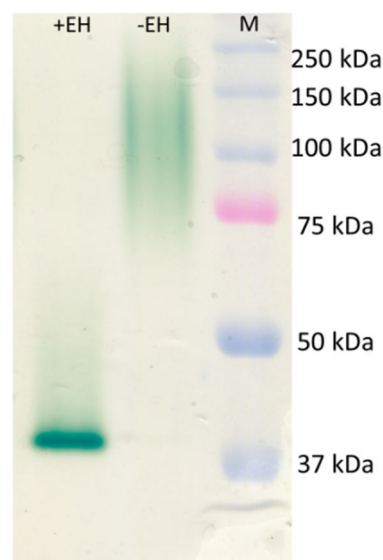


Figure 5.2 Semi-native SDS-PAGE of the variant Ppu\_lcc\_Af\_13 stained via activity overlay assay using ABTS as substrate. EH: sample was incubated with endoglycosidase H for one hour at 30 °C; M: Biorad Dual Colour pre-stained precision plus protein standard. ABTS overlay assay was performed in Britton-Robinson buffer pH 2.0.

#### 5.4.5. Characterization of the expressed proteins

To characterize the recombinant PpuLcc, the pH and temperature optima as well as the temperature stability were determined using ABTS as substrate. The His-Tag purified Ppu\_lcc\_Af variants were used because of their slightly higher activities. Moreover, during pH optimum and substrate specificity determination, additional substrates were investigated (Fig. 5.3). The optimal pH (2.5) for the ABTS degradation was identical for all four recombinant PpuLcc variants (Fig. 5.3A). The fact that the different variants had no differences in their optima for ABTS agreed with the truncations of the laccase Ery4 from *P. eryngii* [165]. For the degradation of syringol (Fig. 5.3B) the pH optimum showed a broad plateau with 75 % activity between pH 2.5 and 5.5 with a maximum between 3.0 and 4.0. The unmodified variant showed a lower activity between 4.0 and 6.5 in comparison to the other constructs. However, the differences were small, and the optimum itself did not change, which was similar to the truncations of the laccase POXA1B showing no differences in their optima towards syringol or syringaldehyde [181]. With guaiacol as substrate, (Fig. 5.3C) the differences between the constructs were more pronounced. The optima of the unmodified as well as the minus two truncated enzyme were pH 4.5, while the minus five and minus thirteen truncations had their optima shifted more to the neutral range at pH 5.5 and pH 6.0, respectively.

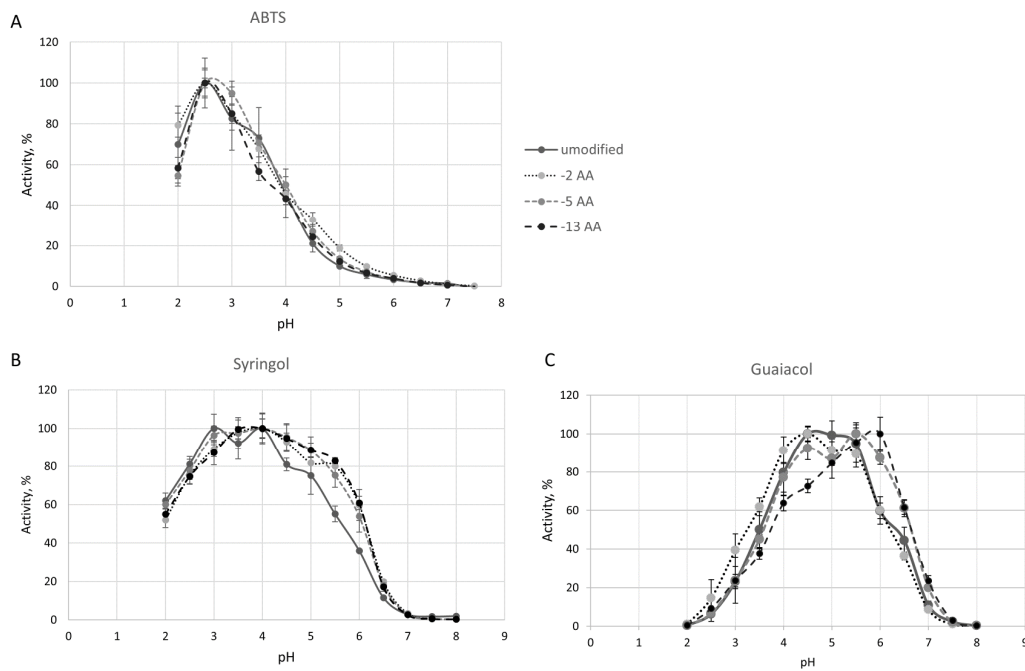


Figure 5.3: pH optima of the recombinant Ppu\_lcc\_Af variants with different substrates in Britton-Robinson buffer. Used substrates for the pH optima; A: ABTS, B: syringol, C: guaiacol

The substrate specificity of the different laccase variants showed only limited differences between the enzymes. While syringol was the best substrate for all variants showing the highest  $\text{kcat km}^{-1}$  values, guaiacol gave the lowest (Tab. 5.3). In the case of ABTS only small differences between the enzymes were seen with a  $\text{kcat km}^{-1}$  ranging from  $27 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  of the unmodified protein to  $56 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  of variant -13. In the case of guaiacol and syringol, Ppu\_lcc\_Af\_13 had the highest  $\text{kcat km}^{-1}$  values which were up to four times higher than the other variants, ranging between  $0.21$  to  $0.57 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (guaiacol) and  $67.09$  to  $245.86 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (syringol). The truncation of the 13 amino acids halved the  $K_m$  values for syringol and guaiacol, while the opposite effect was found with a 16 AA truncation of the closely related laccase POXA1B [181]. The substrate specificity was additionally compared using a fixed activity (1U) for a western blot analysis. The four tested variants were present in the same quantities, supporting previous results of very similar specific activities (supplementary Fig. 1).



## Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*

Table 5.3: Kinetic constants of the four Ppu\_lcc\_Af variants using ABTS, syringol and guaiacol as substrates. The assay was performed at the optimal pH of the different substrates in Britton Robinson buffer or 100 mM sodium acetate buffer.

variant	ABTS			Syringol			Guaiacol		
	$K_m$ mM	$k_{cat}$ $s^{-1}$	$k_{cat} K_m^{-1}$ $mM^{-1} s^{-1}$	$K_m$ mM	$k_{cat}$ $s^{-1}$	$k_{cat} K_m^{-1}$ $mM^{-1} s^{-1}$	$K_m$ mM	$k_{cat}$ $s^{-1}$	$k_{cat} K_m^{-1}$ $mM^{-1} s^{-1}$
unmodified	0.157	4.25	27.07	0.72	44.02	67.09	39.10	8.40	0.21
-2 AA	0.129	4.06	31.47	0.70	48.03	69.00	48.10	8.08	0.17
-5 AA	0.114	6.43	56.39	0.51	67.37	132.89	61.40	9.31	0.15
-13 AA	0.175	7.06	40.35	0.40	98.10	245.86	17.80	10.15	0.57

The temperature optima of the four laccase variants did not differ. All of them showed a broad temperature optimum between 50 and 70 °C in the ABTS assay, and there was still around 50 % activity left at 80 °C (Fig. 5.4A). Similar results were described for other laccases isolated from *Pleurotus* species, for example for laccases from *P. ostreatus* (POXA1c, 60 °C [195]) and *P. nebrodensis* (Lac1-3, 60 °C [211]), while Ery4 (variant P530A), a laccase from *P. eryngii*, had its optimum at 70 °C [165]. No significant difference in the heat stabilities of the PpuLcc variants was observed. One hour incubation at 40 °C did not decrease the activity, while after an incubation at 50 °C all of the variants lost about 40 % activity (Fig. 5.4B).

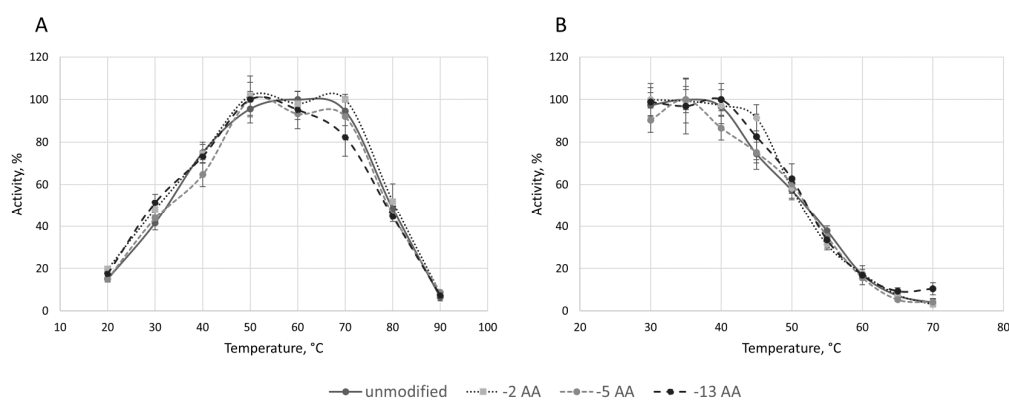


Figure 5.4: Biochemical characterization of the recombinant Ppu\_lcc\_Af laccase variants using the ABTS assay. A: Temperature optimum of the tested laccase variants in pre-warmed 100 mM sodium acetate buffer pH 4.5. B: Heat stability assay of the heterologously expressed proteins. Samples were incubated for one hour at the given temperature followed by the activity assay at 30 °C.

#### 5.4.6. Degradation of dyes

To examine a possible use of the recombinant PpuLcc in industrial decolorizing applications, several dyes served as substrates. The triarylmethane dyes bromophenol blue and crystal violet and the azo dye methyl orange belong to the group of artificial dyes, while  $\beta$ -carotene and the C24 polyene dicarboxylic acid norbixin are natural compounds. The degradation of  $\beta$ -carotene, a predominant colouring compound in many fruits and vegetables, is interesting for laundry detergents. Norbixin, one of the main ingredients of annatto, is used in the colouring of cheese and other staple foods, and must be removed from large-scale side-streams of processing [158]. The degradation of the dyes was assayed with all the variants of the recombinant PpuLcc, but no significant differences between the various preparations were found (data not shown). Although at a lower speed, the dyes were degraded using recombinant PpuLcc even in the absence of a mediator. Using three mU of variant Ppu\_lcc\_Af\_13\_p the artificial dyes lost from 21 to 27 % of their colour after 16 hours of incubation (Tab. 5.4). The addition of 10 mM ABTS increased the rate of the reaction, allowing the enzyme to degrade up to 90 % in the case of bromophenol blue. The degradation of crystal violet (82 %) and methyl orange (73 %) was likewise strongly increased. A supporting effect of a mediator during decolourization of the artificial dyes was observed with other laccases previously [190,196,201]. The ability to degrade a substrate without a mediator seems to be enzyme dependent. As in the present work, the degradation of bromophenol blue by the laccase LacE was efficient only in the presence of a mediator [212], while rLAC5930 [201] degraded it efficiently without any mediator. Another example for this interaction between laccase, mediator and substrate was described for the degradation of crystal violet. CILAC11 [78] degraded this dye in the presence of a mediator, for PpuLcc and rLAC48424-1 [190] a mediator increased the degradation, while for rLAC5930 [201] and for a laccase from *Ganoderma* sp. En3 [196] no mediator was required. Laccases differ in their redox potential and have been classified accordingly. The different decolorizing activities appear to be correlated to this parameter.

As carotenes are not as stable as the other tested dyes, a higher enzyme concentration (30 mU vs. 3 mU) and a shorter incubation time (two vs. 16 hours) were used. The degradation of  $\beta$ -carotene showed results analogous to the others dyes. Without a mediator, 25 % of the dye was degraded, while the addition of ABTS led to a degradation of 72 %. The laccase action did not require a mediator for efficient norbixin degradation. With or without the addition of ABTS the enzyme degraded 69 % to 71 %. The degradation of carotenes is of great interest for industrial application and enzymes are already employed in large scales [56]. While so far peroxidases were used for carotene bleaching, laccases were not yet described to catalyse this

reaction. For food applications, the artificial mediator ABTS must be replaced. Natural substitutes, such as phenylpropanoic acids or vanillin, were shown to work well and could be a feasible alternative to the colourful, non-natural standard mediator ABTS [213].

Table 5.4: Degradation of different dyes using Ppu\_lcc\_Af\_13 in 100 mM sodium acetate buffer pH 4.5. Bromophenol blue, crystal violet and methyl orange were treated with 3 mU recombinant PpuLcc each for 16 h,  $\beta$ -carotene and norbixin were treated with 30 mU for two hours.

		bromophenol blue	crystal violet	methyl orange	$\beta$ -carotene	norbixin
wo ABTS	mean*	26.70	20.81	26.71	24.80	69.40
	sd**	1.94	1.96	1.38	1.66	0.65
10 $\mu$ M ABTS	mean	89.46	82.44	73.11	72.29	71.01
	sd	0.70	0.98	3.00	0.79	0.77

\*mean: mean value of three replicates; \*\*sd: standard deviation, given is the decrease of absorbance in %.

## 5.5. Conclusion

A laccase gene was isolated from the fungus *P. pulmonarius* cloned and expressed in *Pichia pastoris*. Truncated variants of the PpuLcc reached activities of up to 7,000 U L<sup>-1</sup>. In contrast to previously published results, C-terminal truncations neither had a critical impact on the enzyme activity, nor on the biochemical properties of the expressed proteins. Although many laccase sequences are known, more basic research will be needed to safely predict properties from the full sequence or from truncated variants.

Oxygen is the only oxidant required in laccase catalyzed reactions; hence, PpuLcc or related potent laccases might replace currently used oxidants in greener industrial processes in the future. The degradation of norbixin is the first proof of a laccase catalysed conversion of such a polyene and did not even require the presence of a mediator. This shows a high application potential of the enzyme enabling the treatment of side streams of food processing without the usage of potentially hazardous or environmental problematic oxidants.

## 5.6. Supplement

Supplementary table 5.1: Overview of the used primers.

<u>Primers used for the initial amplification of the cds</u>	
Name	Sequence
PPu_lcc_1f	ATGGCGGTTGCATTCRTTGCG
PPu_lcc_1r	TCATGCYTTTCARTGGCGCAGG
PPu_lcc_2f	ATGGCGGTTGCATTC
PPu_lcc_2r	GGATGGCAGAGTTCATCTGGTT
PPu_lcc_3r	GAAGGAGTAAATCAGACCGCAGTAGCC
Anchor Primer	GACCACGCGTATCGATGTGCGAC
PPu_lcc_for_complete	ATGGCGGTTGCATTCGTTG
PPu_lcc_rev_complete	TTATGCTTTCAGAGGCGCAGG
<u>Primers used for vector production</u>	
PPu_lcc_for_AF_pichia_6xHistag_EcoR I	atata <u>GAATTCC</u> ATCATCACCATCACCACAGAGTTGAGGCTTCCATT GGTCC
PPU_lcc_for_AF_NS_pichia_6xHistag_EcoRI_2	atata <u>GAATTCC</u> AACGATGCATCATCACCATCACCACGCTGTTGCTTT CGTTGCTttg
PPu_lcc_for_NS_pichia_6xHistag_EcoR I	atata <u>GAATTCC</u> ATCATCACCATCACCACATGGCTGTTGCTTTCGTTG C
PPu_lcc_rev_pichia_-13_NotI	atatata <u>GCGGCCG</u> CTTATCCCATCAACAACCTGGATGG
PPu_lcc_rev_pichia_-5_NotI	atatata <u>GCGGCCG</u> CTTATGGCAATCTACCGATAGCGTTAG
PPu_lcc_rev_pichia_-2_NotI	atatata <u>GCGGCCG</u> CTTACAAAGGAGCTGGCAATCTACCG
PPu_lcc_rev_pichia_unmodified_NotI	atatata <u>GCGGCCG</u> CTTAAGCCTTCAAAGGAGCTGGCAAT
PPu_lcc_for_AF_6xHisTag_SnaBI	atata <u>TACGTAGA</u> ATTCCATCATCACCATCACCACCGCGTCGAGGCC AGC
PPu_lcc_rev_-13_NotI	atatata <u>GCGGCCG</u> CTTAGCCCATTAGGAGTTTAGATGGGTTAGAGC
PPu_lcc_rev_-5_NotI	atatata <u>GCGGCCG</u> CTTAAGGCAGACGGCCAATGG
PPu_lcc_rev_-2_NotI	atatata <u>GCGGCCG</u> CTTACAGAGGCGCAGGCAGAC
PPu_lcc_rev_unmodified_NotI	atatta <u>GCGGCCG</u> CTTATGCTTTCAGAGGCGC

Restriction sites are underlined

Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*

Supplementary table 5.2: Expression constructs of the *P. pulmonarius* laccase.

Name	Signal Sequence	Truncation	Codon optimized
PPu_lcc_Af_unmod_p	Alpha-factor	No	yes
PPu_lcc_Af_2_p	Alpha-factor	2 amino acids	yes
PPu_lcc_Af_5_p	Alpha-factor	5 amino acids	yes
PPu_lcc_Af_13_p	Alpha-factor	13 amino acids	yes
PPu_lcc_Af_ns_unmod_p	Alpha-factor and native signal sequence	No	yes
PPu_lcc_Af_ns_2_p	Alpha-factor and native signal sequence	2 amino acids	yes
PPu_lcc_Af_ns_5_p	Alpha-factor and native signal sequence	5 amino acids	yes
PPu_lcc_Af_ns_13_p	Alpha-factor and native signal sequence	13 amino acids	yes
PPu_lcc_ns_unmod_p	Native signal sequence	No	yes
PPu_lcc_ns_2_p	Native signal sequence	2 amino acids	yes
PPu_lcc_ns_5_p	Native signal sequence	5 amino acids	yes
PPu_lcc_ns_13_p	Native signal sequence	13 amino acids	yes
PPu_lcc_Af_unmod_no	Alpha-factor	No	no
PPu_lcc_Af_2_no	Alpha-factor	2 amino acids	no
PPu_lcc_Af_5_no	Alpha-factor	5 amino acids	no
PPu_lcc_Af_13_no	Alpha-factor	13 amino acids	no

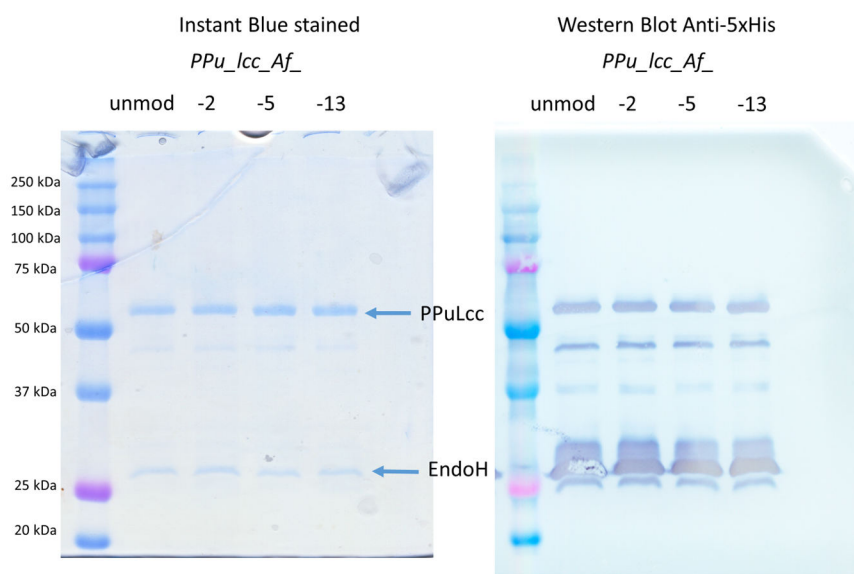
Af: alpha- factor, ns: native signal sequence, p: Pichia codon optimized, no: not codon optimized

Sequence of the codon optimized form of PpuLcc

ATGGCTGTTGCTTTCGTTGCTTTGGTTTCTTTGGCTTTGGCTTTGGTTAGAGTTGAGGCTTCCATTGG  
TCCAAGAGGTACTTTGAACATTGCTAACAAGGTTATCTCCCAGACGGTTTCTCCAGATCCACTGTT  
TTGGCTGGTGGTTCTTACCCAGGTCCATTGATCAAGGGTAAGACTGGTGACAGATTCCACATCAAC  
GTTGTTAACGAGTTGGCTGACACTTCCATGCCAATCGACACTTCTATTCACTGGCAGGTTTGTTCG  
CTAAGGGTCATAATTGGGCTGATGGTCCAGCTATGGTACTCAGTGTCCAATCGTTCAGGTCACCTC  
CTTCTTGTACGAATTTGACGTTCCAGACCAGGCTGGTACTTTCTGGTATCATTCTCACTTGGGTACT  
CAGTACTGTGACGGTTTGAGAGGTCCTTTGGTTATCTACTCCAAGAACGACCCACACAAGAGATTG  
TACGACGTTGACGACGAGTCTACTGTTTTGACTGTTGGAGACTGGTATCACGCTCCATCCTTGTCTT  
TGACTGGTGTTCACACCCAGACTCCACTTTGTTAACGGTTTGGGTAGATCCTTGAACGGTCCAGC  
TTCCCATTGTATGTTATGAATGTTGTTAAGGGAAAGAGATACAGAATCAGATTGATCAAACTTC  
CTGTGACTCCAACCTACCAGTTCTCCATTGACGGTCACACTTTCCTACTGTTATCGAAGCTGACGGTGAG  
AACACTCAGCCATTGCAAGTTGACCAGGTTGAGATTTTCGCTGGTCAGAGATACTCCTTGGTTTTGA  
ACGCTAACCCAGGCTGTTGGTAACTACTGGATCAGAGCTAACCCAACTCTGGTGATCCAGGTTTTG  
CTAACCCAGATGAACTCCGCTATCTTGAGATAACAAGGGTGCTCACTCTATCGACCCAACTACTCCAG  
AACAGAACGCTACAAACCCATTGAGAGAGTACAACCTGAGACCATTGGTTAAGAAGCCAGCTCCA  
GGTAAGCCATTTCCAGGTGGTGTGATCACAACATCAACTTGAACCTTCGCTTTTCGACCCTGCTACTG  
CTTTGTTCACTGCTAACAACTTCACTTTTCGTTCCACCAACTGTTCCAGTTTTGTTGCAGATCTTGTCC  
GGTACTAGAGATGCTCACGATTTGGCTCCAGCTGGTTCATCTACGACATTAAGTTGGGTGAGGTT

## Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*

```
GTTGAGATCACTATGCCAGCTTTGGTTTTTCGCTGGACCACATCCATTGCACTTGCACGGTCATACTT
TTGCTGTTGTTAGATCCGCTGGTTCCTCCACTTACAACACTACGAGAACCCAGTTAGAAGAGATGTTGT
TTCCATCGGTGACGACCCTACTGACAACGTTACTATCAGATTTCGTTGCTGACAACGCTGGTCCATGG
TTCTTGCACTGTACATTGATTGGCACTTGGACTTGGGTTTTTCGCTGTTGTTTTTGTGAGGGTGTTAA
CCAGACTGCTGTTGCTAACCCAGTTCCTGAAGCTTGAACAACCTTGTGTCCATTGTACAACCTCCTCC
AACCCATCCAAGTTGTTGATGGGAACTAACGCTATCGGTAGATTGCCAGCTCCTTTGAAGGCTCAT
CATCACCATCACCCTAA
```



Supplementary figure 5.1: Left gel: SDS-PAGE of the expressed and deglycosylated PpuLcc using Instant Blue for the staining. Right gel: Western Blot of the expressed and deglycosylated PpuLcc using an Anti 5x His Antibody. For each line a normalized enzyme activity of 1IU was used.

## **6. Vorwort zur Publikation “BadGluc, a $\beta$ -Glukosidase from *Bjerkandera adusta* with anthocyanase properties”**

Wie in Kapitel 4 erwähnt, wurde in einem Screening nach Anthocyan-abbauenden Enzymen gesucht, da diese pflanzlichen Farbstoffe eine wichtige Klasse von Verschmutzungen bilden und dem entsprechend ein großes Interesse in ihrer Entfärbung besteht. Neben der bereits beschriebenen Laccase konnte eine Glukosidase identifiziert werden, die eine Waschaktivität zeigte, sodass auch von dieser das industrielle Potential eruiert werden sollte.

Eine Literaturrecherche zu Beginn der Arbeiten ergab eine große Anzahl an Arbeiten zum Aufbau von Anthocyanen, jedoch nur einige wenige Arbeiten zum Abbau durch Glukosidasen und keine zum Einsatz dieser Enzymklasse in der Waschmittelindustrie. Es zeigte sich, dass hier Forschungsbedarf bestand, gerade in Bezug auf die Substratspezifität von Glukosidasen mit Anthocyanen als Substraten.

Aus diesem Grunde wurde das Gen des Enzyms identifiziert und heterolog in *P. pastoris* exprimiert, um anschließend die Charakterisierung des Enzyms mit verschiedenen artifiziellen sowie natürlichen Substraten durchzuführen.

Dabei ergab sich eine klare Bevorzugung von Substraten mit Glucoseresten gegenüber anderen Zuckern, was die Einordnung des Enzyms als Glukosidase bestätigte. Aufgrund der geringen Galactosidasenaktivität schränkte dies jedoch den späteren Gebrauch für den angestrebten Verwendungszweck ein. Dies ist begründet in der Tatsache, dass Anthocyane in der Natur gewöhnlich als Mischung verschiedener Aglycone mit diversen Zuckern wie Glucose, aber auch Galaktose vorkommen, sodass das gefundene Enzym nur einen Teil der potentiell vorhandenen Anthocyane degradiert.

Neben der Aktivität in wässrigen Lösungen mit spezifischen Anthocyanen zeigte das Enzym Aktivität mit komplexen Substraten wie vorgefärbten Lämpchen, wo eine Bleichung beobachtet werden konnte. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass diese Art von Enzymen für die vorgesehene Aufgabe geeignet und industrielles Potential in der Waschmittelindustrie vorhanden ist.

Anteilig beteiligt waren Frau Krahe, die praktische Arbeiten der Klonierung sowie Expression übernahm, sowie Frau Dr. Linke, die das Enzym identifizierte und reinigte, während Herr Prof. Dr. Berger für die Akquise der Drittmittel und die Betreuung im Rahmen der Doktorarbeit verantwortlich war..

## 7. BadGluc, a $\beta$ -Glucosidase from *Bjerkandera adusta* with anthocyanase properties

Christoph J. Behrens\*, Nina K. Krahe, Diana Linke, Ralf G. Berger

### 7.1. Abstract

A glycosidase of the basidiomycete *Bjerkandera adusta* (BadGluc) was found in screenings to possess a strong decolorizing ability towards malvidin-3-galactoside, an anthocyanin abundant in various berry fruits. The BadGluc was purified from the culture supernatant via FPLC, and the corresponding gene was identified which showed low similarity to other characterized glucosidases. Scanning the primary sequence with PROSITE no active site motif was detected. Eventually, a specific 18 aa consensus pattern was identified manually. The active site motif possessed an undescribed sequence which was only found in a few hypothetical proteins. The corresponding gene was cloned and expressed in *Pichia pastoris* GS115 yielding activities up to 100 U/L using 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) as substrate. The enzyme possessed a good temperature (70 % after 1h at 50°C) and pH-stability (70 % between pH 2-7.5), and preferably catalysed the hydrolysis of delphinidin-3-glucoside and cyanidin-3-glucoside, regardless of the position of the terminal HexaHis-tag. This novel glucosidase worked in aqueous solution as well as on pre-stained fabrics making it the first known candidate anthocyanase for applications in the detergent and food industries.



## 7.2. Introduction

Anthocyanins are the largest group of plant pigments ranging in colour from red over violet to blue [214]. They consist of an anthocyanidin core which is modified by one or several glycosyl, aromatic or aliphatic acyl groups [107]. Over 500 different anthocyanins were found in nature, but only six core structures predominate in vascular plants [215]. While the biosynthesis of these compounds has been characterized in great detail [216] there is little information on the degradation pathways. It is known that anthocyanins are degraded by polyphenoloxidases [217], peroxidases [108] or laccases [180] which attack the anthocyanidin part of the molecule. On the other hand, several anthocyanin-degrading enzymes were identified as  $\beta$ -glucosidases [106,218] which use the fact that the anthocyanidin core is more easily attacked by enzymatic or chemical reactions.  $\beta$ -glucosidases (E.C.3.2.1.21) are classified as a group of enzymes that catalyse the hydrolysis of terminal, non-reducing  $\beta$ -D-glucosyl residues releasing non-reducing terminal glycosyl residues, glycosides or oligosaccharides [83]. These enzymes are found in all kinds of organisms from archaea and bacteria to eukaryotic cells. Their most common activity is the last step of the degradation of starch as part of the cellulase system.  $\beta$ -Glucosidases were also found to catalyse the liberation of toxic compounds in plant cells as a defensive mechanism [219] or play a role in the secondary metabolism by hydrolysing monoterpene alkaloid intermediates [220]. Due to their wide range of possible industrial usages several groups researched the application of  $\beta$ -glucosidases in ethanol and biofuel production, improvements of beverages or the usage in the flavour industry [83]. The application of  $\beta$ -glucosidases as part of a laundry reagent to improve the degradation of anthocyanins on textiles has not been an object of investigation yet. Thus, the aims of the present study were the identification of a potent enzyme that bleaches anthocyanin stained fabrics in the presence of detergent, and its heterologous expression in *Pichia pastoris*.

### 7.3. Methods

#### 7.3.1. Chemicals and Materials

All chemicals used were obtained from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The enzymes were from Thermo Scientific (Braunschweig, Germany), unless otherwise stated. PCR primers were obtained from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

#### 7.3.2. Strains and culture conditions

Cultivation of the *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), used for vector propagation and isolation, took place in Luria-Bertani broth (Carl Roth) supplemented with 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ampicillin.

*B. adusta* (No. 4708, DSMZ, Braunschweig) was cultivated in SNL medium as previously described [19]. Pre-cultures were grown for 7 days at 24 °C and 150 rpm. For the production of glucosidase activity, 250 mL SNL plus 5 mL of anthocyanin extract from blackberries, prepared as described previously [221], were inoculated with 25 mL of pre-culture, which were then incubated at 150 rpm and 24 °C. At the time of maximum extracellular anthocyanin-degrading activity, the supernatant was separated from the mycelium by filtration under reduced pressure. Media and equipment were autoclaved prior to use, and sterile techniques were applied throughout the procedures.

#### 7.3.3. Purification strategy of wildtype glycosidase

Culture supernatant was concentrated tenfold with an ultrafiltration module (PES membrane, MWCO 10,000, Millipore, Darmstadt, Germany). Five hundred microliter concentrate was diluted ten times with 20-mM Tris-HCl buffer pH 7 and applied on a 1-mL Q-Sepharose FF column (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) equilibrated with buffer. After the column was washed with buffer, proteins were eluted with a linear ionic strength gradient (40 mL, 0–30 % NaCl) at a constant flow rate of 2 mL/min. Fractions (1-mL size) were tested for malvidin-degrading activity. Active fractions were pooled, concentrated, and 250  $\mu\text{L}$  were separated on a Superdex 75 column (10/300 GL, GE Healthcare) with a flow rate of 0.5 mL/min. Active fraction was concentrated and analysed via semi-native and SDS-PAGE.

#### 7.3.4. Gel electrophoresis

SDS-PAGE analysis was performed on a 12 % polyacrylamide separation gel. Samples were prepared by mixing 20  $\mu$ L of protein solution with 20  $\mu$ L of loading buffer (0.1 M Tris/HCl (pH 6.8), 0.2 M DTT, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.2 % bromophenol blue) and boiling for 15 min. After electrophoresis at 20 mA per gel, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue. To determine the molecular mass, marker proteins from 250 to 10 kDa (BioRad, München, Germany) were used. For peptide sequencing, protein bands were excised from SDS polyacrylamide gels, dried, and digested with trypsin. The resulting peptides were extracted and purified according to standard protocols [33].

Native PAGE was performed under non-denaturing conditions. Samples were prepared by mixing 1:1 (v/v) with native loading buffer (loading buffer without DTT and reduced SDS amount of 2 %). After electrophoresis, gels were washed two times in 0.1 % Triton X-100 for 10 min each, and covered with wetted standardized stained cotton (bilberry juice C-S-15 from the Center of Test materials, Vlaardingen, the Netherlands). After incubation at room temperature in aluminium foil, active proteins were detected as whitened bands, both on the cotton and on the PA gel as it was partially infiltrated by the natural dye.

#### 7.3.5. ESI tandem MS analysis

Amino acid sequences of tryptic peptides were derived by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) using a maXis quadrupole time of flight (QTOF) mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). The procedure was described in detail previously [187]. Similarity searches against public databases were performed using NCBI BLAST (blastp program).

#### 7.3.6. Amplification of BadGluc

Extraction of total RNA from the mycelium of *B. adusta* from culture day six as well as cDNA synthesis were performed as previously described [188] using the primer 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3' for reverse transcription. The coding sequence was amplified using the specific primers BadGluc\_for1 and BadGluc\_rev1 (Tab. 7.1). The PCR as well as the ligation conditions were as described previously [188].

Table 7.1: PCR-Primers used for the amplification and expression of the badgluc gene

Name	Sequence (5' → 3')
BadGluc_for1	ATGAAGCTGAAGCTCACCACCG
BadGluc_rev1	AGTCCAAGTACTGTCAATGGC
BadGluc_6xHis_EcoRI_for2	atatatGAATTCCATCATCACCATCACCACGTGCCCCAGGCAGCGTC
BadGluc_NotI_rev2	atatatGCGGCCGCTACACGGGGATAGAGCCCTTGAG
BadGluc_EcoRI_for3	AAAAGAATTTCGTGCCCCAGGCAGCGTCCAG
BadGluc_6xHis_NotI_rev3	AAAAGCGGCCGCCTAGTGGTGGTGATGGTGATGCACGGGGATAG AGCCCTT

To produce constructs for the expression in *P. pastoris*, the backbone pPIC9 (Invitrogen) was used. A sequence for an N-terminal, respectively a C-terminal 6xHis tag was fused to the gene to facilitate subsequent purification producing the constructs BadGluc\_NHis and BadGluc\_CHis. The resulting expression plasmids were transformed into *E. coli* TOP10 cells for vector propagation [160], isolated (NucleoSpin, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and subsequently transformed into *P. pastoris* GS115 cells (Invitrogen) using a standard protocol [189].

### 7.3.7. Expression analysis

To select the best transformants, up to 48 colonies per construct were grown in 96 deep well plates (600  $\mu$ L YEPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose) at 300 rpm and 28 °C for 72 h. Afterwards, the medium was changed to BMM (1.34 % yeast nitrogen base, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 4 x 10<sup>-5</sup> % biotin), and the expression was induced with a daily addition of 1 % methanol for 120 h at 20 °C. The enzyme activity was measured using the supernatant of each well in a pNPG assay.

### 7.3.8. Activity assays

The activity was assayed photometrically (EON, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, Germany) using 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) as a substrate. The samples (10  $\mu$ L) were mixed with potassium-phosphate buffer (40  $\mu$ L, 0.1 M, pH 6) and the reaction was started by the addition of the substrate (30  $\mu$ L, 75 mM). After an incubation period (15 min, 30°C) the reaction was stopped using borate buffer (200  $\mu$ L, pH 9.8) and the extinction of the products was measured at 405 nM. Additionally 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-galactoside, 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-xyloside and 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-fucoside were tested.

### 7.3.9. Anthocyanin degradation

The anthocyanin degrading activity was determined using malvidin-3-galactoside, delphinidin-3-glucoside, peoridin-3-glucoside, and peoridin-3-glucoside as substrates. The samples (50  $\mu$ L) were mixed with potassium-phosphate buffer (148  $\mu$ L, 0.1 M, pH 6) or sodium-phosphate buffer (148  $\mu$ L, 0.1 M, pH 8) and the reaction was started by the addition of the substrate (5  $\mu$ L, 2 mg/ml). The degradation was measured photometrically for 60 min at 30°C at the corresponding adsorption maxima.

### 7.3.10. Washing assay

One cm<sup>2</sup> of pre-stained fabrics (Center of Test materials, Vlaardingen, the Netherlands) with blackcurrant (C-S-12) or bilberry juice (C-S-15) staining were incubated with 50  $\mu$ L enzyme (75 U/L) and 800  $\mu$ L washing solution (4.58 g/L laundry reagent in 0.2 M sodium-phosphate buffer, pH 8) at 30 °C and 350 rpm for one or two h. To quantify the effect of only the enzyme on the stains, variants with 0.2 M potassium-phosphate buffer (pH 4.5) without the laundry reagent were tested. Afterwards, the fabrics were slightly rinsed with water, dried and the Lab colour space was measured using a spectral photometer (ColorLite sph900, ColorLite Inovative Farbmesstechnik). To compare the effect of the different samples the colour distance  $\Delta E$  was determined using a negative control without enzyme as the reference.

### 7.3.11. Purification strategy of recombinant BadGluc

For purification of the His-tag labelled recombinant glucosidase under native conditions, 1 mL slurry of Ni-NTA beads (Macherey & Nagel) were added to the 10x concentrated culture supernatant in 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 and slightly stirred for 1 h at 4 °C. After washing with 50 mM sodium phosphate buffer pH 6.9 and sodium phosphate buffer pH 6.9 containing 25 mM imidazole, the proteins were eluted from the beads using a 50 mM phosphate buffer pH 6.9 containing 250 mM imidazole. Afterwards the buffer was changed to sodium acetate pH 4.5 using a PD10 column. For the purification under denaturing conditions 8 M urea was added to all buffers except the elution buffer.

### 7.3.12. Sequence accession numbers

The nucleotide sequence of the *Badgluc* gene has been deposited in the GenBank database under accession number MF401567.

## 7.4. Results and discussion

### 7.4.1. Purification and identification of the glucosidase activity

Within a screening of 28 basidiomycetes on anthocyanin-containing agar plates, *Bjerkandera adusta* (Bad) turned out to be a promising candidate in degrading the natural pigment. Liquid cultures of Bad were prepared in standard nutrient liquid medium containing anthocyanins from grape juice. After six days of cultivation, a complete decolorization was observed. Highest malvidin-degrading activities occurred after nine days with about 120 U/L (Fig. 7.1A). The culture supernatant was concentrated and purified via anion exchange and size exclusion chromatography resulting in electrophoretic homogeneity (SDS-PAGE) of a protein with a molecular mass of 83 kDa (Fig. 7.1B, lane 4). Additionally, the anthocyanidin degrading activity of the protein was confirmed by native PAGE with a bilberry juice overlay (Fig. 7.1B, lane 1 and 2).

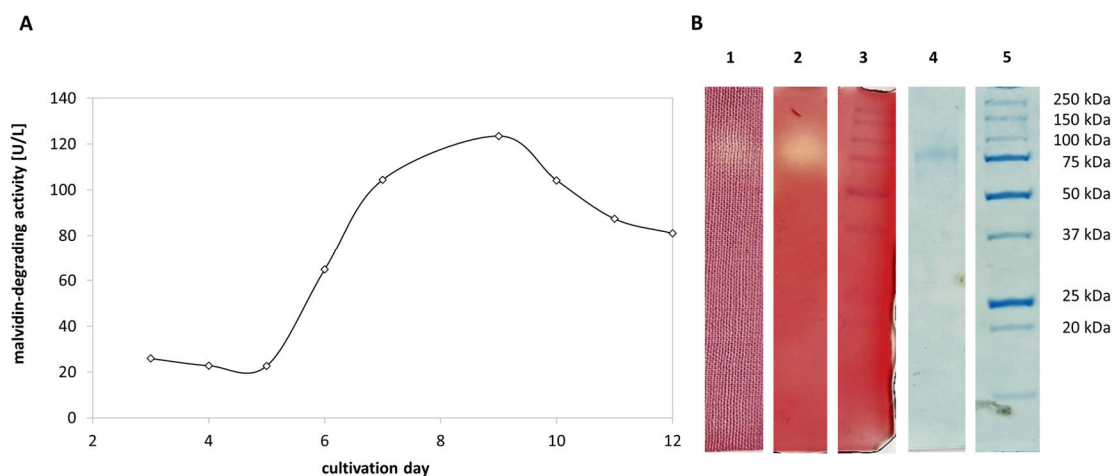


Figure 7.1: Kinetics of malvidin-degrading activity formation in submerged cultures of *Bjerkandera adusta* in the presence of an anthocyanin extract of grape juice (A). Anthocyanin zymography (bilberry-stained textile overlay after Native PAGE (1), Native PA gel after overlay (2), protein marker (3)) and Coomassie-stained SDS-PA gel of purified anthocyanase from Bad ((4), protein marker (5)).

The respective protein band was excised from the denaturing gel and tryptic peptides were sequenced *de novo* (DDMATR, HFDANN I/L EPR, TVT I/L T I/L SR, I/L TFSVGASSR). Homology searches against public databases identified the enzyme as a member of the glycosyl hydrolase 3 family (GH3).

#### 7.4.2. Amplification of the anthocyanase of *B. adusta*

The obtained peptide hits were used for a similarity search using the blastp program at the Joint Genome Institute with the genome of *Bjerkandera adusta* as template yielding a glucoside hydrolase (gml.3707\_g) as the best hit. Specific primers BadGluc\_for1 and BadGluc\_rev1 (Tab. 7.1) were used to amplify the complete coding region of 2747 bp. The translated amino acid sequence of 915 aa contained the peptide fragments which were obtained by ESI tandem MS (Fig. 7.2). A comparison of the obtained sequence with the genome showed 96 nucleotide exchanges, which caused 93 amino acid exchanges. Interestingly, in addition to these single nucleotide polymorphisms (SNP) an inversion of a 495 bp long sequence at the beginning of the gene was observed. Two additional sequences of 70 and 56 base pairs, respectively, were flanking the inverted fragment. The complete sequence can be found under the accession number MF401567. Using SignalP4.1, a hypothetical 24 aa signal sequence was identified at the N-terminus of the deduced amino acid sequence [159]. Blastp searches revealed highest homologies of 80 % identity to a putative glycoside hydrolase family 3 protein from *Phlebiopsis gigantea* (KIP12694), which is also a taxonomic member of the family *Phanerochaetaceae* (taxonomy ID 396331) like *Bjerkandera adusta*. All of the better matching sequences found were identified through genome or gene analysis, and none of them was investigated for its activity. Sequenced enzymes proven to hydrolyse  $\beta$ -glucans exhibited only 40 % (G4NI45 from *Magnaporthe oryzae*) and 39 % identity (P48825 from *Aspergillus aculeatus*), respectively. A protein alignment was done to highlight the sequence differences (Fig. 7.2). In conclusion, the BadGluc sequence presents a unique enzyme with a verified hydrolytic activity.

Identified putative conserved domains are  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase (PRK15098), glycosyl hydrolase family 3 C-terminal domain (pfam01915), and periplasmic  $\beta$ -glucosidase and related glycosidases (COG1472). Scanning the primary sequence with PROSITE [222] no active site motif ([LIVM](2)-[KR]-x-[EQKRD]-x(4)-G-[LIVMFTC]-[LIVT]-[LIVMF]-[ST]-D-x(2)-[SGADNIT]) was detected. A deeper look into the BadGluc sequence manually identified the specific 18 aa consensus pattern with the exception of the 12<sup>th</sup> amino acid: instead of L, I, V, or T, the enzyme exhibited a tyrosine at this position (Fig. 7.2). A Blastp search of the varied pattern yielded a copious detection of hypothetical beta-glucosidases (> 100), but few of these enzymes were characterised: XYL1 and XYL4 from *Arabidopsis thaliana* (Q9FGY1, Q9FLG1), as well as Cel3A from *Trichoderma reesei* (3ZYZ), and CBGLs from *Phanerochaete chrysosporium* (AAC26489, BAB85988). Therefore, the PROSITE consensus pattern should be re-arranged.

## BadGluc, a $\beta$ -Glukosidase from *Bjerkandera adusta* with anthocyanase properties

Q9FGY1	129	SFNQSLWEEIIGRVVSD	EARAMyngGVAgl	TYWSPNVN	ILRDR	PRWRGQETPGEDPI	VAAKYAASVVRGLQ	[6]	RLKVAA	210	
Q9FLG1	139	SFNVSLFQAI	GKVVST	EARAMyngGLAgl	TYWSPNVN	IFRDR	PRWRGQETPGEDPL	LASKYASGYVKGLQ	[8]	RLKVAA	
P48825	115	TWDKNLAYLRGQAMGQEF	SDK---	GID--	YQLGPAAGp	LGRSE	DGGRNWEGFSPD	PALTGVLF	FAETIKGIQ	DAGVVA	
G4NI45	99	TWDVLELMRQRQFQAE	EQKGC---	GVH--	VMLTPVGA	GLGKI	PEGGRNWEGFVDP	PYLAGI	AMEVTEGGQ	SVGVQA	
3ZYZ	84	TWDVNLIRERQFTIGE	EVKAS---	GTH--	VILGPVAGp	LKGTp	QGGRNWEGFVDP	PYLTGI	AMGQTINGIQ	SVGVQA	
AAC26489	184	TWNRTLMRQRGAAMGAE	EFKGC---	GVH--	VALGPMMN	LMRV	PAAGRNWEGGGDP	PFLS	GEVAFETITGIQ	SSGAQA	
BadGluc	217	TWKRSLMRTRGLFMGR	EHKGC---	GVH--	VALGPMMN	LGR	IAQGGRNWEGFGAD	PFLAGE	AAAYETILGMQ	EAGVQA	
OKY66952	147	TWNRTLRLMRGVMFGQ	EHKGC---	GVH--	VALGPMMN	MGR	IAQGGRNWEGFGAD	PFLS	GEVAFETILGMQ	SSGIQA	
KIP12694	286	TWNRTLRLRGLFMGQ	EHKGC---	GVN--	VALGPMMN	MGR	IAQGGRNWEGFGAD	PFLS	GEVAFETILGMQ	SGGIQA	
▲											
Q9FGY1	211	CCKHYTAYDL	DNWN [ 4 ]	FHFNAKVT	QODLE	DTY	NPVFKSCV	yEGK	VASVMCSYNQV	NGKPTCADEN	LLKNTIRGQWR
Q9FLG1	223	CCKHYTAYD	VDNWK [ 4 ]	YSFNAVVT	QODMD	DTY	QPFKSCV	vDGN	VASVMCSYNQV	NGKPTCAD	PDLLSGVIRGE
P48825	187	TAKHYILNEQE	HFR [ 13 ]	DTISSNVDD	KTIHE	MYL	WPFADAV	LAGV	GAIMCSYNQ	INNSYGCQNS	YTLNKLKAL
G4NI45	171	TAKHYLLNEQE	LNR	NTMSSNVDD	RTLHE	LYL	WPFADAV	RAN	VASVMCSYNK	INGSWACENE	HAMQKLLK
3ZYZ	156	TAKHYILNEQE	LNR	ETISSNPDD	RTLHE	LYL	WPFADAV	QAN	VASVMCSYNK	VNTTWACED	QYTLQTVL
AAC26489	255	CAKHF	INNEQE	HFR	DSSSNVDD	RTE	HELYGHPFL	RSV	QANVASVMCSYN	QINGTF	FCENEKTL
BadGluc	288	CAKHY	INNEQE	HFR	TMSSNVDD	RTE	HELYAHPF	MRSV	QAGVASVMCSYN	LINDTY	ACENDKML
OKY66952	218	CAKHY	INNEQE	HFR	TQESSNVDD	RTE	HELYAHPF	MRSV	QAGVASVMCSYN	LVNDTY	ACENNKTL
KIP12694	357	CAKHY	INNEQE	HFR	TQESSNVDD	RTE	HELYAHPF	MRSV	QAGVASIMCSYN	LVNDTY	ACDNKTL
▲											
Q9FGY1	291	GYIVSDC [ 14 ]	TPEEAAA	RSIKAGL	DLDCG	-----	PFLAI	FTEGAV	KKGLT	TENDIN	LALANPLTVQ
Q9FLG1	303	GYIVSDC [ 14 ]	TPAEAAA	ISILAGL	DLNCG	-----	SFLQ	HTEEAV	KSGLV	NEAIDKAI	SNNF
P48825	275	GFVMSDW	GAHHS	GVGSAL	AGLDM	SPGDT	IF	DSAT	SFWGT	NLTIA	VLNGTV
G4NI45	246	GYVMSDW	NAQHT	TTGSAN	AGMDM	TPGSD	F	NGGN	VWLP	QNLTA	VNNNQ
3ZYZ	231	GYVMTDW	NAQHT	TTQSAN	SGLDM	SPGDT	F	NGNN	RLW	GPAL	TNAVNS
AAC26489	330	GYVMSDW	WATH	S	GAPAVN	AGLDM	TPG	DET	LS	SGTTF	YFQNL
BadGluc	363	GYVMSDW	QAQ	HSTM	S	AVAGL	DM	TPG	DET	IF	LS
OKY66952	293	GYIMSDW	SAQ	HSTM	S	AVAGL	DM	TPG	DET	IF	LS
KIP12694	432	GYVMSDW	SAQ	HSTM	S	AVAGL	DM	TPG	DET	IF	LS
▲											
Q9FGY1	372	LGP	--YANL	GPRD [ 5 ]	-----	HKHLA	LEAAH	QGI	VLLKNS	SARSLPL	SpRRh
Q9FLG1	384	PKN	QIY	GGLP	TD [ 5 ]	-----	NQELA	DAAR	QGI	VLLKNT	GCLPL
P48825	351	YPP [ 9 ]	YGFY	FYPQE [ 6 ]	NHFV	VNQR	NHSE	VIK	LGAD	STVLL	KNNN
G4NI45	320	YPP	INIRA	-----	----	NVQ	GNH	KN	ENR	AVARD	GIVLL
3ZYZ	306	YPS	FNISR	-----	----	NVQ	GNH	KN	TN	VRAI	ARD
AAC26489	405	FEA	VNF	SNWS	SGQ	GQHV	VNS	GN	HA	SLIR	TIGA
BadGluc	437	YBN	VSN	AFD	FLD [ 3 ]	NQHV	DVQ	DDH	FKV	VR	VEAG
OKY66952	368	YPA	VNF	NAFF	PMD [ 3 ]	NEHV	DVQ	EDH	FV	VR	QIG
KIP12694	507	YPT	VNF	NAFF	PLD [ 3 ]	NEHV	DVQ	DDH	F	TV	VR
▲											
Q9FGY1	428	-----	DVTE	TMIGN	YAGK	CAYT	SFLQ	TSRY	ARTL	HQagc	AGVACK
Q9FLG1	441	-----	NVTK	TMIGN	YEGT	PCKY	TTP	FLQ	LAGT	VSTTY	Lpgc
P48825	436	SDR	GCD	NGT	LAM	AWG	SGT	A	EFP	YL	TPE
G4NI45	381	VDR	CNE	GAL	GMG	WSG	STT	NY	PF	S	APAD
3ZYZ	369	NDK	GCD	DGAL	GMG	WSG	AVNY	PF	V	DA	IN
AAC26489	475	SDR	AGD	V	G	V	L	A	L	G	W
BadGluc	510	SDR	GDD	G	I	L	A	M	G	S	G
OKY66952	441	SDR	GDD	G	I	L	A	M	G	S	G
KIP12694	579	SDR	GDD	G	I	L	A	M	G	S	G
▲											
Q9FGY1	496	SIEA	ETRDR	TGLLL	FGY	QD	LV	TR	V	A	S
Q9FLG1	508	SIEA	ESRDR	VDLHL	FGY	QD	LV	TR	V	A	S
P48825	513	SVD	GN	EG	DR	N	L	T	L	W	K
G4NI45	457	LVD	G	S	Y	G	R	L	N	L	D
3ZYZ	445	TVE	G	N	A	G	R	N	L	D	P
AAC26489	552	TVE	G	N	A	G	R	N	L	D	P
BadGluc	587	TVD	G	N	E	G	R	N	L	T	L
OKY66952	518	TVD	G	N	E	G	R	N	L	T	L
KIP12694	656	TVD	G	N	E	G	R	N	L	T	L
▲											
Q9FGY1	576	PSG	KL	P	M	T	W	Y	P	Q	D
Q9FLG1	588	PSG	KL	P	M	T	W	Y	P	Q	S
P48825	592	PG	AK	S	P	F	T	W	G	K	T
G4NI45	536	PSG	KL	P	Y	T	I	A	R	A	T
3ZYZ	524	PSG	KL	V	Y	T	I	A	K	S	P
AAC26489	631	PG	G	L	P	F	T	I	A	K	S
BadGluc	666	PSG	R	L	P	Y	T	I	A	K	S
OKY66952	597	PSG	R	L	P	Y	T	I	A	K	S
KIP12694	735	PSG	R	L	P	Y	T	I	A	K	S

Figure 7.2: Multiple sequence alignment using COBALT [223] of  $\beta$ -D-xylosidases XYL1 (Q9FGY1) and XYL4 (Q9FLG1) from *Arabidopsis thaliana*,  $\beta$ -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus* (P48825),  $\beta$ -glucosidase cel3A from *Magnaporthe oryzae* (G5NI45),  $\beta$ -glucosidase Bgl1 from *Trichoderma reesei* (3ZYZ),  $\beta$ -glucosidase from *Phanerochaete chrysosporium* (AAC26489), hypothetical  $\beta$ -glucosidases from *Phlebia centrifuga* (OKY66952) and from *Phlebiopsis gigantea* (KIP12694), respectively. Conserved areas calculated with a threshold of 3 bits are shadowed in grey, the catalytic nucleophile Asp is marked with an asterisk, and the amino acid Tyr, which should be included in the PROSITE consensus pattern, is printed in bold. Triangles represent the predicted amino acid



residues, which might be involved in substrate binding [224]. Two of the four peptide sequences of BadGluc identified by ESI-MS/MS-analysis are underlined.

Despite the widely distribution of  $\beta$ -glucosidases in nature, annotations regarding the amino acid residues involved in substrate binding are practically non-existing in public databases. Hrmova *et al.* investigated substrate binding of the GH3-family of higher plants by subsite-mapping techniques [224]. The localized tandemly arranged subsites were also recovered in the sequence alignments in Fig. 2 marked with a triangle: R257, K290, H291, Y336, W369, M386, W523. On the basis of 3D data and molecular modeling of enzyme/substrate complexes, flexible and fixed binding subsites were predicted which were concluded to provide a broad substrate specificity of these hydrolases.

Currently, the large GH3 family comprises 16,750 members (UniProtKB search parameter “database:(type:prosite ps00775)”, status June 2017), but only 156 of the entries have been reviewed. Harvey *et al.* divided the GH3 family into six major phylogenetic branches [225], where the BadGluc may be classified into the fourth branch, which comprises fungal  $\beta$ -glucosidases. The division is further expandable by the system of Cournoyer and Faure [226], after which the fungal enzymes are classified into subcluster C2 together with the  $\beta$ -glucosidase from *Phanerochaete chrysosporium* (AAC26489).

Beyond the hydrolysis of polyglucans,  $\beta$ -glucosidases play a decisive role in anthocyanin degradation. Although the importance of the enzyme activity on the flavor profile of fruits may be higher, some data about their function as anthocyanases exist. Examples are the finding of an anthocyanin-degrading  $\beta$ -glucosidase in eggplant [227], a  $\beta$ -glucosidase from Sicilian blood oranges [106], and a  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* [228]. An anthocyanin- $\beta$ -glucosidase was discovered in *Candida molischiana* [229], and moreover, was heterologously expressed in a wine yeast strain to improve wine storage. This was achieved by preventing of sediments or enabling a long-term incubation with grape skins during fermentation resulting in an increased flavor extraction and a simultaneous degradation of anthocyanin impurities in the production of white wines [230]. Homology comparison of the anthocyanin- $\beta$ -glucosidase from *C. molischiana* (AAA91297) and BadGluc resulted in only 34 % identity and 46 % similarity, respectively. To our knowledge, none of the annotated  $\beta$ -glucosidase sequences of *Aspergillus niger* has been assigned to an anthocyanase activity yet, confirming again the unique status of the BadGluc enzyme.

#### 7.4.3. Construction of expression constructs

The obtained glucosidase gene was amplified without the native signal sequence using the appropriate primer and cloned into the expression vector pPIC9 yielding two expression plasmids: BadGluc\_NHis and BadGluc\_CHis. The initial expression of the glucosidase either with the N- or the C-terminal His-tag yielded mean values of 33 U/L respectively 28 U/L in the deep well plates after 96 h of cultivation time using *p*NPG as substrate. While most likely these small differences were caused by the biological variation of the clones, it was described in the literature that the position of the affinity tag could have an influence on the activity [231,232]. The best performing colonies had an increased protein production of 96 U/L respectively 92 U/L hinting to a multiple insertion of the expression cassette [233]. Further expression experiments were conducted using these clones for maximum protein production.

#### 7.4.4. Purification of the expressed BadGluc

The produced glucosidase activity was tried to be purified using the fused 6xHis-tags, but both the N-terminal as well as the C-terminal His tag did not bind to the Ni-NTA resin under standard conditions (Fig. 7.3). While in most cases a steric hindrance is the reason for this result [175,234], it could also be possible that the tag itself was not present. To test for the first possibility and to exclude the second, a purification under denaturing conditions using 8 M urea was performed. Under these terms, both constructs were purified confirming the steric hindrance of the His-tag. Additionally, the protein had an apparent molecular mass of about 150 kDa (Fig. 7.3) which was higher than the wildtype protein molecular mass of 83 kDa. This discrepancy is most likely caused by excessive glycosylation by the production host, as it was described for other proteins produced in *P. pastoris* [210]. It was shown in literature that glycosylation of proteins may lead to the inability to bind to affinity columns [235], which explains the steric hindrance.

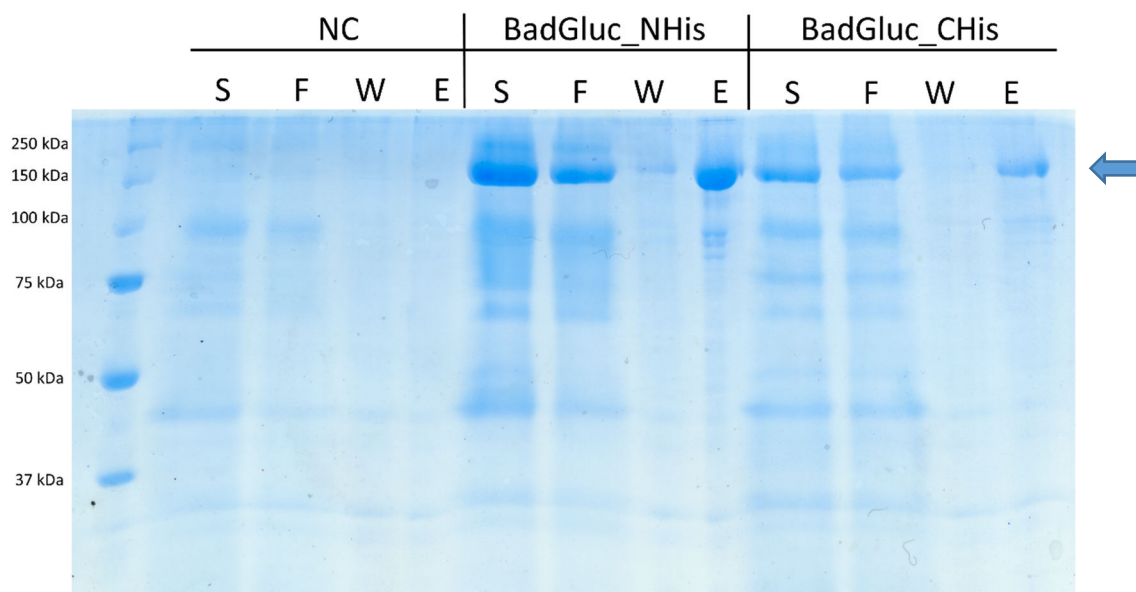


Figure 7.3: Purification of the glucosidase using denaturing conditions: S= culture supernatant, F= flow through, W= wash fraction, E= eluate.

#### 7.4.5. Characterization of the expressed proteins

Due to the inability of the constructs to bind to the affinity matrix, the culture supernatant of the *Pichia* expression media was used for the characterization. This was possible, because *Pichia* secretes only low levels of endogenous proteins into the media, thus, the target protein comprised the vast majority of the total extracellular protein [136]. To characterize the recombinant BadGluc, the temperature stability and optima as well as the pH optima and stability were determined. Both constructs were used to test for an impact of the His-tag on protein activity (Fig. 7.4). For both constructs, the activity increased with raising temperature reaching their optimal temperature at 60 °C which was similar to an anthocyanin- $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus niger* [236] while an anthocyanase from *Solanum melongena* had its optima at 35 °C [227]. If the temperatures were increased further, a sharp decrease of activity was observed (Fig. 7.4a). The protein had an activity of above 74 % between 50 °C and 65 °C which was similar to other fungal glucosidases from *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* or *Trametes versicolor* [237]. The temperature stability was determined by incubating the enzymes at the given temperature for one hour and then using the *p*NPG-assay at 30 °C. Both enzymes had a good stability with increasing temperatures to 45 °C losing roughly only 10 %. When the temperature was further increased, a dramatic drop in activity was observed after an incubation at 60 °C (Fig. 7.4b). A comparable drop of activity was observed with the anthocyanin degrading glucosidase  $\beta$ G from *Citrus sinensis* which lost almost all activity after 20 min at 65 °C [106]. Similar results were obtained when 1 mg/mL BSA was added prior the incubation

to exclude the possibility that peptidases of the culture supernatant degraded the enzyme (data not shown).

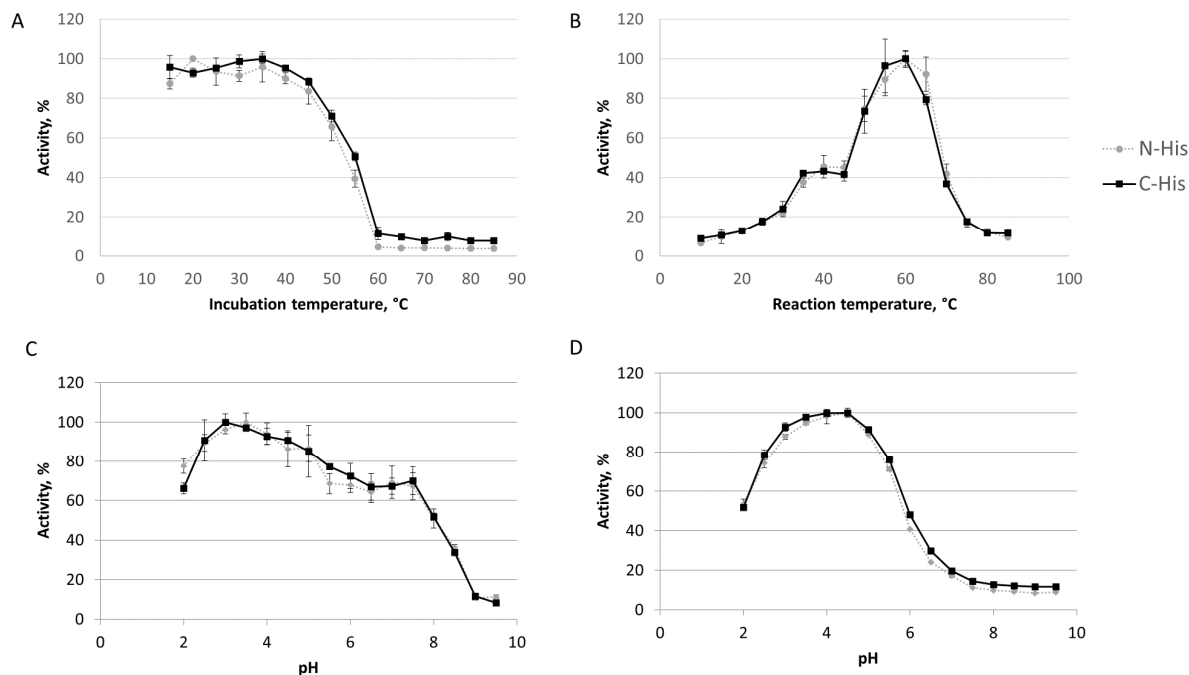


Figure 7.4: Characterization of the produced proteins. A: Temperature stability, B: Temperature optimum, C: pH stability, D: pH optimum

The pH optima was for both constructs between pH 4 and 4.5 while 90 % of activity was left between pH 3 and 5. In the range of pH >7 only a maximum of 20 % activity was observed using *p*NPG as substrate (Fig. 7.4d). This pH range of activity was similar to other known fungal glucosidases which had their optima between 4 and 5.5 [237] or an anthocyanin degrading glucosidase from *Aspergillus niger* (pH 4.0) [238]. The pH stability was determined by incubating the enzymes for one hour at the given pH in Britton-Robinson-buffer and afterwards performing the assay at pH 6.0. The maximal stability was between pH 3.0-3.5 decreasing to a remaining activity of 50 % at pH 8.0 (Fig. 7.4c).

To test for possible side activities of the enzyme, which are quite common for glycoside hydrolases [82], the alternative substrates 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside, 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-xyloside and 4-Nitrophenyl- $\beta$ -D-fucoside were tested. Of these substances only the xyloside was accepted as a substrate in very small quantities (0.2 % of the glucosidase activity, data not shown).

#### 7.4.6. Hydrolysis of anthocyanins

To test for the ability of the recombinant enzymes to hydrolyse anthocyanins in general, at first malvidin-3-galactoside was used, because the initial screening was performed with this substrate. Both enzyme variants showed the same ability to hydrolyse this substrate. As seen for the substrate *p*NPG, the enzyme showed a higher activity at pH 4.5 of about 6 U/L using malvidin as substrate. When the pH was increased to a pH of 8.0 about 5 % of residual activity was left.

Table 7.2: Malvidin-3-galactoside hydrolysing ability of the produced enzymes.

Variants of BadGluc	Anthocyanin-hydrolysing activity [U/L]	
	pH 4.5	pH 8
Empty plasmid	0.00	0.00
N-His	5.88	0.30
C-His	5.89	0.32

The sequencing of the gene indicated that the purified enzyme was not a galactosidase but a glucosidase instead. This was confirmed using the described artificial substrates, therefore, more suitable substrates (delphinidin-3-glucoside, cyanidin-3-glucoside and peoridin-3-glucoside) were chosen to evaluate the anthocyanin hydrolysing potential. As was expected the anthocyanins linked to glucose were a more efficient substrate for BadGluc reaching activities of 220 U/L with delphinidin as substrate. While cyanidin-3-glucoside and delphinidin-3-glucoside were similarly hydrolysed by the enzyme, the activity for peoridin-3-glucoside was lower by the factor of two reaching only 120 U/L (Fig. 7.5).

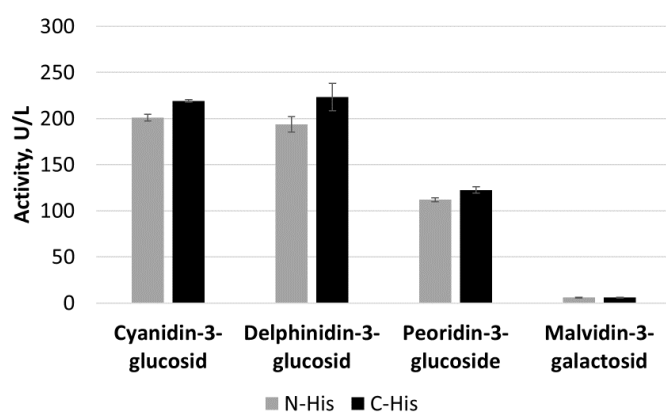


Figure 7.5: Comparison of anthocyanin hydrolysing activity of BadGluc, assay performed at pH 4.5 in sodium acetate buffer.

As a next step, the potential for washing applications was tested using fabrics pre-stained with blackcurrant or bilberry. Both enzymes showed the same bleaching effect for all tested conditions (Tab 7.3). Incubation at pH 4.5 increased the bleaching effect by a factor of two to three compared to pH 8 which is in accordance with previous results on the pH optima of the

enzymes. The bleaching of the blackcurrant stained fabric was more pronounced than the bilberry fabrics. A possible reason could be the different proportion of the various anthocyanins in these fruits [239] and a different specific activity of the tested enzyme against various anthocyanins. While for all conditions, a bleaching of the anthocyanins was observed using a spectral photometer, only the hydrolysis of blackcurrant at pH 4.5 after two hours was easily discriminated with the naked eye. The untrained human eye can only discriminate two colours from each other that have a  $\Delta E$  larger than two [240].

Table 7.3: Measured colour distance  $\Delta E$  between the samples and the negative control

Variants of BadGluc	blackcurrant pH 4.5		pH 8		bilberry pH 4.5		pH 8	
	1 h	2 h	1 h	2 h	1h	2 h	1 h	2 h
Empty plasmid	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N-His	1.77	3.05	0.52	1.30	0.97	1.45	0.27	0.88
C-His	1.69	2.96	0.63	1.27	1.05	1.49	0.35	0.79

## 7.5. Conclusion

A glucosidase gene was isolated from the fungus *Bjerkandera adusta*, cloned and expressed in *P. pastoris*. The obtained sequence had only low similarity to other glucosidases and possessed an undescribed active site motif, which should be included into the ExPASy-PROSITE data bank. Hexahistidine-tags, which were fused to the enzyme at both terminal positions for the purification of the enzyme were not accessible to Ni-NTA columns in the catalytically active enzymes, but had no effect on substrate specificity. More structures of glucosidases are needed to safely predict the folding and therefore 3D structure of these enzymes.

The heterologous expressed protein was able to hydrolyse a variety of anthocyanins in aqueous solutions as well as pre-stained fabrics, which makes it the first identified glucosidase usable in the detergent industry. Additionally, this glucosidase could be used in the flavour liberation or bleaching of wine as it was described for a few other glucosidases [229,230]. The data show that white-rot fungi from the class of Agaricomycetes hold a genetic potential which deserves further exploration.

## 8. Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigte in den drei verschiedenen Arbeiten bereits, dass sich Enzyme aus Basidiomyceten in pro- bzw. eukaryotischen Systemen heterolog exprimieren lassen und diese produzierten Proteine für ihre angedachten Anwendungen in der Industrie Potential besitzen. Jedoch blieben hierbei noch einige Forschungsthemen offen:

Während in der ersten Arbeit die Expression verschiedener DyPs mittels des *E. coli* Expressionssystems möglich war, zeigten sich starke Unterschiede in der erreichten Enzymaktivität. Zur Untersuchung möglicher Gründe für diese Unterschiede würde es sich anbieten, weitere basidiomycotische Enzyme zu produzieren, um durch eine Vergleichsanalyse der exprimierten Gene einflussnehmende Faktoren zu identifizieren. Hierdurch könnten Erfahrungen gesammelt werden, die in anschließend folgenden Experimenten zur Optimierung des Systems genutzt werden könnten.

Weiterhin sollte untersucht werden, wie die Präsenz der native Signalsequenz der untersuchten DyPs Einfluss auf die Aktivität der heterologen Proteine nimmt, da sich in der vorliegenden Arbeit bereits zeigte, dass hier ein wesentlicher Faktor für den Expressionserfolg liegt. Als letztes könnten durch weitere Screenings Kandidaten identifiziert werden, die ebenfalls  $\beta$ -Carotin abbauen können, um so weitere Möglichkeiten für die Carotinbleichung zu erhalten.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit handelte von der erfolgreichen Expression einer Laccase aus *Pleurotus pulmonarius*, die mittels Deletionsstudien untersucht wurde. Da sich hierbei deutliche Unterschiede zu einer bereits veröffentlichten Laccase aus *P. eryngii* zeigten, wäre die Untersuchung weiterer Laccase aus dem Genus *Pleurotus* notwendig, um abschließend die Funktion und den Einfluss des untersuchten C-terminalen Bereiches zu klären.

Weiterhin zeigte sich bei der Expression in *P. pastoris* ein extrem heterogenes Glykolisierungsmuster. Die Untersuchung der Gründe hierfür, sowie die Bestimmung der genauen Auswirkungen auf die Proteincharakteristika dieser diversen posttranslationalen Modifikationen wären erstrebenswert. Dies könnte entweder durch eine nachträgliche Deglykolisierung oder aber durch die Verwendung eines Expressionsstammes mit veränderter Glykosylierungsmaschinerie erreicht werden.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde die Expression und Charakterisierung einer Glukosidase aus *Bjerkandera adusta* beschrieben, die ursprünglich bei einem Screening auf Anthocyan abbauende Enzyme identifiziert worden war. Während viele Glukosidasen Nebenaktivitäten für

weitere Zucker wie Galaktose besitzen, war dies bei der BadGluc nur eingeschränkt der Fall, sodass das isolierte Enzym nicht alle gewünschten Substrate abbauen konnte. Hierdurch ergibt sich der Bedarf nach Enzymen mit breiterem Substratspektrum, die durch ein neuerliches Screening mit weiteren Pilzen identifiziert werden könnten. Zusätzlich könnten Sequenzvergleiche der BadGluc mit unspezifischeren Glukosidasen zur Identifikation von Schlüsselaminosäuren für die Substratspezifität führen, sodass als weitere Möglichkeit der Optimierung eine gerichtete Mutation durchgeführt werden könnte.

Zusätzlich hierzu sollte die genaue Wirkungsweise der in dieser Arbeit erstmal beschrieben Sequenz des aktiven Zentrums untersucht werden. Dies könnte durch Mutationsstudien des aktiven Zentrums erfolgen, bei denen die entsprechende Aminosäure gezielt in die bereits bekannten Aminosäuren geändert wird, um anschließend auf veränderte katalytische Eigenschaften zu testen. Ebenfalls möglich wären auch Vergleichsstudien zu den in der Literatur nur als hypothetische Proteine beschriebenen Sequenzen, die diese erstmal beschriebene Sequenz enthalten. Hierfür wäre eine Expression mit anschließender Charakterisierung dieser Sequenzen nötig.



## **9. Vorwort zum Abschnitt “Establishing the CRISPR-Cas9 system for the use of Basidiomycota”**

Neben meiner hauptsächlichen Arbeit, die die Erforschung der Möglichkeiten einer heterologen Produktion verschiedener waschaktiver Enzyme in *E. coli* oder auch *P. pastoris* als Ziel hatte, beschäftigte ich mich ebenfalls mit dem relativ neuen Thema der Geneditierung. Ein solches System war in unserer Arbeitsgruppe noch nicht etabliert, sodass grundlegende Arbeitsweisen zuerst designt sowie anschließend erprobt werden mussten.

Ein Vorteil des CRISPR-Cas9-Systems ist die Möglichkeit nicht nur gezielt einzelne Gene, sondern eine Vielzahl an Genen mittels eines einzigen Experimentes zu deletieren. Neben diesen *Loss of function*-Mutationen ermöglicht das CRISPR-Cas9 System ebenfalls das zielgerichtete Einbringen von neuen Genen in das Genom.

Beide Möglichkeiten eröffnen vielfältige Anwendungen für die weitere Forschung. So können Deletionen dazu genutzt werden, Peptidase-defizitäre Stämme herzustellen, die eine erleichterte Proteinisolierung erlauben, sowie die Ausbeuten von extrazellulärem Protein zu erhöhen.

Auf der anderen Seiten könnte der zielgerichtete Einbau von neuen Genen in das Genom der Basidiomycota eine Vielzahl von neuen Experimenten erlauben. Während die Möglichkeit einer stabilen Integration von heterologen Genen zur Etablierung eines Expressionssystems sicherlich erforscht werden könnte, wäre auch die gezielte Induktion verschiedenster Stoffwechselwege zur Produktion von Sekundärmetaboliten extrem nützlich. Hierdurch könnten neue Naturstoffe identifiziert bzw. deren Synthese näher charakterisiert werden.

Um diese Ziele zu erreichen, war der erste Schritt das System in einem Basidiomyceten zu etablieren und anschließend die gewonnenen Erkenntnisse auf andere Organismen zu übertragen. Erste Deletionsversuche konnten bereits erfolgreich in *Ustilago maydis* durchgeführt werden, sodass die nachfolgenden Arbeiten das Einbringen von neuen Genen zum Ziel hätten.

## 10. Establishing the CRISPR-Cas9 system for the use of Basidiomycota

### 10.1. Introduction

The clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) system was originally identified as a bacterial immune system and later found to exist in a variety of bacteria and archaea [241]. The most commonly used CRISPR system is based on two parts: Firstly the protein Cas9 (CRISPR associated-protein) which consists of a DNA binding and recognition domain as well as an effector domain that enables a double strand cleavage [242]. The second part is a guide RNA which consisted originally of a crRNA (CRISPR RNA) that determines the specificity, and a tracrRNA (trans-activating crRNA) needed for the Cas9 recognition. Both parts can be fused together to a sgRNA (single guide RNA) for more efficient handling [243]. The target of the system is determined by the 20 nucleotide long sequence of the protospacer which is a part of the sgRNA and not by a protein sequence as in meganucleases or TALENs (Transcription activator-like effector nuclease) [242]. The only limitation of the system is the necessity of a PAM (protospacer adjacent motif), defined by nucleotides next to the protospacer. This PAM sequence is specific for the used Cas9 enzyme. The Cas9 enzyme from *Streptococcus pyogenes* is only active with a NGG – nucleotide motif and less active with NAG, while Cas9 from *Staphylococcus aureus* needs NNGRRT as its PAM sequence [244]. Besides of choosing another Cas9 enzyme, it is also possible to engineer the enzyme for altering the needed PAM sequence [245].

The mutagenic effect of the CRISPR-Cas9 system is based on the host organism repair mechanism by repairing double strand breaks in the DNA strands. In most cases, this is done by the error prone non homology end joining (NHEJ) that can cause nearly random insertion and deletion mutations [246], or seldom by high fidelity homology-directed repair (HDR) systems [247]. While the first system is exploited to generate knock-out mutants, the second is used for the specific integration of genes into the genome.

Filamentous fungi possess a broad range of secondary metabolites that are not expressed under culture conditions, making them unavailable for further studies [248]. This problem can be overcome by the targeted replacement of promoters regulating the expression of global transcriptional activators of whole secondary metabolite pathways [249]. Using the CRISPR system a promoter replacement can be done in a very quick and highly specific way [250], making this system an ideal tool for the identification and production of so far unknown secondary metabolites. Nevertheless, to date only five different basidiomycotic organisms were used as a host for CRISPR-Cas9 experiments, showing the necessity of further work [251].

## 10.2. Methods

### 10.2.1. Chemicals and materials

All chemicals used were obtained from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany), Merck (Darmstadt, Germany) and Carl Roth (Karlsruhe, Germany). The enzymes were from Thermo Scientific (Braunschweig, Germany), unless otherwise stated. PCR primers were obtained from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

### 10.2.2. Strains and culture conditions

Cultivation of the *E. coli* strain TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany), used for vector propagation and isolation, took place in Luria-Bertani broth (LB, Carl Roth) supplemented with 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ampicillin. *U. maydis* was cultivated in YEPD (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % dextrose) or in standard nutrient liquid medium (SNL) as previously described [19].

### 10.2.3. Vector construction

Two different vector systems were tested for the use in *U. maydis*. The first system was a native *U. maydis* based vector system (pMS8) providing a U6 promotor from *U. maydis* [252], while the second system used the *gdpA* promotor [253]. The plasmids were built with PCR products with overlapping ends and a linearized form of pMS8 using the NEBuilder HIFI DNA assembly Kit. The PCR was performed as described previously [254].

Table 10.1: Overview of the tested constructs

Name of the Construct	Protospacer sequence	Type of Promotor	Primer used
pCBH95	GTGGCCTCTGTGAGTGCAAG	<i>gdpA</i>	17.32+17.33/17.28+17.35
pCBH96	GGAAAGTCGCAACACATTGA	U6	16.56+17.34
pCBH98	GTGGCCTCTGTGAGTGCAAG	U6	16.56+17.42
pCBH99	GGAAAGTCGCAACACATTGA	<i>gdpA</i>	17.32+17.44/17.28+17.43

First, the vector pMS8 was linearized using HindIII and KpnI to delete the native U6 promotor and terminator to create the plasmids pCBH95 and pCBH99. Then, two separate PCRs were performed to prepare the *gdpA* promotor from *Aspergillus* and the complete gRNA including the *trpC* terminator using the primer mentioned in Table 10.2 and vector pFC334 as template. For pCBH96 and pCBH98 the plasmid pMS8 was linearized with KpnI and only one PCR was necessary to fuse the leader sequence to the gRNA. All fragments were ligated using the NEBuilder HIFI DNA assembly Kit following the manufactures instruction after purification using the innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena, Germany). The design of the protospacer was performed using the software E-CRISP [255].

Table 10.2: Primer used for the plasmid creation and sequencing

Primername	Sequence
16.056 pMS8_gRNA_rev	GTCGAGCTCGGTACGGGTACTAATGCCAACTTTGTACAAGAAA GCTGGGTCTAGAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC
17.28 gRNA_HDV_term	GTCGAGCTCGGTACGGGTACTGAGCCAAGAGCGGATTCCTCAG TCT
17.32 PgpdA_for	CAGCTATGACCATGATTACGCCACGTAAGCTCCCTAATTGGC
17.33 PgpdA_ADE2_rev	TCACGGACTCATCAGGTGGCCGGTGATGTCTGCTCAAGCG
17.34 Uma_ADE2_for2	CAAAATTCCATTCTACAACGGGAAAGTCGCAACACATTGAGTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTT
17.35 ADE2_proto_gRNA_for2	GCCACCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTTCG TGGCCTCTGTGAGTGCAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC CAAAATTCCATTCTACAACGTGGCCTCTGTGAGTGCAAGGTTTT
17.42 ADE2_proto_gRNA_for3	AGAGCTAGAAATAGCAAGTT CTTCCCTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGAGTAAGCTCGTC
17.43 ade2_proto_gRNA_for4	GGAAAGTCGCAACACATTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
17.44 pgpdA_Ade2_rev2	TCACGGACTCATCAGGGAAAGCCGGTGATGTCTGCTCAAGCG
16.059 pMS8_seq_for	TCACAGTCACGAGTCCATGAGC
16.060 pMS8_seq_rev	GTGAAAGTCGAGCTCGGTACTCG
17.06 Uma_ADE2_seq_f1	CACCTTGCAACGTCGGTTCG
17.07 Uma_ADE2_seq_r1	GATCGGACGACATAGTTGCC
17.29 Uma_ADE2_seq_f2	ACTCCATTAGCCGTCTCCCG

The plasmids were transformed into *E. coli* TOP10 for vector propagation using a standard protocol [160], isolated using the innuPREP Plasmid Mini Kit (Analytik Jena) and sequenced for verification by SeqLab (Göttingen, Germany).

#### 10.2.4. *U. maydis* transformation protocol

The procedure combines protocols described previously [256,257]. For transformation, *U. maydis* cells were inoculated in Erlenmeyer flasks (40 mL YEPD, 250 ml) and were incubated overnight until OD<sub>600</sub> of 1-1.2 was reached. For that, an Erlenmeyer flasks (40 mL YEPD, 250 ml) was inoculated with the required amount of cells which was calculated using a division rate of two hours and a lag phase of two hours. The cells were harvested by centrifugation (8 min, 1100 x g, 20 °C), resuspended in 20 mL freshly prepared 5 mM EDTA pH 8.0 / 25 mM 2-mercaptoethanol, shaken for 20 min at RT, harvested again and resuspended in 10 mL SCS (20 mM sodium citrate pH 5.8, 1 M sorbitol) containing 15 mg/ mL lysing enzyme from *Trichoderma harzianum*. The spheroblast formation which needed about 45 min was monitored using a phase-contrast microscope. Afterwards the cells were harvested (200 x g, 10 min, RT), washed twice with STC (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 M sorbitol), resuspended and diluted to a final OD<sub>600</sub> of 5.0 using STC.

The spheroblast solution (200 µL) was mixed with plasmid DNA (1 µg), 2-mercaptoethanol (2 µL), PEG 3350 (50 µL, 66 % (w/v) in 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris-HCl pH 7.5) and was

incubated (20 min, RT). Afterwards the solution was combined with 2.5 mL PEG 3350 (66 % (w/v) in 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris-HCl pH 7.5) by adding first one drop, then 0.5 mL and finally the remainder of the solution. After a subsequent incubation (15 min, RT) the solution was combined with 35 mL of STC by first adding 1 mL, then 5 mL followed by the remainder of the solution. The cells were harvested (200 x g, 10 min, RT), resuspended in 200 µL of YEPSS (1 % yeast extract, 2 % peptone, 2 % sucrose, 1 M sorbitol) and regenerated for 3 h at 28 °C before plating on freshly prepared double layer selective plates. These consisted of a 12 mL YEPSS bottom layer containing 2 µg /mL carboxin and a top layer without carboxin. The cells were grown at 28 °C for 3-4 days.

#### 10.2.5. Evaluation of the mutation rate

From each transformed construct 100 colonies were transferred onto a masterplate (YEPD) for replica plating. Since deletions in the *ade2* gene creates an auxotrophy, successfully mutated cells should not grow on adenine deficient plates. Therefore the cells were replica plated onto minimal plates (1.34 % yeast nitrogen base, 100 mM potassium phosphate, pH 6.0, 4 x 10<sup>-5</sup> % biotin, 2 % glucose) lacking adenine or on adenine containing minimal plates [258].

Afterwards the DNA of the cells which showed abnormal growth or no growth at all was isolated using a phenol chloroform based method and the ADE2 gene was amplified via PCR using the primer 17.06 and 17.29 and subsequently sequenced using the same primer.

### 10.3. Results and discussion

With the help of the software E-CRISP possible sites for a CRISPR mediated gene deletion in the gene ADE2 were identified, and two of them were chosen as targets. The gene ADE2 codes for a phosphoribosylaminoimidazole carboxylase which catalyses the sixth step of the *de novo* biosynthesis of purine nucleotides. Therefore the deletion of the genes leads to an auxotrophy which can easily be screened for. Additionally, the deletion causes an accumulation of red purine precursors in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* [259] as well as in *Cryptococcus neoformans* [260] which leads to the colorization of the whole colony. Although not tested yet, it was believed that *U. maydis* should react in the same way.

Both protospacer sequences were successfully cloned in combination with the two different systems for gRNA synthesis. The first system originally developed for the use in *U. maydis* was chosen to assay the method for *U. maydis* transformation and protospacer design in general. It uses a polymerase III promotor for the translation of uncapped and unprocessed RNA as gRNA [252]. The use of this system provided a high chance for successfully establishing the CRISPR mediated gene deletion system in a basidiomycete. In addition, the second system was chosen because of the fact that it was successfully tested with a range of *Aspergillus* strains [253]. It used the polymerase II promotor *gpdA* and a loop based system for the processing of the RNA, by adding a ribosomal hammerhead structure at the 5' position and a HDV ribozyme at the 3' position of the gRNA sequence [253]. The principal advantage of this system over the first one is based on the different nature of the used promotor sequences. While polymerase III promoters are not well conserved in fungi and therefore have a low chance of being compatible to other organism, this is not the case of polymerase II promoters [252]. Based on this fact, a development of a system that can be used in several different Basidiomycota strains should include a polymerase II promotor to increase the compatibility. Nevertheless, polymerase II promoters have the disadvantage that the RNA is modified with poly A-tails or cap structures which have to be removed for successful gRNA formation [261]. To overcome this problem an addition of self-splicing elements was performed in the past in yeasts [262] or in mammalian cells [263].

The transformation of all four designed constructs into the *U. maydis* cells was successful resulting in 100-200 transformants each. To test for successful deletion of the ADE2 gene, a masterplate was created using 100 transformants and replica plated on adenine minimal plates and adenine deficient plates. For the two constructs using the polymerase III promotor (pCBH96, pCBH98) twelve respectively seven colonies were identified which did not grow on the adenine deficient plates and showed a slower growth rate on the adenine minimal media

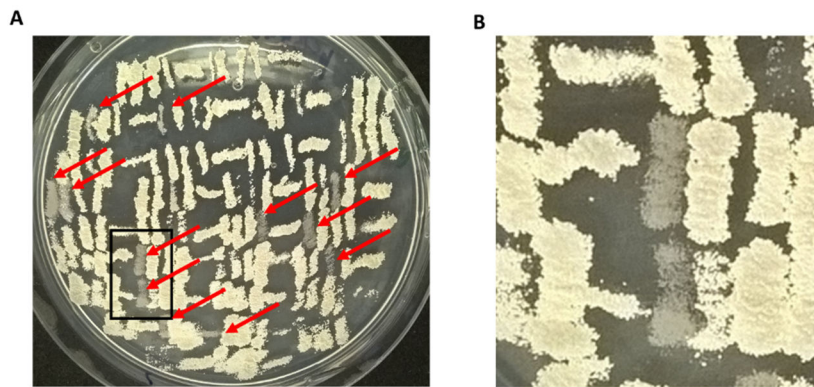


Figure 10.1: *U. maydis* containing the plasmid pCBH96 replica plated on adenine minimal media. A) Overview of the agarplate B) zoom on two *ade2*- colonies showing a weaker growth rate.

plates as can be seen in Fig. 10.1. For the plasmids pCBH95 and pCBH99 no *ade2*<sup>-</sup> colony was identified, which was most likely caused by a lack of gRNA splicing or a low performance of the used promoter.

From the twelve putative *ade2* mutants created with the plasmid pCBH96 six clones were sequenced to verify the directed mutation at the used protospacer site. The same was done with four out of the seven clones created with pCBH98. All sequencing reactions confirmed mutations in the ADE2 gene directly at or adjacent to the used protospacer. The obtained type of mutation ranged from a single nucleotide insertion creating a stop codon to a 437 bp long deletion. Thus, both designed protospacers were able to induce CRISPR mediated mutations, but differed in their efficiency.

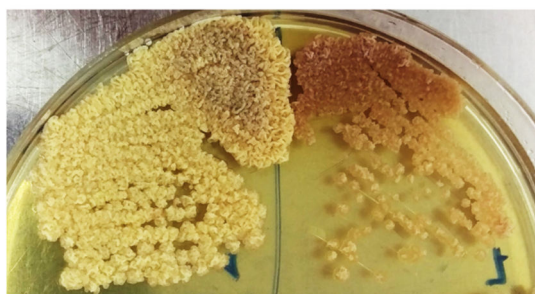


Figure 10.2 Comparison of an *ade2*- mutant with a wild type colony: Left = wild type *U. maydis*. Right = *U. maydis* with deleted ADE2 gene.

A cultivation on YEPD media plates led to a strong red colorization after an incubation of 96 h (Fig. 10.2), which is a contrast to a cultivation on adenine minimal plates where no colour was observed (Fig. 10.1). The amount of cell material transferred during replica plating was very low, therefore the amount of cells that produce the colour probably was not enough to clearly distinguish them from

the non-coloured colonies. Nevertheless, the change of colour for adenine deficient strains was achieved after an extended time of growth.

#### **10.4. Conclusion**

The gene ADE2 was targeted using the CRISPR-Cas9 system due to its easy distinguishable phenotype. Both tested protospacers were able to induce mutations using a polymerase III promotor, while the system with the polymerase II promotor was not successful. The main aim of introducing a CRISPR-Cas9 mediated system to induce mutations was successfully applied to *U. maydis*. More research should be done for a polymerase II promotor based system due to its better compatibility between different organisms. The next step would be the CRISPR mediated replacement of genes or promotors to fully establish this system with the used basidiomycetes, creating a variety of possibilities to research secondary metabolites.



## 11. Literaturverzeichnis

- 1 Wagner, G. (2010) *Waschmittel*. Chemie, Umwelt, Nachhaltigkeit, Wiley-VCH, Weinheim
- 2 Henkel AG & Co. KGaA (2006) Henkel - 100 Years of Persil. An overview of the history of Germany's No. 1 laundry detergent. <http://web.archive.org/web/20101214101029/http://www.henkel.com/about-henkel/2006-18539-100-years-of-persil-11029.htm>
- 3 Jardak, K., Drogui, P. and Daghrir, R. (2016) Surfactants in aquatic and terrestrial environment. Occurrence, behavior, and treatment processes. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **23**, 3195–3216
- 4 Müller-Schiedmayer, G. D. and Aigner, R. (1979) Verfahren zur Herstellung von N,N,N',N'-Tetraacetyl-ethylendiamin, Google Patents. <https://www.google.com/patents/EP0004919A1?cl=de>
- 5 Aehle, W. (2007) *Enzymes in industry. Production and applications*, Wiley-VCH; John Wiley [distributor], Weinheim, Chichester
- 6 Reynolds, C. S. and Davies, P. S. (2001) Sources and bioavailability of phosphorus fractions in freshwaters: a British perspective. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **76**, 27–64
- 7 Gassmann, M. (2016) Wassersparen: Die Gefahr sparsamer Waschmaschinen - WELT. <https://www.welt.de/wirtschaft/article152318777/Die-verkannte-Gefahr-der-supersparsamen-Waschmaschine.html>
- 8 Rüdener, I., Eberle, U. and Griebhammer, R. (2006) Ökobilanz und Lebenszykluskostenrechnung Wäschewaschen. <https://www.oeko.de/oekodoc/289/2006-008-de.pdf>
- 9 (2017) P&G. Nachhaltigkeit bei den P&G Marken. <http://de.pg.com/de-DE/nachhaltigkeitsstrategie/okologische-nachhaltigkeit/nachhaltigkeit-bei-den-pg-marken>
- 10 van Ee, J. H., Misset, O. and Baas, E. J. (1997) *Enzymes in detergency*, Marcel Dekker, New York
- 11 Jurado, E., García-Román, M., Luzón, G., Altmajer-Vaz, D. and Jiménez-Pérez, J. L. (2011) Optimization of Lipase Performance in Detergent Formulations for Hard Surfaces. *Ind. Eng. Chem. Res.* **50**, 11502–11510
- 12 Ahuja, S. K., Ferreira, G. M. and Moreira, A. R. (2004) Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **24**, 125–154

- 13 Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 235–251
- 14 Silva, C., Azoia, N. G., Martins, M., Matamá, T., Wu, J. and Cavaco-Paulo, A. (2012) Molecular recognition of esterase plays a major role on the removal of fatty soils during detergency. *J. Biotechnol.* **161**, 228–234
- 15 Singh, R., Kumar, M., Mittal, A. and Mehta, P. K. (2016) Microbial enzymes. *Industrial progress in 21st century. 3 Biotech* **6**, 174
- 16 Niyonzima, F. N. and More, S. S. (2014) Detergent-compatible bacterial amylases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 1215–1232
- 17 Porter, J. L., Rusli, R. A. and Ollis, D. L. (2016) Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *Chembiochem* **17**, 197–203
- 18 Vojcic, L., Pitzler, C., Körfer, G., Jakob, F., Ronny, M., Maurer, K.-H. and Schwaneberg, U. (2015) Advances in protease engineering for laundry detergents. *N. Biotechnol.* **32**, 629–634
- 19 Leonhardt, R.-H., Krings, U., Berger, R. G. and Linke, D. (2016) Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 845–853
- 20 Blackwell, M. (2011) The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* **98**, 426–438
- 21 Schmidt-Dannert, C. (2016) Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **31**, 40–49
- 22 Grigoriev, I. V., Cullen, D., Goodwin, S. B., Hibbett, D., Jeffries, T. W., Kubicek, C. P., Kuske, C., Magnuson, J. K., Martin, F. and Spatafora, J. W. et al. (2011) Fueling the future with fungal genomics. *Mycology* **2**, 192–209
- 23 Grigoriev, I. V., Nikitin, R., Haridas, S., Kuo, A., Ohm, R., Otilar, R., Riley, R., Salamov, A., Zhao, X. and Korzeniewski, F. et al. (2014) MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* **42**, D699-704
- 24 Rytioja, J., Hildén, K., Yuzon, J., Hatakka, A., Vries, R. P. de and Mäkelä, M. R. (2014) Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**, 614–649
- 25 Gilbertson, R. L. (1980) Wood-Rotting Fungi of North America. *Mycologia* **72**, 1
- 26 Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., Martínez, A. T., Otilar, R., Spatafora, J. W. and Yadav, J. S. et al. (2012) The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science* **336**, 1715–1719

- 27 B Fisher, A. and S Fong, S. (2014) Lignin biodegradation and industrial implications. *AIMS Bioeng.* **1**, 92–112
- 28 Sharma, A., Tewari, R., Rana, S. S., Soni, R. and Soni, S. K. (2016) Cellulases. Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **179**, 1346–1380
- 29 Schmidt-Dannert, C. (2015) Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **148**, 19–61
- 30 Gonzalo, G. de, Colpa, D. I., Habib, M. H. M. and Fraaije, M. W. (2016) Bacterial enzymes involved in lignin degradation. *J. Biotechnol.* **236**, 110–119
- 31 Valdivia, M., Galan, J. L., Laffarga, J. and Ramos, J.-L. (2016) Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. *Microb. Biotechnol.* **9**, 585–594
- 32 Martínková, L., Kotik, M., Marková, E. and Homolka, L. (2016) Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases. A review. *Chemosphere* **149**, 373–382
- 33 Linke, D., Leonhardt, R., Eisele, N., Petersen, L. M., Riemer, S., Nimtz, M. and Berger, R. G. (2015) Carotene-degrading activities from *Bjerkandera adusta* possess an application in detergent industries. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **38**, 1191–1199
- 34 Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., Mohamed, A. A., Thangavel, P., Devi, G. D. and Vasudhevan, P. et al. (2016) Catalase and ascorbate peroxidase-representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **23**, 19002–19029
- 35 Ledgerwood, E. C., Marshall, J. W.A. and Weijman, J. F. (2017) The role of peroxiredoxin 1 in redox sensing and transducing. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 60–67
- 36 Barrasa, J. M., Ruiz-Dueñas, F. J., Fernández-Fueyo, E., Pacheco, R. and Martínez, A. T. (2016) Lignin biodegradation in the genomic era. *Proc. LignioBiotech-4*
- 37 Welinder, K. G., Mauro, J. M. and Nørskov-Lauritsen, L. (1992) Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 337–340
- 38 Kim, S. J. and Shoda, M. (1999) Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1029–1035
- 39 van Bloois, E., Torres Pazmiño, D. E., Winter, R. T. and Fraaije, M. W. (2010) A robust and extracellular heme-containing peroxidase from *Thermobifida fusca* as prototype of a bacterial peroxidase superfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 1419–1430

- 40 Colpa, D. I., Fraaije, M. W. and van Bloois, E. (2014) DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 1–7
- 41 Yoshida, T. and Sugano, Y. (2015) A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family. *Arch. Biochem. Biophys.* **574**, 49–55
- 42 Sugano, Y. (2009) DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1387–1403
- 43 Sugano, Y., Nakano, R., Sasaki, K. and Shoda, M. (2000) Efficient heterologous expression in *Aspergillus oryzae* of a unique dye-decolorizing peroxidase, DyP, of *Geotrichum candidum* Dec 1. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1754–1758
- 44 Linde, D., Ruiz-Dueñas, F. J., Fernández-Fueyo, E., Guallar, V., Hammel, K. E., Pogni, R. and Martínez, A. T. (2015) Basidiomycete DyPs: Genomic diversity, structural-functional aspects, reaction mechanism and environmental significance. *Arch. Biochem. Biophys.* **574**, 66–74
- 45 Veitch, N. C. (2004) Horseradish peroxidase. A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249–259
- 46 Zamocky, M., Jakopitsch, C., Furtmüller, P. G., Dunand, C. and Obinger, C. (2008) The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins* **72**, 589–605
- 47 Sugano, Y., Muramatsu, R., Ichiyanagi, A., Sato, T. and Shoda, M. (2007) DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family: ASP171 replaces the distal histidine of classical peroxidases. *J. Biol. Chem.* **282**, 36652–36658
- 48 Liu, X., Du, Q., Wang, Z., Zhu, D., Huang, Y., Li, N., Wei, T., Xu, S. and Gu, L. (2011) Crystal structure and biochemical features of EfeB/YcdB from *Escherichia coli* O157. ASP235 plays divergent roles in different enzyme-catalyzed processes. *J. Biol. Chem.* **286**, 14922–14931
- 49 Yoshida, T., Tsuge, H., Konno, H., Hisabori, T. and Sugano, Y. (2011) The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. *FEBS J.* **278**, 2387–2394
- 50 Strittmatter, E., Liers, C., Ullrich, R., Wachter, S., Hofrichter, M., Plattner, D. A. and Piontek, K. (2013) First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase. Substrate interaction sites and long-range electron transfer. *J. Biol. Chem.* **288**, 4095–4102

- 51 Fernández-Fueyo, E., Linde, D., Almendral, D., López-Lucendo, M. F., Ruiz-Dueñas, F. J. and Martínez, A. T. (2015) Description of the first fungal dye-decolorizing peroxidase oxidizing manganese(II). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1–16
- 52 Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R. and Hofrichter, M. (2010) DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1869–1879
- 53 Ruiz-Dueñas, F. J., Fernández, E., Martínez, M. J. and Martínez, A. T. (2011) *Pleurotus ostreatus* heme peroxidases: an in silico analysis from the genome sequence to the enzyme molecular structure. *C. R. Biol.* **334**, 795–805
- 54 Yu, W., Liu, W., Huang, H., Zheng, F., Wang, X., Wu, Y., Li, K., Xie, X. and Jin, Y. (2014) Application of a novel alkali-tolerant thermostable DyP-type peroxidase from *Saccharomonospora viridis* DSM 43017 in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *PLoS ONE* **9**, e110319
- 55 Scheibner, M., Hülsdau, B., Zelena, K., Nimtz, M., Boer, L. de, Berger, R. G. and Zorn, H. (2008) Novel peroxidases of *Marasmius scorodonius* degrade beta-carotene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 1241–1250
- 56 Szweda, R. T., Schmidt, K. and Zorn, H. (2013) Bleaching of colored whey and milk by a multiple-enzyme system. *Eur. Food Res. Technol.* **237**, 377–384
- 57 Lee, S.-K., George, S. D., Antholine, W. E., Hedman, B., Hodgson, K. O. and Solomon, E. I. (2002) Nature of the Intermediate Formed in the Reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O at the Trinuclear Copper Cluster Active Site in Native Laccase. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6180–6193
- 58 Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. and Sannia, G. (2010) Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 369–385
- 59 Yoshida, H. (1883) LXIII.-Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *J. Chem. Soc.* **43**, 472–486
- 60 Sharma, P., Goel, R. and Capalash, N. (2007) Bacterial laccases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 823–832
- 61 Roberts, S. A., Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J. T., Tollin, G., Rensing, C. and Montfort, W. R. (2002) Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2766–2771

- 62 Dittmer, N. T., Suderman, R. J., Jiang, H., Zhu, Y.-C., Gorman, M. J., Kramer, K. J. and Kanost, M. R. (2004) Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 29–41
- 63 Sato, Y., Wuli, B., Sederoff, R. and Whetten, R. (2001) Molecular Cloning and Expression of Eight Laccase cDNAs in Loblolly Pine (*Pinus taeda*)\*. *J. Plant. Res.* **114**, 147–155
- 64 Heinzkill, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P. and Anke, T. (1998) Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1601–1606
- 65 Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R. and Kües, U. (2006) Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.* **273**, 2308–2326
- 66 Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R. D. and Pleiss, J. (2011) The Laccase Engineering Database. A classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. *Database (Oxford)* **2011**, bar006
- 67 Kumar, S. V. S., Phale, P. S., Durani, S. and Wangikar, P. P. (2003) Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 386–394
- 68 Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V. and Yaropolov, A. I. (2007) “Blue” laccases. *Biochemistry Mosc.* **72**, 1136–1150
- 69 Komori, H. and Higuchi, Y. (2015) Structural insights into the O<sub>2</sub> reduction mechanism of multicopper oxidase. *J. Biochem.* **158**, 293–298
- 70 Sakurai, T. and Kataoka, K. (2007) Structure and function of type I copper in multicopper oxidases. *Cell Mol. Life Sci.* **64**, 2642–2656
- 71 Larrondo, L. F., Salas, L., Melo, F., Vicuna, R. and Cullen, D. (2003) A Novel Extracellular Multicopper Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with Ferroxidase Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6257–6263
- 72 Mate, D. M. and Alcalde, M. (2015) Laccase engineering. From rational design to directed evolution. *Biotechnol. Adv.* **33**, 25–40
- 73 Mate, D. M. and Alcalde, M. (2016) Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microb. Biotechnol.*
- 74 Rodgers, C. J., Blanford, C. F., Giddens, S. R., Skamnioti, P., Armstrong, F. A. and Gurr, S. J. (2010) Designer laccases. A vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends Biotechnol.* **28**, 63–72

- 75 Riva, S. (2006) Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **24**, 219–226
- 76 Call, H. P. and Mücke, I. (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *J. Biotechnol.* **53**, 163–202
- 77 Pezzella, C., Guarino, L. and Piscitelli, A. (2015) How to enjoy laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 923–940
- 78 Wang, B., Yan, Y., Tian, Y., Zhao, W., Li, Z., Gao, J., Peng, R. and Yao, Q. (2016) Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **32**
- 79 Rodríguez Couto, S. and Toca Herrera, J. L. (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.* **24**, 500–513
- 80 Tzanov, T., Basto, C., Gübitz, G. M. and Cavaco-Paulo, A. (2003) Laccases to Improve the Whiteness in a Conventional Bleaching of Cotton. *Macromol. Mater. Eng.* **288**, 807–810
- 81 Jiang, F., Kongsaree, P., Charron, R., Lajoie, C., Xu, H., Scott, G. and Kelly, C. (2008) Production and separation of manganese peroxidase from heme amended yeast cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 540–549
- 82 Ketudat Cairns, J. R. and Esen, A. (2010) beta-Glucosidases. *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 3389–3405
- 83 Singh, G., Verma, A. K. and Kumar, V. (2016) Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. *3 Biotech* **6**
- 84 Ketudat Cairns, J. R., Mahong, B., Baiya, S. and Jeon, J.-S. (2015)  $\beta$ -Glucosidases. Multitasking, moonlighting or simply misunderstood? *Plant Sci.* **241**, 246–259
- 85 Manavalan, T., Manavalan, A. and Heese, K. (2015) Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Curr. Microbiol.* **70**, 485–498
- 86 Baldrian, P. and Valaskova, V. (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 501–521
- 87 Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280 ( Pt 2)**, 309–316
- 88 Henrissat, B. and Davies, G. (1997) Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637–644

- 89 Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233-8
- 90 Sengupta, S., Ghosh, A. K. and Sengupta, S. (1991) Purification and characterisation of a  $\beta$ -glucosidase (cellobiase) from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1076**, 215–220
- 91 Bhatia, Y., Mishra, S. and Bisaria, V. S. (2002) Microbial beta-glucosidases. Cloning, properties, and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**, 375–407
- 92 Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W. P., Bevan, D. R., Henrissat, B. and Esen, A. (2001) Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) beta-glucosidase and a model of its complex with p-nitrophenyl beta-D-thioglucoside. *Biochem. J.* **354**, 37–46
- 93 Varghese, J. N., Hrmova, M. and Fincher, G. B. (1999) Three-dimensional structure of a barley  $\beta$ -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure* **7**, 179–190
- 94 Pozzo, T., Pasten, J. L., Karlsson, E. N. and Logan, D. T. (2010) Structural and functional analyses of beta-glucosidase 3B from *Thermotoga neapolitana*. A thermostable three-domain representative of glycoside hydrolase 3. *J. Mol. Biol.* **397**, 724–739
- 95 Agirre, J., Ariza, A., Offen, W. A., Turkenburg, J. P., Roberts, S. M., McNicholas, S., Harris, P. V., McBrayer, B., Dohnalek, J. and Cowtan, K. D. et al. (2016) Three-dimensional structures of two heavily N-glycosylated *Aspergillus* sp. family GH3  $\beta$ -D-glucosidases. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **72**, 254–265
- 96 Davies, G. and Henrissat, B. (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**, 853–859
- 97 Suzuki, K., Sumitani, J.-i., Nam, Y.-W., Nishimaki, T., Tani, S., Wakagi, T., Kawaguchi, T. and Fushinobu, S. (2013) Crystal structures of glycoside hydrolase family 3  $\beta$ -glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*. *Biochem. J.* **452**, 211–221
- 98 Litzinger, S., Fischer, S., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W. and Mayer, C. (2010) Structural and kinetic analysis of *Bacillus subtilis* N-acetylglucosaminidase reveals a unique Asp-His dyad mechanism. *J. Biol. Chem.* **285**, 35675–35684
- 99 Davies, G. J., Wilson, K. S. and Henrissat, B. (1997) Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **321**, 557–559
- 100 Chuenchor, W., Pengthaisong, S., Robinson, R. C., Yuvaniyama, J., Oonanant, W., Bevan, D. R., Esen, A., Chen, C.-J., Opassiri, R. and Svasti, J. et al. (2008) Structural insights into



- rice BGlu1 beta-glucosidase oligosaccharide hydrolysis and transglycosylation. *J. Mol. Biol.* **377**, 1200–1215
- 101 Verdoucq, L., Czjzek, M., Moriniere, J., Bevan, D. R. and Esen, A. (2003) Mutational and structural analysis of aglycone specificity in maize and sorghum beta-glucosidases. *J. Biol. Chem.* **278**, 25055–25062
- 102 Sorensen, A., Lubeck, M., Lubeck, P. S. and Ahring, B. K. (2013) Fungal Beta-glucosidases. A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules* **3**, 612–631
- 103 Fan, G., Xu, Y., Zhang, X., Lei, S., Yang, S. and Pan, S. (2011) Characteristics of immobilised  $\beta$ -glucosidase and its effect on bound volatile compounds in orange juice. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 2312–2320
- 104 Keerti, Gupta, A., Kumar, V., Dubey, A. and Verma, A. K. (2014) Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable  $\beta$ -Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice. *ISRN Biochem.* **2014**, 178498
- 105 Schröder, C., Elleuche, S., Blank, S. and Antranikian, G. (2014) Characterization of a heat-active archaeal  $\beta$ -glucosidase from a hydrothermal spring metagenome. *Enzyme Microb. Technol.* **57**, 48–54
- 106 Barbagallo, R. N., Palmeri, R., Fabiano, S., Rapisarda, P. and Spagna, G. (2007) Characteristic of  $\beta$ -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 570–575
- 107 Clifford, M. N. (2000) Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1063–1072
- 108 Oren-Shamir, M. (2009) Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Sci.* **177**, 310–316
- 109 Rosano, G. L. and Ceccarelli, E. A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 172
- 110 Gupta, S. K. and Shukla, P. (2016) Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria. Perspectives and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1089–1098
- 111 Gopal, G. J. and Kumar, A. (2013) Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J.* **32**, 419–425
- 112 Kosobokova, E. N., Skrypnik, K. A. and Kosorukov, V. S. (2016) Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins. *Biochemistry Mosc.* **81**, 187–200

- 113 Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production. From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 211–222
- 114 Francis, D. M. and Page, R. (2010) Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Chapter 5**, Unit 5.24.1-29
- 115 Catherine, C., Lee, K.-H., Oh, S.-J. and Kim, D.-M. (2013) Cell-free platforms for flexible expression and screening of enzymes. *Biotechnol. Adv.* **31**, 797–803
- 116 Harbers, M. (2014) Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Lett.* **588**, 2762–2773
- 117 Sahdev, S., Khattar, S. K. and Saini, K. S. (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems. A review of the existing biotechnology strategies. *Mol. Cell. Biochem.* **307**, 249–264
- 118 Porro, D., Gasser, B., Fossati, T., Maurer, M., Branduardi, P., Sauer, M. and Mattanovich, D. (2011) Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 939–948
- 119 Jemli, S., Ayadi-Zouari, D., Hlima, H. B. and Bejar, S. (2016) Biocatalysts. Application and engineering for industrial purposes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 246–258
- 120 Fernández, F. J. and Vega, M. C. (2013) Technologies to keep an eye on. Alternative hosts for protein production in structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 365–373
- 121 Spohner, S. C., Müller, H., Quitmann, H. and Czermak, P. (2015) Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **202**, 118–134
- 122 Shulman, S. T., Friedmann, H. C. and Sims, R. H. (2007) Theodor Escherich. The first pediatric infectious diseases physician? *Clin. Infect. Dis.* **45**, 1025–1029
- 123 Blount, Z. D. (2015) The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife* **4**
- 124 Tomas, J., Reygnier, J., Mayeur, C., Ducroc, R., Bouet, S., Bridonneau, C., Cavin, J.-B., Thomas, M., Langella, P. and Cherbuy, C. (2015) Early colonizing *Escherichia coli* elicits remodeling of rat colonic epithelium shifting toward a new homeostatic state. *ISME J.* **9**, 46–58
- 125 Nascimento, H. H., Silva, L. E. P., Souza, R. T., Silva, N. P. and Scaletsky, I. C. A. (2014) Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains. *BMC Microbiol.* **14**, 184
- 126 Lukjancenko, O., Wassenaar, T. M. and Ussery, D. W. (2010) Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb. Ecol.* **60**, 708–720

- 
- 127 Huang, C.-J., Lin, H. and Yang, X. (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 383–399
- 128 Gupta, S. K. and Shukla, P. (2017) Sophisticated Cloning, Fermentation, and Purification Technologies for an Enhanced Therapeutic Protein Production. A Review. *Front. Pharmacol.* **8**, 419
- 129 Evans, T. C. and Xu, M.-Q., eds. (2011) Heterologous gene expression in *E. coli*. Methods and protocols, Humana Press, New York NY
- 130 Kamionka, M. (2011) Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 268–274
- 131 San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P. and Gavidia, I. (2013) Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *Springerplus* **2**, 89
- 132 Schein, C. H. (2004) A cool way to make proteins. *Nat. Biotechnol.* **22**, 826–827
- 133 Marco, A. de (2009) Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **8**, 26
- 134 Valderrama-Rincon, J. D., Fisher, A. C., Merritt, J. H., Fan, Y.-Y., Reading, C. A., Chhiba, K., Heiss, C., Azadi, P., Aebi, M. and DeLisa, M. P. (2012) An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 434–436
- 135 Ogata, K., Nishikawa, H. and Ohsugi, M. (1969) A Yeast Capable of Utilizing Methanol. *Agricultural and Biological Chemistry* **33**, 1519–1520
- 136 Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J. and Higgins, D. R. (2000) Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *MB* **16**, 23–52
- 137 Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y. and Madden, K. R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3376–3385
- 138 Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M. and Gingeras, T. R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1111–1121
- 139 Couderc, R. and Baratti, J. (1980) Oxidation of Methanol by the Yeast, *Pichia pastoris*. Purification and Properties of the Alcohol Oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2279–2289
- 140 Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H. and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*. Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5301–5317

- 141 Schwarzshans, J.-P., Luttermann, T., Geier, M., Kalinowski, J. and Friehs, K. (2017) Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Adv.*
- 142 Damasceno, L. M., Huang, C.-J. and Batt, C. A. (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 31–39
- 143 Kang, Z., Huang, H., Zhang, Y., Du, G. and Chen, J. (2017) Recent advances of molecular toolbox construction expand *Pichia pastoris* in synthetic biology applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 19
- 144 Vogl, T., Thallinger, G. G., Zellnig, G., Drew, D., Cregg, J. M., Glieder, A. and Freigassner, M. (2014) Towards improved membrane protein production in *Pichia pastoris*: general and specific transcriptional response to membrane protein overexpression. *N. Biotechnol.* **31**, 538–552
- 145 Rakestraw, J. A., Sazinsky, S. L., Piatasi, A., Antipov, E. and Wittrup, K. D. (2009) Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 1192–1201
- 146 Lin-Cereghino, G. P., Stark, C. M., Kim, D., Chang, J., Shaheen, N., Poerwanto, H., Agari, K., Moua, P., Low, L. K. and Tran, N. et al. (2013) The effect of  $\alpha$ -mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Gene* **519**, 311–317
- 147 Larsen, S., Weaver, J., Sa Campos, K. de, Bulahan, R., Nguyen, J., Grove, H., Huang, A., Low, L., Tran, N. and Gomez, S. et al. (2013) Mutant strains of *Pichia pastoris* with enhanced secretion of recombinant proteins. *Biotechnol. Lett.* **35**, 1925–1935
- 148 Puxbaum, V., Mattanovich, D. and Gasser, B. (2015) Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2925–2938
- 149 Laukens, B., Visscher, C. de and Callewaert, N. (2015) Engineering yeast for producing human glycoproteins. Where are we now? *Future Microbiol.* **10**, 21–34
- 150 Jacobs, P. P., Inan, M., Festjens, N., Haustraete, J., van Hecke, A., Contreras, R., Meagher, M. M. and Callewaert, N. (2010) Fed-batch fermentation of GM-CSF-producing glycoengineered *Pichia pastoris* under controlled specific growth rate. *Microb. Cell Fact.* **9**, 93
- 151 Hamilton, S. R., Davidson, R. C., Sethuraman, N., Nett, J. H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T. A., Li, H. and Choi, B.-K. et al. (2006) Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* **313**, 1441–1443

- 152 Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., Puxbaum, V., Sauer, M. and Mattanovich, D. (2013) *Pichia pastoris*. Protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiol.* **8**, 191–208
- 153 Liers, C., Pecyna, M. J., Kellner, H., Worrich, A., Zorn, H., Steffen, K. T., Hofrichter, M. and Ullrich, R. (2013) Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5839–5849
- 154 Kaur, A., Van, P. T., Busch, C. R., Robinson, C. K., Pan, M., Pang, W. L., Reiss, D. J., DiRuggiero, J. and Baliga, N. S. (2010) Coordination of frontline defense mechanisms under severe oxidative stress. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 393
- 155 Mitchell, A., Chang, H.-Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G. and Pesseat, S. et al. (2015) The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Res.* **43**, 21
- 156 Zelena, K., Zorn, H., Nimtz, M. and Berger, R. G. (2009) Heterologous expression of the *msp2* gene from *Marasmius scorodoni*. *Arch. Microbiol.* **191**, 397–402
- 157 Linde, D., Coscolín, C., Liers, C., Hofrichter, M., Martínez, A. T. and Ruiz-Dueñas, F. J. (2014) Heterologous expression and physicochemical characterization of a fungal dye-decolorizing peroxidase from *Auricularia auricula-judae*. *Protein Expr. Purif.* **103**, 28–37
- 158 Kang, E. J., Campbell, R. E., Bastian, E. and Drake, M. A. (2010) Invited review: Annatto usage and bleaching in dairy foods. *J. Dairy Sci.* **93**, 3891–3901
- 159 Petersen, T. N., Brunak, S., Heijne, G. von and Nielsen, H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* **8**, 785–786
- 160 Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- 161 Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
- 162 Britton, H. T. S. and Robinson, R. A. (1931) CXCVIII. - Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *J. Chem. Soc.*, 1456
- 163 Lauro, G. J. and Francis, F. J. (2000) *Natural food colorants. Science and technology*, Marcel Dekker, New York
- 164 Zalucki, Y. M., Jones, C. E., Ng, P. S. K., Schulz, B. L. and Jennings, M. P. (2010) Signal sequence non-optimal codons are required for the correct folding of mature maltose binding protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 1244–1249

- 165 Bleve, G., Lezzi, C., Spagnolo, S., Tasco, G., Tufariello, M., Casadio, R., Mita, G., Rampino, P. and Grieco, F. (2013) Role of the C-terminus of *Pleurotus eryngii* Ery4 laccase in determining enzyme structure, catalytic properties and stability. *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 1–13
- 166 Shirano, Y. and Shibata, D. (1990) Low temperature cultivation of *Escherichia coli* carrying a rice lipoxygenase L-2 cDNA produces a soluble and active enzyme at a high level. *FEBS Lett.* **271**, 128–130
- 167 Spadiut, O., Posch, G., Ludwig, R., Haltrich, D. and Peterbauer, C. K. (2010) Evaluation of different expression systems for the heterologous expression of pyranose 2-oxidase from *Trametes multicolor* in *E. coli*. *Microb. Cell Fact.* **9**, 14
- 168 Zelena, K., Krings, U. and Berger, R. G. (2012) Functional expression of a valencene dioxygenase from *Pleurotus sapidus* in *E. coli*. *Bioresour. Technol.* **108**, 231–239
- 169 Leonhardt, R.-H., Plagemann, I., Linke, D., Zelena, K. and Berger, R. G. (2013) Orthologous lipoxygenases of *Pleurotus* spp. – A comparison of substrate specificity and sequence homology. *J. Mol. Catal.* **97**, 189–195
- 170 Mohorcic, M., Bencina, M., Friedrich, J. and Jerala, R. (2009) Expression of soluble versatile peroxidase of *Bjerkandera adusta* in *Escherichia coli*. *Bioresour. Technol.* **100**, 851–858
- 171 Bao, X., Liu, A., Lu, X. and Li, J.-J. (2012) Direct over-expression, characterization and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stability study of active *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1537–1543
- 172 Larrondo, L. F., Lobos, S., Stewart, P., Cullen, D. and Vicuña, R. (2001) Isoenzyme multiplicity and characterization of recombinant manganese peroxidases from *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2070–2075
- 173 Eibes, G. M., Lú-Chau, T. A., Ruiz-Dueñas, F. J., Feijoo, G., Martínez, M. J., Martínez, A. T. and Lema, J. M. (2009) Effect of culture temperature on the heterologous expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Aspergillus* hosts. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **32**, 129–134
- 174 Ramzi, A. B., Hyeon, J. E. and Han, S. O. (2015) Improved catalytic activities of a dye-decolorizing peroxidase (DyP) by overexpression of ALA and heme biosynthesis genes in *Escherichia coli*. *Process. Biochem.* **50**, 1272–1276
- 175 Kuo, W.-H. K. and Chase, H. A. (2011) Exploiting the interactions between poly-histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1075–1084

- 176 Barnicoat, C. R. (1937) 151. The reactions and properties of annatto as a cheese colour, with particular reference to the chemistry of cheese discoloration. *J. Dairy Res.* **8**, 61
- 177 Montenegro, M. A., Rios, A. d. O., Mercadante, A. Z., Nazareno, M. A. and Borsarelli, C. D. (2004) Model studies on the photosensitized isomerization of bixin. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 367–373
- 178 Rios, A. d. O., Borsarelli, C. D. and Mercadante, A. Z. (2005) Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2307–2311
- 179 Lawrence, R. C., Heap, H. A. and Gilles, J. (1984) A controlled approach to cheese technology. *J. Dairy Sci.* **67**, 1632–1645
- 180 Fang, F., Zhang, X.-l., Luo, H.-h., Zhou, J.-j., Gong, Y.-h., Li, W.-j., Shi, Z.-w., He, Q., Wu, Q. and Li, L. et al. (2015) An Intracellular Laccase Is Responsible for Epicatechin-Mediated Anthocyanin Degradation in Litchi Fruit Pericarp. *Plant. Physiol.* **169**, 2391–2408
- 181 Autore, F., Del Vecchio, C., Fraternali, F., Giardina, P., Sannia, G. and Faraco, V. (2009) Molecular determinants of peculiar properties of a *Pleurotus ostreatus* laccase. Analysis by site-directed mutagenesis. *Enzyme Microb. Technol.* **45**, 507–513
- 182 Antořová, Z. and Sychrová, H. (2016) Yeast Hosts for the Production of Recombinant Laccases: A Review. *Mol. Biol. Rep.* **58**, 93–116
- 183 Mayer, A. (2002) Laccase. New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**, 551–565
- 184 Durand, F., Gounel, S. and Mano, N. (2013) Purification and characterization of a new laccase from the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Protein Expr. Purif.* **88**, 61–66
- 185 Gianfreda, L., Xu, F. and Bollag, J.-M. (1999) Laccases. A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Biorem. J.* **3**, 1–26
- 186 Kim, H.-W., Lee, S.-Y., Park, H. and Jeon, S.-J. (2015) Expression, refolding, and characterization of a small laccase from *Thermus thermophilus* HJ6. *Protein Expr. Purif.* **114**, 37–43
- 187 Linke, D., Matthes, R., Nimtz, M., Zorn, H., Bunzel, M. and Berger, R. G. (2013) An esterase from the basidiomycete *Pleurotus sapidus* hydrolyzes feruloylated saccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 7241–7251
- 188 Behrens, C. J., Zelena, K. and Berger, R. G. (2016) Comparative Cold Shock Expression and Characterization of Fungal Dye-Decolorizing Peroxidases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1404–1417

- 189 Lin-Cereghino, J., Wong, W., Xiong, S., Giang, W., Luong, L., Vu, J., Johnson, S. and Lin-Cereghino, G. (2005) Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotech.* **38**, 44–48
- 190 Fan, F., Zhuo, R., Sun, S., Wan, X., Jiang, M., Zhang, X. and Yang, Y. (2011) Cloning and functional analysis of a new laccase gene from *Trametes* sp. 48424 which had the high yield of laccase and strong ability for decolorizing different dyes. *Bioresour. Technol.* **102**, 3126–3137
- 191 Linke, D., Zorn, H., Gerken, B., Parlar, H. and Berger, R. G. (2007) Laccase isolation by foam fractionation—New prospects of an old process. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 273–277
- 192 Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G. and Giardina, P. (2003) Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 220–230
- 193 Sun, J., Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Tian, Y., Zhao, W., Xu, H., Liu, D.-T., Chen, J.-M. and Yao, Q.-H. (2012) Secretory expression and characterization of a soluble laccase from the *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 in *Pichia pastoris*. *Mol. Biol. Rep.* **39**, 3807–3814
- 194 Rivera-Hoyos, C. M., Morales-Alvarez, E. D., Poveda-Cuevas, S. A., Reyes-Guzman, E. A., Poutou-Pinales, R. A., Reyes-Montano, E. A., Pedroza-Rodriguez, A. M., Rodriguez-Vazquez, R. and Cardozo-Bernal, A. M. (2015) Computational analysis and low-scale constitutive expression of laccases synthetic genes GILCC1 from *Ganoderma lucidum* and POXA 1B from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris*. *PLoS ONE* **10**, e0116524
- 195 Hu, M., Zhou, X., Shi, Y., Lin, J., Irfan, M. and Tao, Y. (2014) Essential role of the N- and C-terminals of laccase from *Pleurotus florida* on the laccase activity and stability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 2007–2017
- 196 Zhuo, R., Ma, L., Fan, F., Gong, Y., Wan, X., Jiang, M., Zhang, X. and Yang, Y. (2011) Decolorization of different dyes by a newly isolated white-rot fungi strain *Ganoderma* sp.En3 and cloning and functional analysis of its laccase gene. *J. Hazard. Mater.* **192**, 855–873
- 197 Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. and Dalboge, H. (1996) Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 834–841



- 198 Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A. and Rouvinen, J. (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 601–605
- 199 Berka, R. M., Grigoriev, I. V., Otilar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I., Ishmael, N., John, T., Darmond, C. and Moisan, M.-C. et al. (2011) Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. *Nat. Biotechnol.* **29**, 922–927
- 200 Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M. and Söding, J. et al. (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539
- 201 Yang, Y., Ma, F., Yu, H., Fan, F., Wan, X., Zhang, X. and Jiang, M. (2011) Characterization of a laccase gene from the white-rot fungi *Trametes* sp. 5930 isolated from Shennongjia Nature Reserve in China and studying on the capability of decolorization of different synthetic dyes. *Biochem. Eng. J.* **57**, 13–22
- 202 Wong, K.-S., Huang, Q., Au, C.-H., Wang, J. and Kwan, H.-S. (2012) Biodegradation of dyes and polyaromatic hydrocarbons by two allelic forms of *Lentinula edodes* laccase expressed from *Pichia pastoris*. *Bioresour. Technol.* **104**, 157–164
- 203 Kittl, R., Mueangtoom, K., Gonaus, C., Khazaneh, S. T., Sygmund, C., Haltrich, D. and Ludwig, R. (2012) A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **157**, 304–314
- 204 Gu, C., Zheng, F., Long, L., Wang, J. and Ding, S. (2014) Engineering the expression and characterization of two novel laccase isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by fusing an additional ten amino acids tag at N-terminus. *PLoS ONE* **9**, e93912
- 205 Gelo-Pujic, M., Kim, H. H., Butlin, N. G. and Palmore, G. T. (1999) Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5515–5521
- 206 Colao, M. C., Lupino, S., Garzillo, A. M., Buonocore, V. and Ruzzi, M. (2006) Heterologous expression of *lcc1* gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Microb. Cell Fact.* **5**, 31
- 207 Huang, S. J., Liu, Z. M., Huang, X. L., Guo, L. Q. and Lin, J.-F. (2011) Molecular cloning and characterization of a novel laccase gene from a white-rot fungus *Polyporus gramocephalus* TR16 and expression in *Pichia pastoris*. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**, 290–297

- 208 Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner Zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F. and Hofacker, I. L. (2011) ViennaRNA Package 2.0. Algorithms Mol. Biol. **6**, 26
- 209 Steentoft, C., Vakhrushev, S. Y., Joshi, H. J., Kong, Y., Vester-Christensen, M. B., Schjoldager, K. T.-B. G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N. B. and Marcos-Silva, L. et al. (2013) Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. EMBO J. **32**, 1478–1488
- 210 Ogawa, S., Shimizu, T., Ohki, H., Araya, T., Okuno, T. and Miyairi, K. (2009) Expression, purification, and analyses of glycosylation and disulfide bonds of *Stereum purpureum* endopolygalacturonase I in *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. **65**, 15–22
- 211 Yuan, X., Tian, G., Zhao, Y., Zhao, L., Wang, H. and Ng, T. B. (2016) Biochemical Characteristics of Three Laccase Isoforms from the Basidiomycete *Pleurotus nebrodensis*. Molecules **21**, 203
- 212 Tong, P., Hong, Y., Xiao, Y., Zhang, M., Tu, X. and Cui, T. (2007) High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. Biotechnol. Lett. **29**, 295–301
- 213 Struch, M., Linke, D., Mokoonlall, A., Hinrichs, J. and Berger, R. G. (2015) Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators. Int. Dairy J. **49**, 89–94
- 214 van Tunen, A. J. and Mol, J. N. M. (1991) Control of flavonoid synthesis and manipulation of flower colour. In Developmental Regulation of Plant Gene Expression (Grierson, D., ed.), pp. 94–130
- 215 Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. and Galán-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins. A review. Food Chem. **113**, 859–871
- 216 Grotewold, E. (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. Annu. Rev. Plant Biol. **57**, 761–780
- 217 Jiang, Y. (2000) Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. J. Sci. Food Agric. **80**, 305–310
- 218 Piffaut, B., Kader, F., Girardin, M. and Metche, M. (1994) Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. Food Chem. **50**, 115–120
- 219 Verdoucq, L., Moriniere, J., Bevan, D. R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B. and Czjze, M. (2004) Structural determinants of substrate specificity in family 1 beta-glucosidases. Novel insights from the crystal structure of sorghum dhurrinase-1, a plant beta-glucosidase

- with strict specificity, in complex with its natural substrate. *J. Biol. Chem.* **279**, 31796–31803
- 220 Barleben, L., Panjikar, S., Ruppert, M., Koepke, J. and Stockigt, J. (2007) Molecular architecture of strictosidine glucosidase. The gateway to the biosynthesis of the monoterpenoid indole alkaloid family. *Plant Cell* **19**, 2886–2897
- 221 Strigl, A. W., Leitner, E. and Pfannhauser, W. (1995) Qualitative und Quantitative Analyse der Anthocyane in Schwarzen Apfelbeeren (*Aronia melanocarpa* Michx. Ell.) mittels TLC, HPLC und UV/VIS-Spektrometrie. *Z. Lebensm. Unters. Forch.* **201**, 266–268
- 222 Castro, E. de, Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A. and Hulo, N. (2006) ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* **34**, W362-5
- 223 Papadopoulos, J. S. and Agarwala, R. (2007) COBALT. Constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* **23**, 1073–1079
- 224 Hrmova, M. (2002) Structural Basis for Broad Substrate Specificity in Higher Plant beta-D-Glucan Glucohydrolases. *Plant Cell Online* **14**, 1033–1052
- 225 Harvey, A. J., Hrmova, M., Gori, R. de, Varghese, J. N. and Fincher, G. B. (2000) Comparative modeling of the three-dimensional structures of family 3 glycoside hydrolases. *Proteins* **41**, 257–269
- 226 Cournoyer, B. and Faure, D. (2003) Radiation and Functional Specialization of the Family-3 Glycoside Hydrolases. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 190–198
- 227 Sakamura, S. and Obata, Y. (2014) Anthocyanase and Anthocyanins Occurring in Eggplant, *Solanum melongena* L. (I). *Agric. Biol. Chem.* **25**, 750–756
- 228 Blom, H. (1983) Partial characterization of a thermostable anthocyanin- $\beta$ -glycosidase from *Aspergillus niger*. *Food Chem.* **12**, 197–204
- 229 Sánchez-Torres, P., Gonzalez-Candelas, L. and Ramón, D. (1998) Heterologous Expression of a *Candida molischiana* Anthocyanin-b-glucosidase in a Wine Yeast Strain. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 354–360
- 230 Shoseyov, O., Chet, I., Bravdo, B. A. and Ikan, R. (1989) Flavor and fragrance enhancing enzymes, Google Patents. <https://google.com/patents/EP0307071A2?cl=ko>
- 231 Panek, A., Pietrow, O., Filipkowski, P. and Synowiecki, J. (2013) Effects of the polyhistidine tag on kinetics and other properties of trehalose synthase from *Deinococcus geothermalis*. *Acta Biochim. Pol.* **60**, 163–166

- 
- 232 Sabaty, M., Grosse, S., Adryanczyk, G., Boiry, S., Biaso, F., Arnoux, P. and Pignol, D. (2013) Detrimental effect of the 6 His C-terminal tag on YedY enzymatic activity and influence of the TAT signal sequence on YedY synthesis. *BMC Biochem.* **14**, 28
- 233 Romanos, M. (1995) Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 527–533
- 234 Bornhorst, J. A. and Falke, J. J. (2000) [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins Part A: Gene Expression and Protein Purification*, pp. 245–254
- 235 Borsig, L., Berger, E. G. and Malissard, M. (1997) Expression and purification of His-tagged beta-1,4-galactosyltransferase in yeast and in COS cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 586–589
- 236 Blom, H. (1985) Kinetic studies on strawberry anthocyanin hydrolysis by a thermostable anthocyanin- $\beta$ -glycosidase from *Aspergillus niger*. *Food Chem.* **17**, 157–168
- 237 Mfombep, P. M., Senwo, Z. N. and Isikhuemhen, O. S. (2013) Enzymatic activities and kinetic properties of  $\beta$ -glucosidase from selected white rot fungi. *ABC* **03**, 198–207
- 238 Martino, A., Pifferi, P. G. and Spagna, G. (1994) Production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* using carbon sources derived from agricultural wastes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **60**, 247–252
- 239 Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E. and Prior, R. L. (2006) Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4069–4075
- 240 Mokrzycki, W. and Tatol, M. (2011) Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics and Vision* **20**, 383–411
- 241 Grissa, I., Vergnaud, G. and Pourcel, C. (2007) CRISPRFinder. A web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic Acids Res.* **35**, W52-7
- 242 Wang, H., La Russa, M. and Qi, L. S. (2016) CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 227–264
- 243 Jiang, F. and Doudna, J. A. (2017) CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529
- 244 Ran, F. A., Le Cong, Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X. and Makarova, K. S. et al. (2015) In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**, 186–191

- 
- 245 Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Topkar, V. V., Zheng, Z. and Joung, J. K. (2015) Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1293–1298
- 246 Lieber, M. R. (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211
- 247 Rudin, N., Sugarman, E. and Haber, J. E. (1989) Genetic and Physical Analysis of Double-Strand Break Repair and Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 519–534
- 248 Smanski, M. J., Zhou, H., Claesen, J., Shen, B., Fischbach, M. A. and Voigt, C. A. (2016) Synthetic biology to access and expand nature's chemical diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 135–149
- 249 Chiang, Y.-M., Oakley, C. E., Ahuja, M., Entwistle, R., Schultz, A., Chang, S.-L., Sung, C. T., Wang, C. C. C. and Oakley, B. R. (2013) An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7720–7731
- 250 Matsu-Ura, T., Baek, M., Kwon, J. and Hong, C. (2015) Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology. *Fungal Biol. Biotechnol.* **2**, 4
- 251 Deng, H., Gao, R., Liao, X. and Cai, Y. (2017) CRISPR system in filamentous fungi. Current achievements and future directions. *Gene* **627**, 212–221
- 252 Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S. and Kahmann, R. (2016) Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genet. Biol.* **89**, 3–9
- 253 Nodvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E. and Mortensen, U. H. (2015) A CRISPR-Cas9 System for Genetic Engineering of Filamentous Fungi. *PLoS ONE* **10**, e0133085
- 254 Behrens, C. J., Linke, D., Allister, A. B., Zelena, K. and Berger, R. G. (2017) Variants of PpuLcc, a multi-dye decolorizing laccase from *Pleurotus pulmonarius* expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **137**, 34–42
- 255 Heigwer, F., Kerr, G. and Boutros, M. (2014) E-CRISP. Fast CRISPR target site identification. *Nature methods* **11**, 122–123
- 256 Wang, J., Holden, D. W. and Leong, S. A. (1988) Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 865–869
- 257 Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and Kahmann, R. (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295–306

- 258 Zimmermann, F. K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* **31**, 71–86
- 259 Zonneveld, B. J. and van der Zanden, A. L. (1995) The red ade mutants of *Kluyveromyces lactis* and their classification by complementation with cloned ADE1 or ADE2 genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **11**, 823–827
- 260 Wang, Y., Wei, D., Zhu, X., Pan, J., Zhang, P., Huo, L. and Zhu, X. (2016) A 'suicide' CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*. *Sci. Rep.* **6**, 31145
- 261 Gao, Y. and Zhao, Y. (2014) Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *J. Integr. Plant Biol.* **56**, 343–349
- 262 Jacobs, J. Z., Ciccaglione, K. M., Tournier, V. and Zaratiegui, M. (2014) Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nat. Commun.* **5**, 5344
- 263 Nissim, L., Perli, S. D., Fridkin, A., Perez-Pinera, P. and Lu, T. K. (2014) Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells. *Mol. Cell* **54**, 698–710

## 12. Lebenslauf

### Persönliches

Name: Christoph Jan Behrens  
Geburtsdaten: 13.04.1987

### Ausbildung

– 08.06 Cato Bontjes van Beek Gymnasium, Achim, Abitur mit 2,2  
WS 06/07 – SS 07 HS-Bremerhaven, Lebensmitteltechnologie  
WS 07/08 – SS 09 HS-Bremen, Technische und Angewandte Biologie  
WS 09/10 – SS 10 University of Salford, Großbritannien, Pharmaceutical Sciences  
Abschlussthema: Cell proliferation as a result of activating the HGF/SF-pathway, 1<sup>st</sup> Class Degree  
WS 10/11 HS-Bremen, Technische und angewandte Biologie B. Sc.  
Abschlussthema: Machbarkeitsstudie zu Invertzuckersirup in biologischer Qualität, Note 1,3  
WS 11/12 - SS 13 Universität Osnabrück, Biowissenschaften M. Sc.  
Abschlussthema: MAP-Kinasen in Mensch und Hefe, Note 1,3  
04/2014- Doktorarbeit an der Universität Hannover, Lebensmittelchemie

### Beruflicher Werdegang

WS 08/09 Tutorenstelle an der Hochschule Bremen  
WS 08/09 – SS 09 Studentischer Mitarbeiter an der Hochschule Bremen im Bereich Molekularbiologie in zwei Projekten  
SS 09 Praktikum im molekulargenetischen Labor an der University of Salford  
WS 10/11 Studentischer Mitarbeiter an der Hochschule Bremen im Bereich Hefegenetik  
03.11-08.11 Praktikant bei Q-Bioanalytics in der F&E  
12.11-08.12 Studentischer Mitarbeiter in der AG Genetik, Universität Osnabrück  
11.13-2.14 Praktikant beim MPI Bremen für Marine Mikrobiologie in der AG Molekulare Ökologie