

# Extra- und intrazelluläre Laccasen der acidophilen schwarzen Hefe *Hortaea acidophila*

## Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Jutta Bend

aus

Mönchengladbach

Bonn, 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Milan Höfer
2. Referent: Prof. Erwin A. Galinski

Tag der Promotion: 05.05.2006

„Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert“

Erscheinungsjahr: 2006

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung

1.1 <i>Hortaea acidophila</i> .....	1
1.2 Melanin.....	4
1.2.1 Definition.....	4
1.2.2 Funktion.....	5
1.2.3 Lokalisation.....	6
1.3 Laccasen.....	6
1.3.1 Definition.....	6
1.3.2 Katalysierte Reaktion.....	6
1.3.3 Vorkommen und Verbreitung.....	8
1.3.4 Funktionen.....	9
1.3.5 Industrielle Applikationen.....	10
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	12

## 2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Mikroorganismen.....	13
2.2 Nährmedien.....	13
2.2.1 Medien zur Stammhaltung und zur Materialgewinnung.....	13
2.2.2 Medien für die Anzuchtsoptimierung.....	14
2.2.3 Medienzusätze.....	18
2.3 Puffer und Lösungen.....	19
2.4 Kultivierungsverfahren.....	23
2.4.1 Stammhaltung.....	23
2.4.2 Anzucht im Schüttelkolben.....	23
2.4.3 Anzucht im Feststofffermenter.....	24
2.4.4 Anzucht auf Agarplatten.....	24
2.4.5 Bestimmung des Biomassezugewinns.....	25
2.4.6 Zentrifugation.....	26
2.5 Präparation der intrazellulären bzw. zellassozierten Laccasen und der Laccase aus dem Kulturüberstand.....	26
2.5.1 Zellernte.....	26
2.5.2 Behandlung der Zellen mit Salzen und SDS.....	26
2.5.3 Zellaufschlussmethoden.....	27
2.5.4 Trennung verschiedener Zellfraktionen.....	30
2.5.5 Ultrafiltration des Kulturüberstandes.....	30
2.5.6 Saure Melaninfällung.....	31
2.6 Gefriertrocknung.....	31
2.7 Enzymassays.....	31
2.7.1 ABTS-Test.....	33
2.7.2 DMOP-Test.....	33
2.7.3 Guajacol-Test.....	33
2.7.4 Syringaldazin-Test.....	34
2.7.5 DAN-Test.....	34
2.7.6 Test mit der Sauerstoffelektrode.....	35
2.7.7 Amylasetest.....	36

2.7.8 Proteasetest.....	36
2.7.9 Esterasetest.....	36
2.7.10 Proteinbestimmung.....	37
2.7.11 Melaniningehalt.....	37
2.7.12 Laccasetest nach der SDS-PAGE.....	38
2.7.13 pH-Optimum.....	39
2.7.14 pH-Stabilität.....	39
2.7.15 Temperaturoptimum.....	39
2.7.16 Temperaturstabilität.....	40
2.7.17 Stabilität gegenüber potenziellen Inhibitoren.....	40
2.8 Pufferwechsel mit VivaSpin.....	41
2.9 Isoelektrische Fokussierung.....	41
2.10 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	42
2.11 Atomabsorptionsspektrophotometrie.....	44
2.12 Deglykosylierung.....	45
2.13 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	46
2.13.1 Probenvorbereitung.....	46
2.13.2 Versuche zur Erhöhung der Stringenz.....	47
2.13.3 Größenstandards.....	47
2.13.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen.....	48
2.13.5 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen.....	49
2.13.6 Anfärbung der Proteine im Gel.....	49
2.13.7 Gel Trocknung.....	50
2.14 Western-Blot.....	50
2.14.1 Western-Transfer.....	51
2.14.2 Immunohybridisierung.....	51
2.14.3 Kolorimetrischer Nachweis.....	52
2.15 Aufreinigungsmethoden.....	52
2.15.1 Ammoniumsulfatfällung.....	52
2.15.2 Laccasefällung mit Eisenchlorid.....	53
2.15.3 Ethanol fällung.....	53
2.15.4 Gelfiltrationschromatographie.....	54
2.15.5 Ionenaustauschchromatographie.....	54
2.15.6 Präparative SDS-PAGE.....	57
2.16 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen.....	58
2.17 Verwendete Chemikalien und Materialien.....	58

### 3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Einordnung des zu untersuchenden Enzyms.....	62
3.1.1 ABTS-Oxidation im Plattentest.....	63
3.1.2 Substratumsetzungen des Enzyms.....	63
3.1.3 Einfluss von Kupfer auf die Enzyymbildung.....	65
3.1.4 Weitere extrazelluläre Enzyme in <i>H. acidophila</i> .....	65
3.2 Etablierung eines geeigneten Testsystems zur Messung der Laccaseaktivität.....	66
3.3 Isolierung der Laccasen.....	67
3.3.1 Gewinnung der Laccasen aus dem Kulturüberstand.....	67
3.3.2 Isolierung der zellassozierten Laccasen.....	71
3.3.3 Gewinnung der intrazellulären Laccasen.....	73

3.4 Optimierung der Kulturbedingungen zur Steigerung der Laccaseaktivität.....	77
3.4.1 Vergleich der Tests zur Biomassebestimmung.....	77
3.4.2 Inkubationstemperatur.....	78
3.4.3 pH-Wert.....	80
3.4.4 Stickstoffquelle.....	80
3.4.5 Schüttelfrequenz.....	81
3.4.6 Kohlenstoffquelle.....	82
3.4.7 Steigerung der Laccaseaktivität durch Zusatz von potenziellen Induktoren..	83
3.4.8 Anzucht von <i>H. acidophila</i> im Rieselfilmverfahren.....	85
3.4.9 Anzucht unter optimierten Kulturbedingungen.....	87
3.5 Charakteristika der Laccasen.....	89
3.5.1 pH-Optima.....	89
3.5.2 Substratspektrum.....	90
3.5.3 Enzymstabilität.....	91
3.5.4 Molekulargewichte.....	95
3.5.5 Isoelektrische Punkte, Isoenzyme.....	98
3.5.6 Glykosylierung.....	99
3.5.7 Benennung der Laccasen aus den verschiedenen Extrakten von <i>H. acidophila</i> und Zusammenfassung der Charakteristika.....	100
3.6 Aufreinigung der Laccasen.....	103
3.6.1 Abtrennung der Melaninfraktion.....	103
3.6.2 Gelfiltrationschromatographie.....	108
3.6.3 Anionenaustauschchromatographie.....	111
3.6.4 Kationenaustauschchromatographie.....	115
3.6.5 Präparative SDS-PAGE.....	123
3.6.6 Zusammenfassung des Aufreinigungserfolges.....	124
3.7 N-terminale Aminosäuresequenzen.....	124

## 4 Diskussion

4.1 Nachweis und Lokalisation der <i>H. acidophila</i> Laccasen.....	126
4.1.1 Einordnung des oxidativen Enzyms und Nachweis einer Laccaseaktivität..	126
4.1.2 Lokalisation der Laccasen.....	127
4.2 Optimierung der Kulturbedingungen.....	132
4.2.1 pH-Wert.....	133
4.2.2 Stickstoffquelle.....	133
4.2.3 Kohlenstoffquelle.....	134
4.2.4 Schüttelfrequenz.....	135
4.2.5 Kupferinduktion.....	135
4.2.6 Anzucht unter Zusatz von Ascorbinsäure.....	136
4.2.7 Anzucht im Rieselfilmverfahren.....	137
4.2.8 Laccaseausbeute in vivo.....	138
4.3 Begleitaktivitäten im Kulturüberstand.....	138
4.4 Charakterisierung der Laccasen.....	139
4.4.1 Molekulargewichte und Aufbau der Isoenzyme.....	139
4.4.2 Stabilität.....	142
4.4.3 pH-Optima.....	144
4.4.4 Isoelektrischer Punkt.....	146
4.4.5 Glykosylierungsgrad.....	147
4.4.6 Inhibitionsspektrum.....	149
4.4.7 Substratspektrum.....	151

4.5 Isolierung und Aufreinigung der Laccasen.....	152
4.5.1 Isolierung der Laccasen.....	152
4.5.2 Ultrafiltration.....	153
4.5.3 Native Fällungen.....	155
4.5.4 Gelfiltrationschromatographie.....	156
4.5.5 Ionenaustauschchromatographie.....	156
4.5.6 Präparative SDS-PAGE.....	158
4.5.7 Dokumentation der gereinigten Laccasen.....	158
4.6 Abgleich der Laccasen auf Gen- und Proteinebene.....	160
4.7 Charakterisierung des <i>H. acidophila</i> -Melanins.....	163
4.8 Potenzielle Funktionen der Laccasen aus <i>H. acidophila</i> .....	167
4.9 Biotechnologische Nutzbarkeit der Laccasen aus <i>H. acidophila</i> .....	169
4.10 Ausblick.....	170
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>172</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>174</b>
<b>7 Anhang</b>	
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	183
7.1.1 Allgemeine Abkürzungen.....	183
7.1.2 Bezeichnungen für Laccasen und Laccasegene aus <i>H. acidophila</i> .....	185
7.1.3 Aminosäuren.....	185
7.2 Danksagung.....	186
7.3 Lebenslauf.....	188
7.4 Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	189
Erklärung.....	190

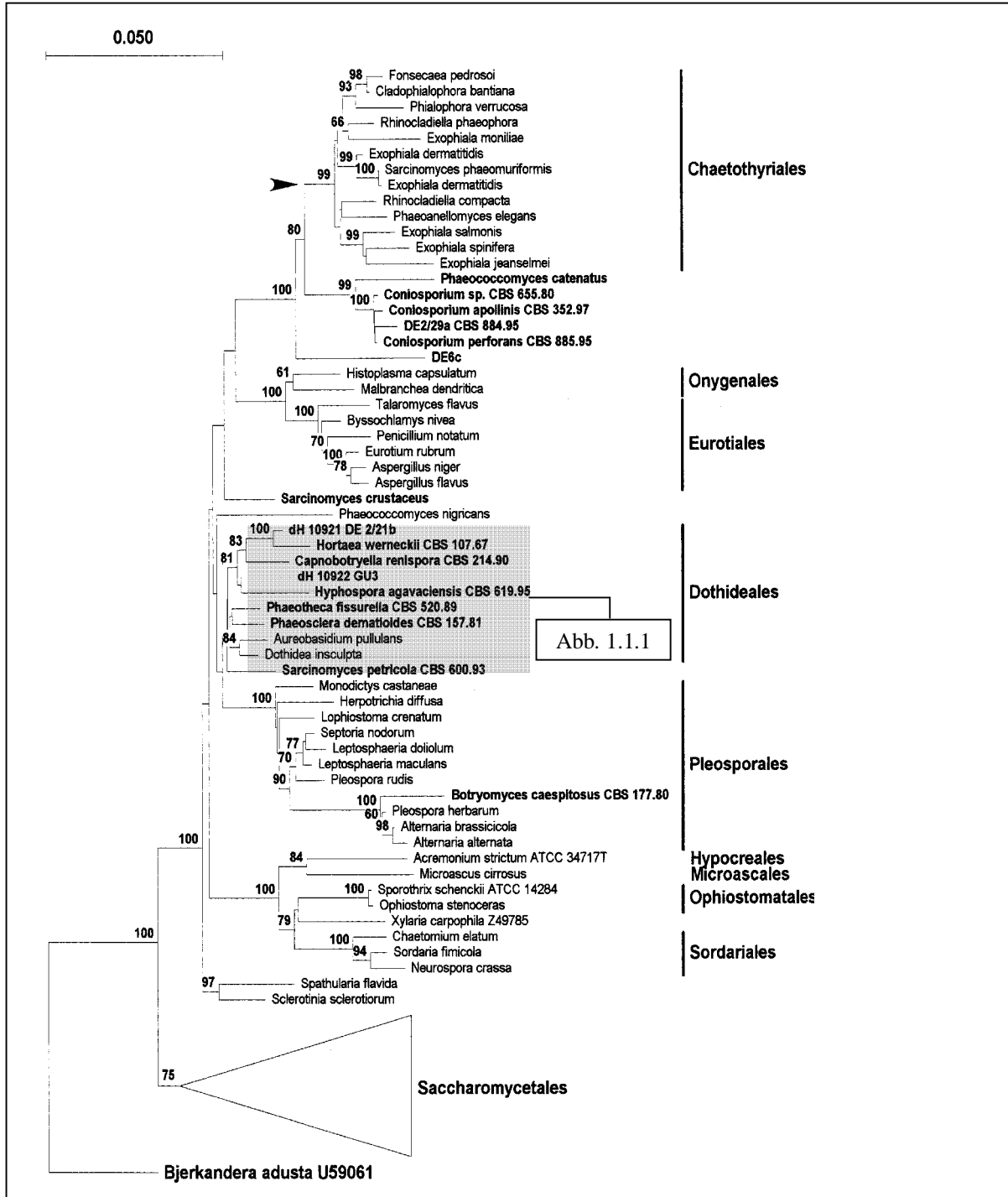
# 1 Einleitung

Pilzliche Mikroorganismen besetzen die verschiedensten ökologischen Nischen. Auf der einen Seite verursachen sie Allergien, Mykosen oder systemische Infektionen (z.B. *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Paracoccidioides*) auf der anderen Seite werden Medikamente wie Penicillin aus ihnen gewonnen (*Penicillium chrysogenum*). Auf der einen Seite sind sie als Verderber von Lebensmitteln gefürchtet (z.B. *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*), auf der anderen Seite werden sie zur Verfeinerung oder Erschließung von Nahrungsmitteln wie Bier, Käse oder Wein verwendet (*Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium gorgonzola*; *Botrytis cinerea*, u.a.) oder dienen selbst als Nahrungsmittel wie der Champignon *Agaricus bisporus*, der Shiitake-Pilz *Lentinula edodes* oder der Austernseitling: *Pleurotus ostreatus*. Deshalb ist es wichtig, das Wissen über Pilze ständig zu erweitern, um ihrem schädlichen Potenzial entgegenwirken zu können und um die stoffwechselphysiologischen Leistungen der Pilze und ihr großes Potenzial für die Biotechnologie nutzbar zu machen. Nach Schätzungen sind bislang nur etwa 5-10% der existierenden Pilzarten beschrieben (Prillinger *et al.*, 2002). Neue Arten zu entdecken und auf potenzielle Nutzungsmöglichkeiten hin zu untersuchen, erscheint daher wichtig und sinnvoll. Gegenstand der Untersuchung in der vorliegenden Dissertation ist die kurz vor Beginn dieser Arbeit neu isolierte acidophile Schwarze Hefe *Hortaea acidophila*. Ein besonderer Schwerpunkt wird auf die Charakterisierung der oxidativen Enzyme (Laccasen) des Mikroorganismus gelegt, die sich aufgrund der Anpassung des Pilzes an extrem niedrige pH-Werte möglicherweise besonders für den industriellen Einsatz eignen könnten.

## 1.1 *Hortaea acidophila*

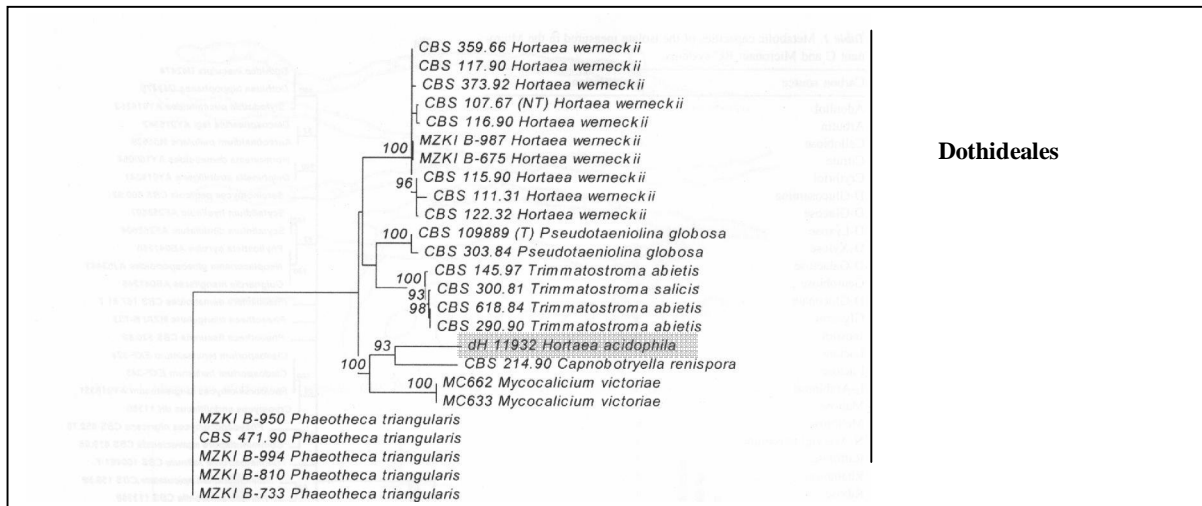
*H. acidophila* wurde im Jahr 2000 aus saurem (pH 0,6) Braunkohleextrakt isoliert (Hölker *et al.*, 2004). Die anschließende Charakterisierung ergab, dass es sich dabei um eine noch unbeschriebene Art handelte. *H. acidophila* wurde daraufhin als einziger weiterer Vertreter der Gattung *Hortaea* neben die halophile *H. werneckii* in die ascomycetische Ordnung Dothideales eingruppiert und als so genannte Schwarze Hefe definiert. Bei Schwarzen Hefen handelt es sich um eine taxonomisch uneinheitliche Gruppe, ein Paraphylum, bei denen es sich nach de Hoog (1993) um melaninhaltige Pilze handelt, die sich durch einzelliges Wachstum vermehren können. Tatsächlich sind die meisten Pilze dieser Gruppe dimorph, bilden also sowohl Hefe- als auch Hyphen-Stadien. Alle Arten mit hohen Sequenzähnlichkeiten zu *H. acidophila* haben darüber hinaus gemeinsam, dass sie eine

Umgebung mit geringer Wasseraktivität tolerieren. Dies kann sich z.B. in Eigenschaften wie Halophilie (*H. werneckii*, *Trimmatostroma salinum*), Epilithie (*Trimmatostroma abietes*, *Capnobotryella renispora*) oder Symbiose mit Pflanzen zu Flechten (*Hobsonia santessonii*) äußern (Hölker *et al.*, 2004).



**Abb. 1.1: Phylogenetischer Baum zur systematischen Einordnung der ascomycetischen Pilze.** Der Baum basiert auf einer SSU- (Small Subunit) Sequenzanalyse von 80 Ascomyceten. Der Basidiomycet *Bjerkandera adusta* wurde als Außengruppe verwendet. Schwarze Hefen finden sich hauptsächlich in den Ordnungen Chaetothyriales, Pleosporales und Dothideales. Die Ordnung Dothideales, zu der auch *H. acidophila* gehört, wurde farblich unterlegt und ist in Abb. 1.2 genauer aufgeschlüsselt. Bildnachweis: de Hoog (1999)



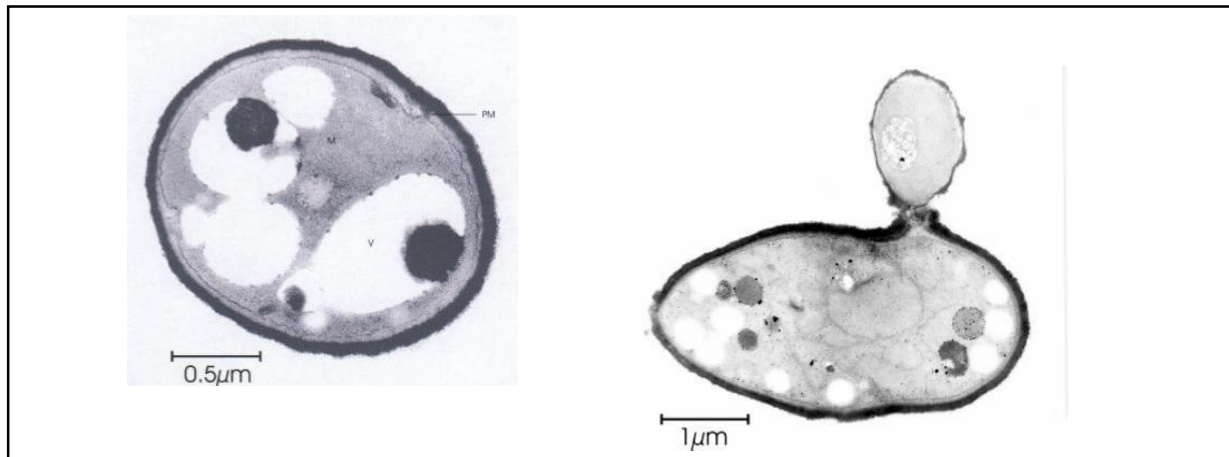


**Abb. 1.2: Phylogenetischer Baum der Dothideales (Ausschnittsvergrößerung Abb. 1.1).** Der Stammbaum basiert auf Sequenzvergleichen der ITS rDNA von 25 Mitgliedern der Dothideales, also der Ordnung, der auch *H. acidophila* angehört. Dieser Baum zeigt demnach einen detaillierten Ausschnitt der nächsten Verwandten von *H. acidophila*. *H. acidophila* wurde farblich unterlegt. Bildnachweis: *Hölker et al. (2004)*

Obwohl der erste Teil des Zellzyklus von *H. acidophila* dem von *Exophiala dermatitides* gleicht, ist keine nähere Verwandtschaft zu dieser Schwarzen Hefe der Ordnung Chaetothyriales vorhanden (Abb. 1.1). Dies ist aus dem späteren Verlauf der Zellentwicklung ersichtlich: *H. acidophila* bildet während der Reifephase die für Pilze der Ordnung Dothideales typischen Septen und lokalen Melanininkrustierungen (Abb. 1.3).

Die Taxonomie der Schwarzen Hefen befindet sich seit der Etablierung molekularer Methoden zur Untersuchung der Verwandtschaftsverhältnisse in einem stetigen Fluss. Die Stammbäume müssen häufig korrigiert werden, da es in der Gruppe der Schwarzen Hefen viele physiologische Ähnlichkeiten gibt, die aber nicht die verwandtschaftlichen Beziehungen widerspiegeln. Ein Beispiel ist die basidiomycetische Schwarze Hefe *Cryptococcus neoformans*, die streng genommen den in der Regel ascomycetischen Schwarzen Hefen nicht zu gehören dürfte. Erschwerend kommt bei der Einordnung Schwarzer Hefen hinzu, dass es oft teleomorphe (sexuelle Vermehrungsstadien) und anamorphe (asexuelle Vermehrungsstadien) Formen des gleichen Pilzes gibt, die sich morphologisch stark voneinander unterscheiden und teilweise in unterschiedliche Gattungen eingruppiert sind.

Nachfolgend sind zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen von *H. acidophila*-Zellen dargestellt. Man erkennt die elektronendichten Bereiche oberhalb der Plasmamembran und die für Dothideales typischen Vesikel mit osmiophilen Granula im Inneren der Zelle. Die elektronendichte Schicht fehlt bei sich abschnürenden Tochterzellen (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *H. acidophila*. Links: Querschnitt einer Hefezelle, Rechts: Querschnitt einer knospenden Hefezelle. V = Vakuolen mit osmiophilem Material (Melanininkrustierungen), PM = Plasmamembran, M = Mitochondrium. Die Hefezellen sind etwa 4 μm im Durchmesser und 5-10 μm lang. Auf die Zellwand ist eine osmiophile Schicht aufgelagert, die als Melanin interpretiert werden kann. Bildnachweis: Hölker et al. (2004).**

*H. acidophila* vermehrt sich sowohl über 5-10 μm lange Hefestadien als auch über Mycelbildung. Je nach äußeren Bedingungen werden vorwiegend Hyphen oder Einzelzellen gebildet. Aus den bislang bekannten Tatsachen lässt sich schließen, dass *H. acidophila* unter Wachstumsbedingungen, die stark von den Optimalbedingungen abweichen, verstärkt Mycel bildet. Zwischen pH 2 und pH 6 überwiegen Hefestadien. Im Gegensatz zur halophilen Verwandten *H. werneckii* toleriert *H. acidophila* nur NaCl-Konzentrationen kleiner als 5 %. *H. acidophila* ist obligat aerob.

Da es sich bei der untersuchten Hefe um einen acidophilen Mikroorganismus handelt, ist es wahrscheinlich, dass das extrazelluläre Enzymspektrum der Hefe auf dieses Milieu abgestimmt ist. Laccasen, die unter extrem sauren Bedingungen optimal arbeiten, sind bislang selten beschrieben worden, kommen aber für spezielle industrielle Anwendungen in Frage (s.1.3.5).

## 1.2 Melanin

### 1.2.1 Definition

Melanine sind dunkel gefärbte, meist schwarze oder braune Makromoleküle (melas = gr. schwarz), die sich aus indolischen oder phenolischen Grundbausteinen zusammensetzen und sind in der Regel mit Proteinen komplexiert (Butler & Day, 1998). Die Struktur ist heterogen, da der letzte Schritt der Synthese eine radikalische Reaktion darstellt und die Monomere über unterschiedliche Bindungsstellen polymerisieren. Melanin ist weit verbreitet und wird sowohl

von Tieren, Pflanzen und Pilzen als auch von Bakterien gebildet. Der Aufbau der Grundbausteine unterscheidet sich je nach Organismus stark (Abb. 1.4). So ist das beim Menschen vorkommende Melanin ein Tyrosinpolymer. Bei Pilzen sind bislang verschiedene Melaninarten dokumentiert worden. Basidiomyceten, z.B. der Champignon *Agaricus bisporus*, bilden Melanin aus Glutaminyl-4-hydroxybenzen (Butler & Day, 1998), während das bestimmende Melanin bei Ascomyceten das so genannte Polyketidmelanin ist, das sich aus 1,8-Dihydroxynaphthalin zusammensetzt. Es gibt aber einige Ausnahmen. So bildet die basidiomycetische Schwarze Hefe *Cryptococcus neoformans* L-Dopa (3,4-Dihydroxyphenylalanin)-Melanin, kann die Monomere dafür jedoch nicht selbst herstellen (Zhu *et al.*, 2001). Der basidiomycetische Erreger des Maisbrandes *Ustilago maydis* bildet ein Melanin, das sich von Catecholmonomeren ableitet (Butler & Day, 1998).

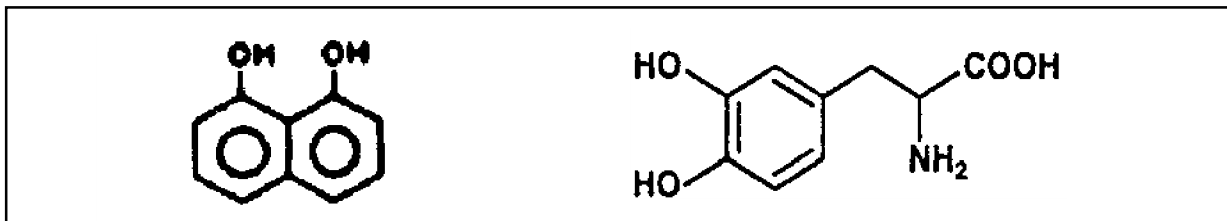


Abb. 1.4: Grundbausteine verschiedener Melaninarten. 1,8-Dihydroxynaphthalin (links) und 3,4-Dihydroxyphenylalanin (rechts).

### 1.2.2 Funktion

Generell wird Melanin eine Schutzfunktion zugeschrieben. Das gefärbte Polymer dient den Organismen als Schutz vor umweltbedingten Stressfaktoren, wie z.B. UV-Licht. Im Labor wurde auch ein Schutz gegen lytische Enzyme, niedrigen pH-Wert, Nährstoffmangel, Trockenheit und Hitze nachgewiesen (Butler & Day, 1998). Außerdem können Melanine große Mengen an toxischen Metallen wie z.B. Kupfer absorbieren (Gadd & de Rome, 1988). Melanin kann einen Großteil der gesamten Biomasse der Zellen ausmachen (z.B. 30 % der Sporen bei *Agaricus bisporus*).

Melanin spielt auch eine Rolle als Virulenzfaktor bei opportunistischen Pilzen, wie z.B. *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* oder *Exophiala dermatitidis* (Gomez & Nosanchuk, 2003). Dies wurde über Deletionsexperimente der einzelnen Gene des Melaninstoffwechsels bestätigt (Salas *et al.*, 1996). Der genaue Mechanismus ist jedoch weitestgehend ungeklärt. Wahrscheinlich schützt das Melanin die pilzlichen Zellen vor dem Angriff der körpereigenen Immunantwort, insbesondere vor den Makrophagen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass Melanin die Resistenz der Mikroorganismen gegenüber bestimmten

Antimykotika verstärkt, so dass melanisierte Pilze in der Regel schwer zu bekämpfen sind (Larsson 1993; Van Duin *et al.*, 2002). Die ebenfalls zu den Schwarzen Hefen gehörende *H. werneckii*, der Erreger der Hautmykose „Tinea nigra“ (Göttlich *et al.*, 1995) und nächste Verwandte von *H. acidophila* ist zwar auch ein opportunistischer Krankheitserreger, eine Behandlung der Krankheit ist aber im Gegensatz zu den beschriebenen Mikroorganismen unproblematisch. Dies legt nahe, dass neben dem Melanin weitere Virulenzfaktoren eine wichtige Rolle für die Pathogenität spielen.

### **1.2.3 Lokalisation**

In der Regel ist Melanin auf die Zell- bzw. Sporenwand der Pilze aufgelagert. Die Melaninschicht kann die Zellwand um das 2-5fache verstärken. Diese Auflagerung kann in Form von fibrillösen Strukturen oder Granula erfolgen (Butler & Day, 1998). Zum Teil kommt es auch zur Bildung von extrazellulärem Melanin, das durch Autoxidation von phenolischen Medienbestandteilen oder katalysiert durch vom Pilz ausgeschleuste oxidative Enzyme gebildet werden kann (Butler & Day, 1998). Bei *Cladosporium carrionii* und bei *Aureobasidium pullulans* (beide der Ordnung Dothideales zugehörig) wurden cytoplasmatische Vesikel gefunden, die Melanin enthalten. Das Melanin wird von diesen Organismen in den Vesikeln synthetisiert und anschließend zur Zellwand ausgeschleust (San-Blas, 1996).

## **1.3 Laccasen**

### **1.3.1 Definition**

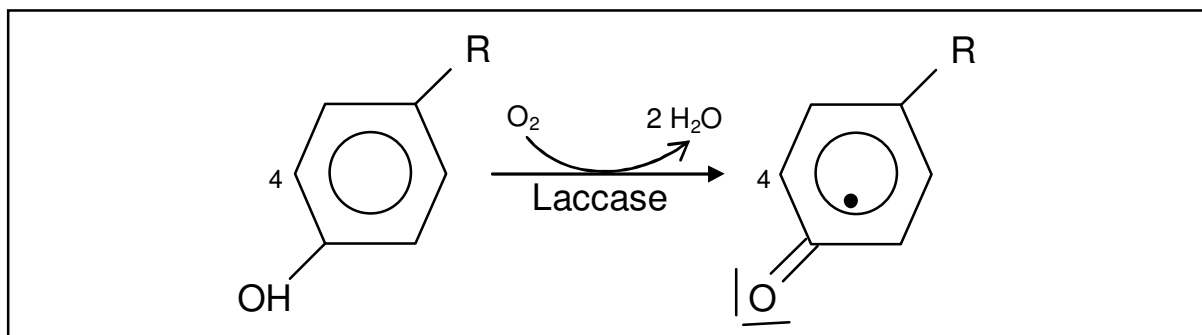
Laccasen (EC 1.10.3.2) sind kupferhaltige Polyphenoloxidasen, die zahlreiche polyphenolische oder mehrfach substituierte aromatische Verbindungen als Substrate nutzen können. Bei der Oxidationsreaktion wird Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor verwendet und dabei zu Wasser reduziert. Der Trivialname „Laccasen“ leitet sich ab von der Pflanze (Lacquer-tree), aus der die Enzyme erstmals isoliert wurden.

### **1.3.2 Katalysierte Reaktion**

Wie erwähnt ist die von der Laccase katalysierte Reaktion eine Oxidationsreaktion (Abb. 1.5). Dadurch erfolgt am Substrat eine homolytische Spaltung der OH-Gruppe bzw. die Abspaltung eines Wasserstoffatoms. Das Substrat wird dabei zum Phenoxyradikal oxidiert und Sauerstoff wird zu Wasser reduziert. Die gebildeten Radikale können dann wie z.B. bei der Melanin-

oder Ligninsynthese Polymerisierungsreaktionen eingehen. Neben der Polymerisation katalysieren Laccasen auch den Abbau von Polymeren. Dies geschieht jedoch meist im Zusammenspiel mit anderen oxidativen Enzymen wie z.B. Ligninasen oder Mn-Peroxidasen, welche über ein positiveres Redoxpotenzial verfügen. Das Redoxpotenzial von Laccasen liegt in der Regel zwischen +0,5 und +0,8 V, während Peroxidasen Redoxpotenziale um +1,2 V aufweisen (Piontek *et al.*, 2002).

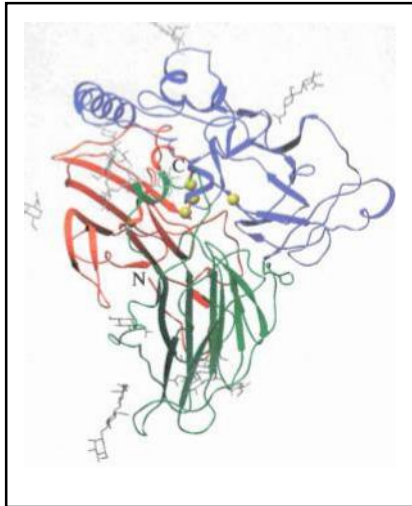
Das Substratspektrum der Laccasen ist sehr breit. Nach Bollag *et al.* (1979) kommen solche Substanzen in Frage, die mindestens zwei funktionelle Gruppen an einem aromatischen Ring aufweisen, wobei die Oxidation in ortho- und para, nicht jedoch meta-Stellung möglich ist. Beispiele für Substrate sind ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Schwefelsäure)), Ascorbinsäure, DMOP (2,6-Dimethoxyphenol), Guajacol (2-Methoxyphenol), Syringaldazin (N,N'-bis(3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzyliden-hydrazin) oder auch L-Dopa (Abb. 1.4). Bei ABTS handelt es sich um ein artifizielles Substrat, das eigens für den einfachen Laccasenachweis hergestellt wurde. ABTS besitzt zwei Oxidationsstufen (ABTS<sup>+•</sup> und ABTS<sup>2+</sup>) und wird jeweils am heterozyklischen Stickstoff oxidiert. In der ersten Oxidationsstufe ist ABTS grün gefärbt und in der zweiten violett (Bourbonnais *et al.*, 1998).



**Abb. 1.5: Laccasekatalysierte Reaktion.** Ein mehrfach substituierter Aromat, z.B. ein Polyphenol, wird oxidiert und die Elektronen über das aktive Zentrum der Laccase auf Sauerstoff übertragen, der zu Wasser reduziert wird. Es entsteht ein Phenoxylradikal, das weitere Reaktionen anstößt.

Insgesamt werden durch die Laccase vier Elektronen in Ein-Elektronen-Übergängen auf einen terminalen Elektronenakzeptor übertragen. Das katalytische Zentrum enthält vier unterschiedlich gebundene Kupfer(II)-Atome: Ein singuläres Typ1-Kupferatom und ein trinukleäres Cluster aus einem Typ2 und zwei Typ3-Kupferatomen (Mayer, 1987). Das Substrat wird durch Übertragung eines Elektrons auf das Typ1-Kupferatom oxidiert. Von dort wird das Elektron an das trinukleäre Cluster weitergegeben, wo die Elektronen auf den terminalen Elektronenakzeptor, meist Sauerstoff, übertragen werden (Xu, 1996). Der Aufbau einer Laccase ist in Abb. 1.6 dargestellt.

Nicht nur Sauerstoff kann als terminaler Elektronenakzeptor für Laccasen fungieren, sondern unter bestimmten Umständen auch anorganische oder organische Metallkomplexe wie z.B. Ferrocyanide oder Fe(EDTA) (Gianfreda *et al.*, 1999).



**Abb. 1.6 Kristallstruktur der Laccase aus dem Ascomyceten *Melanocarpus albomyces*.** In gelb sind die Kupferatome des aktiven Zentrums dargestellt; die Substratbindestelle befindet sich im Spalt zwischen Domäne B (grün) und Domäne C (blau). Bildnachweis: Hakulinen *et al.* (2002)

### 1.3.3 Vorkommen und Verbreitung

Laccasen wurden in Pflanzen, Bakterien, Pilzen und Tieren nachgewiesen. Neben dem „Lacquer-tree“ *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883) werden Laccasen von zahlreichen anderen pflanzlichen Organismen synthetisiert; u.a. vom Ahorn (*Acer pseudoplatanus*), dem Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*) und dem Tabak (*Nicotiana tabacum*) (Gianfreda *et al.*, 1999). In Pflanzen dient die Laccase wahrscheinlich der Ligninsynthese durch Katalyse der Oxidation der Phenylpropanderivate Cumaryl-, Sinapyl- und Coniferylalkohol. Deshalb ist anzunehmen, dass die meisten (verholzten) Pflanzen zur Bildung von Laccasen befähigt sind.

Darüber hinaus finden sich Laccasen in praktisch allen Weißfäulepilzen und in vielen anderen höheren Pilzen. In Basidiomyceten wurden Laccasen z.B. im Champignon *Agaricus bisporus*, (Turner *et al.*, 1975) im Weißfäulepilz *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002), im Austernseitling *Pleurotus ostreatus* (Giardina *et al.*, 1996) oder in der humanpathogenen Schwarzen Hefe *Cryptococcus neoformans* (Williamson, 1994) beschrieben. Während Laccasen aus Basidiomyceten schon seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt sind und demzufolge auch intensiver untersucht sind als die Laccasen aus Ascomyceten, rückten letztere erst in den letzten beiden Jahrzehnten in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Ascomycetische Laccasen finden sich u.a. in den filamentösen Pilzen *Aspergillus nidulans* (Scherer & Fischer, 1998) und *Trichoderma atroviride* (Hölker *et al.*, 2002) oder in der Schwarzen Hefe *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen *et al.*, 2002).

Auch bakterielle Laccasen werden zunehmend beschrieben (Fernandez *et al.*, 1999; Castro-Sowinski *et al.*, 2002; Claus, 2003). Multikupferoxidasen mit Eigenschaften, die denen der beschriebenen Laccasen sehr ähnlich sind, sind darüber hinaus sogar in Insekten und einigen Crustaceae beschrieben worden (*Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina*, *Manduca sexta* und *Sarcophaga bullata*, Gianfreda *et al.*, 1999). Tabelle 1.1 gibt einen Eindruck von der Zahl der bereits untersuchten Laccasen in den verschiedenen Organismengruppen.

**Tab. 1.1: Übersicht über die Anzahl der beschriebenen Laccasegensequenzen** aus den Internetdatenbanken Broad Institute, DOE Joint Genome Institute, Ashbya Genome Database und NCBI Genbank nach Hoegger *et al.*, 2005.

	Anzahl der in die Datenbanken eingestellten Laccasegen-Sequenzen
<b>Basidiomyceten</b>	146
<b>Ascomyceten</b>	108
<b>Zygomyceten</b>	5
<b>Pflanzen</b>	62
<b>Tiere</b>	12
<b>Bakterien</b>	29

### 1.3.4 Funktionen

Da das Substratspektrum der Laccasen wie erwähnt sehr breit ist, sind auch die Funktionen dieser Enzyme vielfältig. Neben der Ligninsynthese katalysieren Laccasen ebenfalls die Polymerisation anderer komplexer Substanzen wie z.B. Tannin, Melanin und bestimmte Alkaloide (Gianfreda *et al.*, 1999; Clutterbuck, 1972; Hölker *et al.*, 2002). Auch die umgekehrte Reaktion, nämlich die Depolymerisation dieser komplexen Substanzen, wird von Laccasen katalysiert (Call & Mücke, 1997). Ein typischer Depolymerisierungsvorgang ist der Abbau des pflanzlichen Lignins durch die oxidativen Enzyme der basidiomycetischen Weißfäulepilze. Bei anderen Basidiomyceten, wie z.B. *Armillaria mellea* scheint es einen Zusammenhang zwischen Laccaseaktivität und Fruchtkörperbildung zu geben. Bei *Aspergillus nidulans* zeigten Scherer & Fischer (1998) eine Laccase, die während der sexuellen Reproduktionsphase gebildet wird.

Bei *Botrytis cinerea*, einem Pflanzenpathogen, schreibt man der pilzlichen Laccase eine Funktion bei der Wirt-Pathogen-Beziehung zu. So werden von den Pflanzen als Abwehr auf den pilzlichen Befall verschiedene aromatische Verbindungen (Phytoalexine) gebildet, die

durch die pilzliche Laccase wahrscheinlich oxidiert und durch Polymerisation unschädlich gemacht werden können. Es wird außerdem angenommen, dass das durch die Laccase gebildete Melanin die Phytoalexine bindet oder die Pilze vor einer Entdeckung durch die Pflanze schützt (Marbach *et al.*, 1984, Mayer & Staples, 2002).

Auch in humanpathogenen Pilzen, insbesondere in den opportunistischen „Schwarze Hefen“, spielen Laccasen eine Rolle. Allgemein wird postuliert, dass die Laccasen die Bildung des die Zellen schützenden Melanins katalysiert. Bei der Laccase von *Cryptococcus neoformans* stellt das gebildete Melanin einen Schutz vor der menschlichen Immunantwort dar. Deshalb sind die Laccasen und das von ihnen gebildete Melanin Virulenzfaktoren in *C. neoformans* (Williamson, 1997). Außerdem wird durch die *C. neoformans* Laccase der körpereigene Neurotransmitter Dopamin oxidiert, was Symptome wie Muskelkrämpfe bis hin zur Degeneration des zentralen Nervensystems zur Folge haben kann. *C. neoformans* ist nicht der einzige Vertreter von opportunistischen oder humanpathogenen Pilzen. Pigmentierte Pilze spielen immer häufiger eine fatale Rolle bei der Infektion von immunsuppressiven Patienten (Gomez & Nosanchuk, 2003; Nosanchuk, 2003). Laccasen bzw. das durch sie gebildete Melanin werden hier wie bei *C. neoformans* als Pathogenitätsfaktoren diskutiert. Die Rede ist z.B. von *Aspergillus fumigatus* (Langfelder *et al.*, 2003), *Histoplasma capsulatum* (van Duin, 2002), *Exophiala dermatitidis* (Feng *et al.*, 2001), *Paracoccidioides brasiliensis* oder *Sporothrix schenckii* (Hamilton & Gomez, 2002, Gomez & Nosanchuk, 2003).

Allgemeiner kann man Laccasen auch eine Rolle bei der Humusbildung im Boden und damit im Kohlenstoffkreislauf zusprechen. Viele der besprochenen laccaseproduzierenden Organismen leben innerhalb der Bodenmatrix, so dass organisches Material im Laufe der Humifizierung, durch die Katalyse von Laccasen und Peroxidasen, in Huminsäuren, Fulvinsäuren, Huminstoffe und weitergehende komplexe Substanzen abgebaut werden kann. Sogar polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) oder TNT (2,4,6-Trinitrotoluol) können humifiziert werden (Bollag *et al.*, 1988; Thiele *et al.*, 2002).

### **1.3.5 Industrielle Applikation**

Aufgrund ihres Potenzials, verschiedene normalerweise toxische phenolische Substanzen umzusetzen, wurden Laccasen als Enzyme für die Bioremediation ins Auge gefasst. Der Grundgedanke ist dabei, dass durch Industrie oder Deponien verunreinigte Böden und Abwässer von Schadstoffen befreit werden (Gianfreda *et al.*, 1999; Junghanns, 2005). Die



Schadstoffe können so z.T. abgebaut, entgiftet oder an die Huminsäurematrix aus dem Boden angelagert werden, so dass die Bioverfügbarkeit herabgesetzt wird (s. 1.3.4).

In der Papierindustrie werden Laccasen zur Delignifizierung der Papierpulpe eingesetzt. Dies führt zu einer energieeffizienteren Papierbleiche und zur Trennung der einzelnen Fasern im Holz, einer Grundvoraussetzung für die Papierherstellung (Reid, 1995; Jakob, 1999). Bei der Bleichung werden die meist phenolischen färbenden Substanzen durch das Enzym verdaut. Dies ist eine optimale Vorbehandlung für die chemische Bleichung durch Chlor bzw. Sauerstoff und erleichtert diese Verfahren erheblich. Auch eine Bleichung von Textilien ist mit Laccasen durchführbar (Gianfreda *et al.* 1999).

Laccasen werden außerdem zur Aufbereitung von Getränken verwendet. Oft sind phenolische Substanzen (Farb- oder Bitterstoffe) in Säften oder auch in Wein enthalten, die durch eine Behandlung mit Laccasen entfernt werden können. Dies geschieht z.B. bei der Entrübung von Apfelsaft (Gianfreda, 1999).

Auch die Modifikation von Naturstoffen für die Pharmaindustrie ist ein mögliches Einsatzgebiet für Laccasen (Pilz *et al.*, 2003; Schäfer *et al.*, 2001). Lindequist und Schauer (2002) versuchen Naturstoffe mit Hilfe von Laccasen so zu modifizieren, dass sie eine bessere Verträglichkeit, bessere Bioverfügbarkeit oder gesteigerte Aktivität zeigen. Ein Beispiel ist die Umwandlung von Kaffeesäure zu Hydrokaffeesäure. Diese Substanz zeigt u.a. eine Aktivität gegen das Herpes-Virus. Eine andere Applikation ist die Modifikation einer Cephalosporinvorstufe zur Entwicklung eines neuen Antibiotikums (Agematu *et al.*, 1993). Die typischen Laccasesubstrate, polyphenolische Substanzen, haben aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung potenziell gesundheitsfördernde Wirkung und stellen deshalb ein sinnvolles Zielobjekt für aktivitätssteigernde oder die Bioverfügbarkeit verbessernde Modifikationen dar.

Eine Laccase mit Optimum im sauren pH-Bereich wird immer dann in der Industrie benötigt, wenn die Verfahren besondere Ansprüche an die pH-Stabilität und Aktivität des Enzyms stellen. Besonders in der Textilfärbung, in der Getränkeindustrie und in einigen Prozessen bei der Modifikation von Naturstoffen wäre eine solche saure Laccase von Vorteil. Die Laccasen aus der acidophilen Schwarzen Hefe *H. acidophila* könnten das bisher vorhandene Potenzial an Laccasen deshalb möglicherweise sinnvoll ergänzen.

## **1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit**

Da *H. acidophila* kurz vor Beginn dieser Arbeit erstmalig beschrieben worden war, gab es zu diesem Zeitpunkt keine Informationen über die Hefe selbst und die von ihr synthetisierten Enzyme. Die schwarze Pigmentierung (Melanin) des acidophilen Mikroorganismus legte jedoch das Vorhandensein eines an der Melaninsynthese beteiligten oxidativen Enzyms nahe, das aufgrund der Anpassung der Hefe an niedrige pH-Werte interessante Eigenschaften in Bezug auf pH-Optima und pH-Stabilität erwarten ließ. Da oxidative Enzyme, die im Säuren optimal arbeiten auch für die biotechnologische Industrie von Interesse sind (s.1.3.5), sollte das oxidative Enzym aus *H. acidophila* in der vorliegenden Arbeit einer eingehenden Untersuchung unterzogen werden. Da *H. acidophila* selbst wie gesagt noch unbeschrieben war, stellte die Etablierung und Adaption von Methoden eine besondere Schwierigkeit dar. In Vorversuchen zu dieser Arbeit wurde das Vorhandensein des oxidativen Enzyms gezeigt, das aber in sehr geringen Konzentrationen vorlag. Folgende Ziele wurden daher in der vorliegenden Arbeit verfolgt:

- Nachweis der Oxidase auf enzymatischer Ebene
- Optimierung der Kulturbedingungen zur Steigerung der Bildung der Laccase, um eine Steigerung der Enzymkonzentrationen sowohl für eine Charakterisierung des Enzyms wie auch für eine spätere biotechnologische Nutzung zu erreichen
- Teilcharakterisierung, um eine Evaluierung der biotechnologischen Nützlichkeit zu ermöglichen. Hier sollte insbesondere die Hypothese überprüft werden, ob es sich bei der Oxidase um eine Laccase handelte und ob diese Laccase Eigenschaften eines acidophilen Enzyms wie optimale Aktivität und Stabilität im Säuren zeigte.

Im Verlauf der Arbeit stellte sich heraus, dass *H. acidophila* nicht nur eine, sondern mehrere Laccasen bildete. Deshalb wurden die weiteren Ziele wie folgt festgelegt:

- Untersuchung der Lokalisation der Laccase(n) mittels immunhistologischen Nachweises.
- Isolierung und Aufreinigung mindestens einer der Laccase(n) und Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz(en), um die Zuordnung der Proteine zu den Genen, die in einer parallel erfolgten Arbeit (Tetsch, 2005) untersucht worden waren, zu ermöglichen. Dadurch würde unter anderem die Grundlage geschaffen, die Laccasen aus *H. acidophila* überzuexprimieren, um so größere Mengen des Enzyms gewinnen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Mikroorganismen

Grundlage dieser Dissertation ist die im Jahre 2004 erstmals beschriebene schwarze Hefe *Hortaea acidophila* dH11932 bzw. CBS 113389. Es handelt sich um einen acidophilen Mikroorganismus der Ordnung Dothideales, der von einem humin- und fulvinsäurehaltigen Medium mit pH 0,6 isoliert wurde (Hölker *et al.*, 2004). Der Stamm wurde bei der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) hinterlegt. Für vergleichende Untersuchungen (Immunhybridisierung) wurde die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* verwendet.

### 2.2 Nährmedien

*H. acidophila* wurde in der Regel in Submers-Kulturen angezogen. Um *H. acidophila* aus Stammkulturen zu kultivieren, wurde festes Anzuchtsmedium in Form von Agarplatten verwendet. Es erfolgte außerdem eine Anzucht im Feststofffermenter, um die Ausbeute der extrazellulären Enzyme zu steigern.

#### 2.2.1 Medien zur Stammhaltung und zur Materialgewinnung

**Anzuchtsmedium:** In der Regel wurde *H. acidophila* auf einem Medium nach Hölker *et al.* (2004) kultiviert. Dieses Medium ist folgendermaßen zusammengesetzt:

1,2 %	Glukose
0,4 %	Trypton
0,12 %	Kaliumdihydrogenphosphat
0,08 %	Magnesiumsulfat
0,04 %	Dinatriumhydrogenphosphat
0,1 %	Spurenelementlösung (s. 2.2.3.)
ggf. 2 %	Agar

Der pH-Wert wurde in allen Flüssigmedien auf pH 3,5 eingestellt. In festen Medien wurde ein pH-Wert von 5 verwendet, da der Agar bei niedrigeren pH-Werten nicht erstarrte.

**PDA-Medium:** Alternativ zum normalen Anzuchtsmedium wurde für feste Medien ein Kartoffelextrakt-Glukoseagar verwendet, der nach Herstellerangaben (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zubereitet wurde.

## 2.2.2 Medien für die Anzuchtsoptimierung

Zur Steigerung der Laccaseaktivität in den Kulturen wurden Kulturmedium und Anzuchsbedingungen optimiert. Im Gegensatz zur vorhergegangenen Inkubation wurden jeweils Vorkulturen für die Inokulierung der Kulturen verwendet (s. 2.4). Die im Folgenden genannten Enzymtests werden unter 2.4.5 und 2.7 beschrieben. Es wurden Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, die Kupferkonzentration, der pH-Wert, die Schüttelfrequenz und die Inkubationstemperatur wie im Folgenden beschrieben verändert:

### **Inkubationstemperatur**

Das Wachstum von *H. acidophila* wurde bei 15, 20, 25, 30 und 37 °C getestet, um die für die Laccaseaktivität optimale Inkubationstemperatur zu ermitteln. Die Anzucht erfolgte in 100ml-Erlenmeyerkolben (50 ml Kultur) bei 150 rpm Schüttelfrequenz, Trypton als Stickstoffquelle, Sorbitol als Kohlenstoffquelle, pH 3,5 und 250 µM Kupfersulfat. Die Inkubation erfolgte im temperierten Wasserbad, da hier die Temperaturen am genauesten eingestellt werden konnten. Die Auswertung erfolgte nach fünftägiger Inkubationszeit und es wurden folgende Parameter bestimmt: Laccaseaktivitäten an den Zellen und im Kulturüberstand, Biomasse und Melanin Gehalt im Kulturüberstand. Die Anzucht bei 37 °C erfolgte nicht in Submerskultur sondern auf PDA-Platten, da diese über einen längeren Zeitraum inkubiert werden mussten, da kein oder nur sehr geringes Wachstum zu erwarten war.

### **pH-Wert**

Für den Versuch zur Optimierung des pH-Wertes wurde Anzuchtsmedium (2.2.1) auf die pH-Werte 3-6 eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C, 250 µM Kupfersulfat, 120 rpm mit Glukose als Kohlenstoff- und Trypton als Stickstoffquelle in 100ml-Erlenmeyerkölbchen (je 50 ml Kultur). Der Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und nach 5 Tagen Wachstum ausgewertet. Es wurden Laccaseaktivität und Melanin Gehalt im Kulturüberstand sowie die gebildete Biomasse bestimmt.

### **Stickstoffquelle:**

Alternativ zum Anzuchtsmedium mit der komplexen Stickstoffquelle Trypton, einem Caseinhydrolysat, sollte das Wachstum von *H. acidophila* auf definiertem Medium getestet werden. Dazu wurde folgende Zusammenstellung an Aminosäuren und Vitaminen verwendet, die anstelle des Tryptons eingesetzt wurde:

L-Glutaminsäure	1,3 g/l
DL-Valin	1,0 g/l
L-Lysin	0,85 g/l
L-Leucin	0,80 g/l
DL.Serin	0,61 g/l
DL-Threonin	0,50 g/l
L-Asparaginsäure	0,45 g/l
DL-Isoleucin	0,44 g/l
DL-Alanin	0,43 g/l
L-Arginin	0,40 g/l
DL-Methionin	0,37 g/l
DL-Histidin	0,30 g/l
DL-Phenylalanin	0,26 g/l
L-Tyrosin	0,21 g/l
L-Cystein	0,05 g/l
DL-Tryptophan	0,05 g/l
L-Prolin	0,05 g/l
Biotin	2 mg/l
Nicotinamid	10 mg/l
Thiamin HCl	10 mg/l

Die übrigen Anzuchtsbedingungen waren wie folgt: Das Medium enthielt 250  $\mu$ M Kupfersulfat und Glukose als Kohlenstoffquelle; die Kulturen wurden bei 120 rpm geschüttelt und bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 5 Tagen Wachstum. Es wurden folgende Parameter bestimmt: Zellzahl, Laccaseaktivitäten, Melaniningehalt. *H. acidophila* wurde in je drei parallelen Kulturen im 1-Liter Rund- bzw. Erlenmeyerkolben mit 250 ml Medium pro Kolben angezogen. Der Versuch wurde wegen der größeren Platzkapazität in Zusammenarbeit mit Dr. Hans-Peter Call in Übach-Palenberg durchgeführt.

Als anorganische Stickstoffquellen wurden anstatt Trypton eingesetzt: 30 mM Kaliumnitrat oder 30 mM Ammoniumsulfat. Die Kulturen wurden bei 25 °C über mehrere Wochen angezogen. Die Versuche wurden sowohl in Flüssig- als auch in Festmedien durchgeführt. Das Zellwachstum und die extrazelluläre Laccaseaktivität wurden dabei qualitativ verfolgt.

### **Schüttelfrequenz**

Die Schüttelfrequenz wurde von 130 über 150 und 180 bis zu 200 rpm variiert. Dieser Versuch wurde wegen der größeren Platzkapazitäten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Hans-Peter Call in Übach-Palenberg durchgeführt. Die Kulturen wurden bei 25 °C inkubiert, die Kupferkonzentration war jeweils 250  $\mu$ M. Es wurde Glukose als Kohlenstoff- und Trypton als Stickstoffquelle verwendet. Auch dieser Versuch wurde in drei Kulturen im 1-Liter Rundkolben bzw. Erlenmeyerkolben mit jeweils 250 ml Kultur durchgeführt. Eine

Auswertung erfolgte nach 4 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Laccaseaktivitäten an den Zellen und im Kulturüberstand bestimmt.

### **C-Quelle**

Es wurden Glukose, Saccharose, Xylose, Sorbitol, Galaktose und Glyzerin als Kohlenstoffquellen getestet. Die Zucker wurden jeweils 60,6 mM eingesetzt (das entspricht der Konzentration von Glukose im Ausgangsmedium). Die Zucker wurden dem unter 2.2.1 beschriebenen Anzuchtsmedium alternativ zu Glukose zugesetzt. Das Medium wurde auf pH 3,5 eingestellt, enthielt 250  $\mu$ M Kupfersulfat und Trypton als Stickstoffquelle, die Kulturen in 100ml-Erlenmeyerkolben wurden bei 120rpm geschüttelt und bei 25 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 5 Tagen Wachstum und es wurden Laccaseaktivität und Melaningehalt im Kulturüberstand sowie die Biomasse bestimmt. Der Versuch wurde in drei Ansätzen durchgeführt.

### **Laccaseinduktion**

Mit einer Erhöhung der Kupferkonzentration sollte eine Steigerung der Laccaseaktivität erreicht werden. Es wurde das unter 2.2.1 beschriebene Anzuchtsmedium verwendet und verschiedene Kupfersulfatkonzentrationen zugesetzt. Die Endkonzentrationen in den Kulturmedien waren: 0; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 5000; 10.000  $\mu$ M Kupfersulfat. Die Kulturen wurden bei pH 3,5, mit Glukose als Kohlenstoff- und Trypton als Stickstoffquelle, bei 150rpm Schüttelfrequenz und 25 °C für 5 Tage angezogen. Danach wurden die Laccaseaktivitäten an den Zellen, im Kulturüberstand und der Biomassezugewinn bestimmt.

Um die Toxizität von Kupfer bei höheren Zellzahlen (und Melaninkonzentrationen) zu untersuchen, wurde zu normal angewachsenen Hefekulturen nach 3 Tagen Inkubation zusätzlich 10 mM Kupfer zugegeben und kontrolliert, ob ein weiteres Wachstum der Hefe erfolgte.

Neben der Zugabe von Kupfer sollte mit einigen phenolischen Substanzen getestet werden, ob eine Steigerung der Laccaseaktivität erreicht werden konnte. Es wurden Huminsäuren und Phenolsulfonphthalein verwendet. Diese möglichen Induktoren wurden jeweils 0,02 %ig in der exponentiellen Phase der Hefekulturen zugefügt. 6, 24 und 36 Stunden nach Induktion wurde die Laccaseaktivität im Kulturüberstand bestimmt.

### **Ascorbinsäure**

Während des Wachstums von *H. acidophila* wurde Melanin ins umgebende Medium ausgeschleust und auch die Zellen waren stark melanisiert. Das Melanin störte oder erschwerte zahlreiche Methoden wie SDS-PAGE, Silberfärbung und Zellaufschluss. Durch Zusatz des Antioxidans Ascorbinsäure (s. 2.2.3) kann die Melaninbildung durch Verhinderung der Oxidationsreaktion, die den letzten Schritt der Melaninsynthese darstellt, unterbunden werden. Um melaninfreies Material an Zellen und Kulturüberstand zu gewinnen, wurde *H. acidophila* unter Zusatz von Ascorbinsäure angezogen. Um die Biomasseproduktion zu optimieren, wurden verschiedene Konzentrationen (final: 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %) zugesetzt. Es wurde Anzuchtmedium mit hoher (250 µM) und später nur noch mit geringer (0,04 µM) Kupfersulfatkonzentration verwendet. Der Verbrauch der Ascorbinsäure in den Kulturen wurde täglich kontrolliert. Dazu wurden Ascorbinsäure-Teststreifen verwendet, mit denen eine semiquantitative Auswertung der Ascorbinsäurekonzentration im Bereich von 50-2000 mg/l möglich war. Ausgehend von den Ergebnissen der Vorversuche wurde *H. acidophila* folgendermaßen angezogen: Zunächst wurde eine Vorkultur mit Zellen von festem Nährboden inokuliert (1 Million Zellen pro ml). Diese Vorkultur enthielt 50ml Anzuchtmedium mit 0,04 mM Kupfersulfat und 0,1 % Ascorbinsäure. Nach drei Tagen Schüttelinkubation bei 25 °C wurde die gesamte Vorkultur als Inokulum für die Hauptkultur eingesetzt und mit 150 ml Anzuchtmedium (0,04 mM Cu) und 0,5 % Ascorbinsäure versetzt. Nach weiteren zwei Tagen Inkubation wurden 20 ml 10%ige Ascorbinsäurelösung je Kolben zugesetzt und nach weiteren 2 Tagen die jetzt ausreichend dichten Kulturen abgeerntet.

### **Tricyclazol (BEAM®)**

Bei Tricyclazol handelt es sich um einen Inhibitor der DHN-Melaninsynthese, der die Reduktion des Tetrahydroxynaphthalins zum Scytalon verhindert. Deshalb wurde den Hefekulturen diese Substanz zugesetzt, um die Melaninsynthese zu hemmen. Es wurden final 30 µg Tricyclazol in 1 % Ethanol eingesetzt. Dazu wurde eine Tricyclazol-Stammlösung (s.2.2.3) verwendet, von der je 500 µl pro 50 ml Kultur zugegeben wurden. Die Zugabe erfolgte bei Kulturstart. Als Kontrollkulturen wurden Kulturen mit 1 % Ethanol und Kulturen ohne jeglichen Zusatz verwendet. Das Anzuchtmedium enthielt 0,04 µM Kupfersulfat. Sorbitol diente als Kohlenstoff-, Trypton als Stickstoffquelle. Die Kulturen wurden bei 25 °C und 120 rpm inkubiert und die Färbung der Kulturen dokumentiert.

### 2.2.3 Medienzusätze

#### Spurenelementlösungen mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen:

36 mM	Mangansulfat
38 mM	Zinksulfat
25 mM	Eisensulfat
2 mM	Kobaltchlorid
10 mM	Borat
17 mM	EDTA

Je nach Bedarf wurden verschiedene Kupfersulfatmengen zugesetzt. Im optimierten Anzuchtsmedium wurde eine Spurenelementlösung mit 250 mM Kupfersulfat eingesetzt.

#### Tricyclazol (BEAM®)

Tricyclazol ist ein bekannter Hemmstoff des DHN-Melanin-Syntheseweges und wurde zur Inhibierung der Melaninbildung in *H. acidophila* eingesetzt (s. 2.2.2). Die Stammlösung (3 mg/ml Ethanol) wurde 1:100 verdünnt eingesetzt, so dass final im Medium 30 µg Tricyclazol und 1 % Ethanol enthalten waren.

#### Ascorbinsäure

Ascorbinsäure ist ein Laccasesubstrat, durch dessen Zusatz zum Medium die Melaninsynthese gehemmt werden kann (s. 2.2.2). Die 10%ige Ascorbinsäurelösung wurde sterilfiltriert (Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm) und nach der Dampfsterilisation der Medien zugegeben.

#### Huminsäuren

Die in dieser Arbeit für die Laccaseinduktion verwendeten Huminsäuren wurden aus Braunkohle des Typs Bergheim, Lithotyp A, extrahiert. Dazu wurde fein gemörserte Kohle über Nacht in 1 N Natriumhydroxid gewaschen und anschließend bei 10.000g abzentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit konzentrierter Salzsäure bis auf einen pH-Wert von 1 titriert, um die Huminsäuren auszufällen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 10.000g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in aqua demin. aufgenommen. Die Huminsäureextraktion wurde nach Scheel 2000 (Dissertation) durchgeführt.



## 2.3 Puffer und Lösungen

### McIlvaine-Puffer (Citrat-Phosphat-Puffer)

Der Citrat-Phosphat-Puffer wurde nach McIlvaine (1921) hergestellt. Dieser Puffer diente als Standardpuffer für den ABTS-Test (s. 2.7.1). pH-Optima und –Stabilität wurden mit McIlvaine-Puffer ermittelt. Als Stammlösungen dienten 0,1 M Zitronensäure und 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat. Je nach gewünschtem pH-Wert wurden die Stammlösungen in unterschiedlichem Verhältnis zusammengegeben. Diese Mischungsverhältnisse sind in Tabelle 2.1 für die einzelnen genutzten pH-Werte dargestellt. Der pH-Wert der Puffer wurde vor der Verwendung mittels pH-Elektrode auf Richtigkeit überprüft und gegebenenfalls durch Zugabe der entsprechenden Stammlösung eingestellt.

**Tab. 2.1: Zusammensetzung des McIlvaine-Puffers bei den verschiedenen genutzten pH-Werten.** Die Werte sind in % angegeben. A: 0,1 M Zitronensäure, B: 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Dihydrat.

pH-Wert	2,5	2,6	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5
A	91,5	89,1	79,5	70,0	61,5	54,6	48,5	43,2	36,9	29,1
B	8,5	10,9	20,5	30,0	38,5	45,4	51,5	56,8	63,1	70,9

### Universalpuffer nach Britton & Robinson

Für den pH-Bereich von 2-12 bei der Messung der pH-Stabilität wurde dieser Puffer eingesetzt. Die Einhaltung einer konstanten Ionenstärke wurde beachtet.

Stammlösungen: A: 0,04 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
B: 0,2 M NaOH

Zu 25ml der Stammlösung A wurden x ml der Stammlösung B gegeben sowie y g Natriumperchlorat zum Ausgleich der Ionenstärke. Die Werte für x und y bei den einzelnen pH-Werten sind in Tabelle 2.2 angegeben.

**Tab. 2.2 Zusammensetzung des Universalpuffers nach Britton & Robinson.** Zu 25ml Stammlösung A (0,04M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) wurden die hier angegebenen Mengen an NaOH (x) sowie Natriumperchlorat (y) gegeben.

pH-Wert	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
x [ml]	1,36	4,57	6,06	8,7	10,47	13,13	15,06	17,03	19,5	20,86	25,0
y [g]	0,48	0,49	0,48	0,47	0,44	0,35	0,29	0,27	0,25	0,20	0,06

**Citrat-HCl-Puffer**

Citrat-HCl-Puffer (20 mM, pH 2) wurde für die Elution von der Kationenaustauschersäule verwendet (s. 2.15.5). Der pH-Wert wurde von pH 1,5-5 variiert und später auf pH 2 festgelegt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 10 M Salzsäure eingestellt. Dem Puffer wurde für die Verwendung in der Kationenaustauschchromatographie 20 mM (Low Salt Buffer) bzw. 1 M Natriumchlorid (High Salt Buffer) zugesetzt.

**TSN-Puffer**

TSN-Puffer wurde zum Zellaufschluss und zur Präparation der Laccasen aus den Zellen verwendet (s. 2.5.3.5). Der Puffer wurde modifiziert nach Hoffmann & Winston (1987) hergestellt:

2 % Triton X-100  
1 % SDS  
100 mM NaCl  
10 mM Tris (pH 8)  
1 mM EDTA

**Phosphatpuffer**

Der Phosphatpuffer wurde zur Elution der laccasehaltigen Probe von der Anionenaustauschersäule verwendet (s. 2.15.5).

Stammlösungen: 67 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
67 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

**Tab. 2.3 Zusammensetzung des Phosphatpuffers bei den verschiedenen pH-Werten.** Der Puffer wurde jeweils durch Mischung der Stammlösungen im angegebenen Verhältnis hergestellt.

<b>pH 5</b>	990 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$	10 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
<b>pH 6</b>	880 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$	120 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
<b>pH 7</b>	570 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4$	430 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

**Methylpiperazin-Puffer**

Der Methylpiperazin-Puffer (20 mM, pH 5) wurde zur Elution der Probe von der Anionenaustauschersäule verwendet (s. 2.15.5).

**Puffer für SDS-PAGE (s. 2.13)**

Alle Puffer für die Verwendung in der SDS-PAGE wurden mit Reinstwasser hergestellt.

Gelpuffer: 3 M Tris/HCl, pH 8,45  
0,3 % SDS

Anodenpuffer 0,2 M Tris/HCl, pH 8,9

Kathodenpuffer                    0,1 M Tris,  
    0,1 % SDS  
    0,1 M Tricin.

Probenpuffer für den Laccasenachweis im Gel:  
62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8  
2 % SDS  
20 % Glycerin  
0,025 % Bromphenolblau

### **Serva Blue G- Färbung**

Fixierlösung:                    50 % Ethanol  
    10 % Essigsäure

Färbelösung:                    0,025 % Serva Blue G  
    10 % Essigsäure

Entfärber:                        10 % Essigsäure

### **Coomassie-Färbung**

Färbelösung:                    10 % Essigsäure  
    40 % Ethanol  
    0,1 % Coomassie R-250

Entfärber:                        10 % Essigsäure  
    40 % Ethanol

Spezielle Entfärber für die Entfärbung von PVDF (Polyvinylidendifluorid)-  
Membranen:

Entfärber 1                        50 % Ethanol  
    7 % Essigsäure

Entfärber 2                        90 % Ethanol  
    10 % Essigsäure

### **Puffer für Western-Blot (s. 2.14)**

Transferpuffer für Nitrocellulosemembranen:  
25 mM Tris  
150 mM Glycin  
20 % Ethanol  
pH 8,3

Transferpuffer für PVDF-Membranen:  
Stammlösung:  
100 mM CAPS, pH 11  
ad 200 ml Reinstwasser

	Blotpuffer (PVDF-Membranen): 200 ml Stammlösung (s.o.) 200 ml Methanol 1600 ml Reinstwasser
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
TBS	20 mM Tris/HCl 140 mM NaCl pH 7,5
TBST	TBS + 0,1 % Tween-20 (v/v)
Blockierungslösung	PBS + 5 % Magermilchpulver

### **Ponceau-Färbung:**

Färbelösung:	0,2 % Ponceau S, 5 % Essigsäure
--------------	------------------------------------

### **Puffer für Präparative SDS-PAGE (s. 2.15.6)**

Laufpuffer	200 mM Glycin 25 mM Tris 3,5 mM SDS
------------	---

### **Puffer für 2D-Gelelektrophorese (s. 2.10)**

Rehydratisierungspuffer:	8 M Harnstoff 10 mM DTT (Dithiothreitol) 1 % CHAPS 0,25 % Bio-Lyte pH 3-6
--------------------------	--

### **Bradford-Reagenz**

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet.

100 mg Coomassie Blue G 250 in 50 ml 95%igem Ethanol 100 ml Phosphorsäure (85%) Ad 1000 ml mit aqua demin.
--

### **Deglykosylierungslösungen (s. 2.12)**

Reaktionslösung Perjodsäure:	100 mM Natriumacetat, pH 4,5 20 mM Perjodsäure
------------------------------	---

Reaktionslösung TFMS:	1 ml Anisol 2 ml Trifluormethansulfonsäure
-----------------------	---

Die Trifluormethansulfonsäure (TFMS)-Reaktionslösung wurde unter dem Abzug hergestellt und in einem geschlossenen Glasgefäß gelagert.

### Substratlösungen (s. 2.7)

ABTS	3 mM in aqua demin.
DMOP	20 mM in McIlvaine Puffer pH 4,5
Syringaldazin	0,004 % in 60% Ethanol
Guajacol	1 % in DMSO
Tyrosin	30 mM in 50µl 5M HCl gelöst, dann mit McIlvaine Puffer pH 4,5 aufgefüllt
L-DOPA	30 mM in aqua demin.
DAN/ DHN	30 mM bzw. 1 M in DMSO

Testlösung DAN/ DHN für den Test nach der SDS-PAGE:  
50 mM Natriumacetat, pH 5  
1 % Dimethylsulfoxid (DMSO)  
2 mM DHN bzw. DAN

### Esterasetestlösungen

Reaktionspuffer:	200 mM Phosphatpuffer, pH 7
Substratlösung:	2 mg/ml FDA-Lösung in Aceton

## 2.4 Kultivierungsverfahren

### 2.4.1 Stammhaltung

*H. acidophila* wurde in halbjährlich erneuerten Glycerinkulturen bei -80 °C gelagert und regelmäßig auf ihre Aktivität geprüft. Für die Glycerinkulturen wurden auf festen Nährböden angezogene Hefekolonien in 17 % sterilem Glycerin aufgenommen ( $1,8 \times 10^8$  Zellen pro ml) und bei -80 °C eingefroren.

### 2.4.2 Anzucht im Schüttelkolben

Die Kultivierung erfolgte zunächst auf festen Nährböden, die mit einem Inokulum aus der Stammkultur angeimpft wurden. Nach 5-10 Tagen Inkubation bei 25 °C wurden die Zellen in 10ml sterilem aqua demin. aufgenommen. Aus dieser homogenen Zellsuspension wurde je 1ml abgenommen ( $2 \times 10^8$  Zellen pro ml) und als Inokulum für 200ml-Vorkulturen eingesetzt. Aus diesen Vorkulturen wurde nach 5 Tagen Wachstum (exponentielle Phase) 1ml zu 200 ml Anzuchtsmedium gegeben. Für die Versuche zur Bestimmung der optimalen Kupferkonzentration im Medium wurden Zellen von festem Nährmedium in sterilem Wasser suspendiert und 250 µl pro 50 ml Kultur als Inokulum eingesetzt, um eine Kupferkontamination durch das Medium der Vorkultur auszuschließen.

### **2.4.3 Anzucht im Feststofffermenter**

Die Hefe wurde in einem kleinen Fungtrix der Firma Bioreact, Troisdorf, kultiviert. Bei diesem Fermenter handelt es sich um einen Feststoffreaktor, der speziell für die Anzucht von Pilzen entwickelt wurde. Gedacht ist der Fermenter u.a. für die Produktion von größeren Mengen an extrazellulären Enzymen. Bei der Kultivierung erfolgt die Anzucht auf einem festen Substrat oder inerten Träger. In diesem Fall wurde PU-Schaum (Asil<sup>R</sup>) als Trägersubstanz verwendet. Von diesem Schaum wurden die verdichteten Ränder entfernt und ca. 1,5 cm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten. Der kleine Fungtrix wurde mit zwei Animpfdüsen, einer Rieseldüse und einer Peristaltikpumpe ausgestattet. Vor Inbetriebnahme des Reaktors wurde der Fungtrix im Autoklaven dampfsterilisiert. Der Fermenter wurde über eine der Animpfdüsen mit 10ml einer Schüttelkolbenkultur aus der exponentiellen Phase inokuliert. Als Rieselmedium wurden zunächst 90ml Anzuchtsmedium (s. 2.2.1) verwendet und durch die Rieseldüse über das Substrat-Festbett verrieselt. Während der Kultivierung bei Raumtemperatur wurde der Fermenter kontinuierlich mit 730 ml Luft pro Minute belüftet. Beim Start der Kultivierung wurde das Rieselmedium mehrmals für einige Minuten im Kreislauf gepumpt. Danach erfolgte die Berieselung einmal alle 24 Stunden. Täglich wurden 16ml Probe entnommen und die entsprechende Menge mit Medium aufgefüllt. Die Proben wurden einem Laccasetest (s. 2.7.1) unterzogen. Nach zehn Tagen wurde der Fermenter durch dreifaches Spülen mit 80, 110 und 60 ml McIlvaine-Puffer pH 4,5 abgeerntet. Auch die Spülrückstände wurden einem Laccasetest unterzogen. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Rolf Pracht durchgeführt.

### **2.4.4 Anzucht auf Agarplatten**

Die Anzucht der Stammkulturen erfolgte immer zunächst auf festen Medien. Dabei wurde bei den Versuchen zur Laccaseoptimierung festes Anzuchtsmedium (2.2.1) für die Vorkulturen verwendet. PDA-Medium wurde für die Versuche zur Materialgewinnung (Stammhaltung u.ä.) genutzt. Prinzipiell eigneten sich beide Medien. Da es sich bei PDA-Medium um ein Fertigmedium handelt, ist die Herstellung aber weniger aufwändig. Der pH-Wert der festen Medien konnte nicht auf den eigentlich optimalen pH-Wert von pH 3,5 eingestellt werden, da Agar unterhalb von pH 5 nicht erhärtet. Deshalb wurde das Medium auf den minimal möglichen pH-Wert, also 5, eingestellt.

## **2.4.5 Bestimmung des Biomassezugewinns**

Neben der Laccaseaktivität wurde bei den Wachstumsversuchen auch der Biomassezugewinn dokumentiert. Die optimale Methode für diesen Zweck musste zunächst ermittelt werden, da nahe lag, dass der Melanin Gehalt der Proben mit der Messung der Optischen Dichte interferieren könnte. Deshalb wurden die verschiedenen Tests zur Biomassebestimmung anfänglich parallel durchgeführt. Außerdem wurde eine Kalibrierung von optischer Dichte gegen Trockengewicht und Zellzahl vorgenommen, so dass der optischen Dichte jeweils ein Trockengewicht bzw. eine Zellzahl zugeordnet werden konnte.

### **2.4.5.1 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer. Die Probe wurde dabei auf maximal 30 Millionen Zellen pro ml verdünnt, da bei höheren Konzentrationen keine verlässliche Zählung mehr möglich war. Gezählt wurde unter dem Lichtmikroskop bei 600facher Vergrößerung. Es waren neben Hefe- auch einzelne Hyphenstadien in den Proben vorhanden. Bei der Zellzahl wurde jedoch keine Unterscheidung der verschiedenen Zelltypen vorgenommen.

### **2.4.5.2 Trockengewichtsbestimmung**

Für die Trockengewichtsbestimmung wurden Membranfilter mit einem Ausschlussvolumen von 0,45 µm verwendet. Diese wurden in einem Aluminiumschälchen gewogen. Nach der Applikation der Probe wurden die Filter über Nacht bei 110 °C getrocknet und vor dem erneuten Auswiegen für 20 Minuten im Exsikkator abgekühlt. Es wurden in der Regel 2-10 ml Kultur (je nach Kulturdichte) auf die Filter gegeben und mit dem doppelten Probenvolumen Reinstwasser gewaschen, um Medienbestandteile zu entfernen.

### **2.4.5.3 Optische Dichte**

Die optische Dichte wurde bei 600 nm gegen Kulturüberstand bzw. Medium gemessen. Die Proben wurden je nach Kulturdichte so stark mit Kulturüberstand bzw. Medium verdünnt, dass die optische Dichte unter 0,3 lag. Der Fehler, der durch die melaninbedingte Färbung des Kulturüberstandes entstand, wurde durch Nutzung des entsprechend verdünnten Kulturüberstandes als Referenz ausgeglichen.

### **2.4.6 Zentrifugation**

Wenn nicht anders angegeben, wurde bei 4 °C, 23.600g für fünf Minuten zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417 R). Die Zellernte erfolgte in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge, da hier ein größeres Volumen (200 ml) benötigt wurde. Letztgenannte Zentrifugation erfolgte bei 10.000g.

## **2.5 Präparation der intrazellulären bzw. zellassozierten Laccasen und der Laccase aus dem Kulturüberstand**

Sowohl mit Kulturüberstand als auch mit Zellen von *H. acidophila* konnte im ABTS-Test eine Laccaseaktivität nachgewiesen werden. Um die Aufreinigung dieser Enzyme zu ermöglichen, mussten die Laccasen zunächst isoliert werden. Im Falle der zellassozierten Laccasen wurden verschiedene Versuche zur Ablösung der möglicherweise an die Zellwand gebundenen Laccase unternommen sowie verschiedene Zellaufschlussmethoden zur Isolierung der intrazellulären Laccasen erprobt. Die Enzymkonzentration der freien Laccase im Kulturüberstand war zu gering, um direkt damit arbeiten zu können. Deshalb musste der Kulturüberstand zunächst aufkonzentriert werden.

### **2.5.1 Zellernte**

Die Zellen aus den *H. acidophila*- Kulturen wurden in 200ml-Zentrifugenbechern in einer Sorvall-Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und Schwebeteilchen wurden vor der weiteren Verwendung mittels Filtration über Blaubandfilter (Porenweite ca. 2µm) entfernt. Die Zellen wurden in McIlvaine-Puffer pH 4,5 gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das resultierende Sediment wurde dann in dem jeweils benötigten Puffer aufgenommen.

### **2.5.2 Behandlung der Zellen mit Salzen und SDS**

Da keine Informationen über die Art der Bindung der Laccase an die Zellen zur Verfügung standen, wurden die Zellen mit dem Detergenz SDS oder hohen Salzkonzentrationen gewaschen, um die zellassozierte Laccase abzulösen.

15 ml einer *H. acidophila*-Kultur aus der stationären Wachstumsphase wurden zentrifugiert und das resultierende Sediment in aqua demin. aufgenommen. Die Sedimente wurden einmal



mit aqua demin. gewaschen. Danach wurden den Sedimenten 3 ml 1,7 mM SDS zugesetzt. Die SDS-Konzentration wurde gewählt, da sie laut Literatur (Castro-Sowinski *et al.*, 2002) die Aktivität von Laccasen nicht hemmt. Bei bakteriellen Laccasen wurde sogar eine aktivierende Wirkung von SDS in dieser Konzentration nachgewiesen. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit demineralisiertem Wasser statt SDS parallel geführt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben abzentrifugiert und sowohl das sich ergebende Sediment als auch der Überstand wurden in einen ABTS-Test (s.2.7.1) eingesetzt.

Die Zellen wurden mit verschiedenen Salzen behandelt, um festzustellen, ob sich die zellassoziierte Laccase mit ein- oder zweiwertigen Kationen von den Zellen ablösen lässt und um damit ggf. auch Rückschlüsse auf die Art der Bindung der Laccase an die Zellen ziehen zu können. Es wurden je  $5 \times 10^8$  Zellen mit 1ml verschiedener Salzlösungen (0,5 M) versetzt:  $MgCl_2$ , NaCl,  $MgSO_4$ ,  $CaCl_2$ . Zur Kontrolle wurden in aqua demin. aufgenommene Zellen parallel behandelt. Die Proben wurden dann 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach der Salzbehandlung wurden die Proben zentrifugiert und sowohl die Zellen als auch der resultierende Überstand wurde einem Laccasetest (2.7.1) unterzogen.

### **2.5.3 Zellaufschlussmethoden**

Um die mit den Zellen assoziierte Laccaseaktivität zu isolieren, wurden verschiedene Zellaufschlussmethoden getestet und die Laccaseaktivität im jeweiligen Zellextrakt bestimmt.

#### **2.5.3.1 Mörsern in flüssigem Stickstoff**

Diese Methode wurde nach Raeder & Broda (1988), modifiziert von Scheel (2000) durchgeführt. Dazu wurde eine *H. acidophila*-Kultur abgeerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Danach wurden die Zellen in einem Mörser zu feinem Pulver zerrieben. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde mikroskopisch untersucht.

#### **2.5.3.2 Zellaufschluss durch Eiskritallinduktion**

Ein ml *H. acidophila*-Kultur aus der stationären Phase wurde abzentrifugiert, das Sediment in 1ml McIlvaine-Puffer pH 2,6 aufgenommen und einem fünffachen Zyklus aus Einfrieren (bei -20 °C) und Auftauen (in Eiswasser) unterworfen. Vor und nach dem Versuch wurde die

Laccaseaktivität mit ABTS als Substrat bestimmt. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde mikroskopisch untersucht.

### **2.5.3.3 Ultraschallbehandlung**

Es wurde ein Zellaufschluss mittels Ultraschallstab (Branson Sonifier Cell Disruptor B15) bzw. Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super 10P) durchgeführt.

Beim Ultraschallstab wurden 6ml Hefesuspension für viermal 3 Minuten in Pulsen beschallt. Zwischen den einzelnen Behandlungen wurde die Probe auf Eis gekühlt um der Hitzeentwicklung entgegenzuwirken. Anschließend wurde die Probe einer Zentrifugation unterzogen und der Überstand abgenommen, in dem dann zur Erfolgskontrolle die Laccaseaktivität bestimmt wurde. Zum Vergleich wurde unbehandelte Hefesuspension verwendet. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde lichtmikroskopisch untersucht.

Für das Ultraschallbad wurden jeweils 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäße (Safe Lock) mit 1,5ml Hefesuspension gefüllt und über 30 Minuten beschallt. Das Bad wurde dazu mit Eiswasser gefüllt, um die Proteine vor Aktivitätsverlust durch Erwärmung zu schützen. Anschließend wurde wie bei den Proben, die mit dem Ultraschallstab behandelt wurden, verfahren und die Überstände einem Laccasetest (s.2.7.1) unterzogen. Der Erfolg des Zellaufschlusses wurde mittels Lichtmikroskopie überprüft.

### **2.5.3.4 Fast-Protein Red-Zellaufschluss-Kit**

Da die anderen Methoden nicht zu einem zufrieden stellenden Zellaufschluss mit Isolierung der Laccaseaktivität geführt hatten, wurde ein weiteres Aufschlussverfahren getestet. Es wurde das Kit „Fast ProteinRed“ verwendet, das speziell für den Aufschluss von Pilz- und Zellen geeignet sein sollte. Dazu wurden die Zellen einer dicht gewachsenen Kultur zentrifugiert ( $10^9$  Zellen, 1000g, 5 Minuten, 4 °C), in 300 µl des mitgelieferten YBB-Puffer (Yeast Breakage Buffer, Zusammensetzung unbekannt) aufgenommen und in ein FastProteinRed Reaktionsgefäß mit speziellen Aufschlussperlen gegeben. Je  $5 \times 10^8$  Zellen wurde 1 µl Proteaseinhibitor-Cocktail zugegeben. Es folgte der Zellaufschluss in einem Ribolyser von Hybaid, Tedding/UK für dreimal 20 Sekunden, Stärke 6. Nach diesem Schritt wurden die Proben für eine Minute bei 10.000g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch überprüft. Der zellfreie

Überstand wurde abschließend einem ABTS-Test (2.7.1) und einer Proteinbestimmung (2.7.10) unterzogen.

#### **2.5.3.5 Zellaufschluss mittels Glassbeads**

Die Methode, die schließlich als Standard für die Isolierung der Laccasen von den Zellen verwendet wurde, ist im Folgenden dargestellt: Zur Präparation der zellassozierten Laccasen wurden die Zellen mechanisch mit Glassbeads aufgeschlossen. Dazu wurde eine fünf Tage alte Kultur zunächst abzentrifugiert und die Zellen einer Gefrietrocknung unterzogen. Die lyophilisierten Zellen (ca.  $5 \times 10^9$  Zellen) wurden in TSN-Puffer (s. 2.3) aufgenommen und mit Glassbeads im Ribolyser (Hybaid, Tedding/UK) aufgeschlossen. Als optimal für Zellaufschluss und maximale Enzymaktivität erwiesen sich 8 Ribolyser-Zyklen à 45 Sekunden auf höchster Stufe (Stufe 6). Um die Enzymaktivität aufrechtzuerhalten, wurde die Proben nach jedem Zyklus für mehrere Minuten auf Eis gekühlt.

Optimiertes Protokoll:

- 1) Es wurden je  $10^9$  Zellen pro Reaktionsgefäß verwendet und einmal in McIlvaine-Puffer pH 4,5 gewaschen. Um die Zellen danach problemlos resuspendieren zu können, wurde die Zentrifugation bei 1000g durchgeführt.
- 2) Das Sediment, das sich nach dem Zentrifugationsschritt ergab, wurde in 500 µl TSN-Aufschlusspuffer aufgenommen und mit einem halben 0,5ml-Reaktionsgefäß Glassbeads versetzt.
- 3) Die Proben wurden 8 Zyklen zu je 45 Sekunden im Hybaid Ribolyser unterzogen. Nach jedem Zyklus wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis gekühlt, da das Gerät kein integriertes Kühlaggregat besaß. Nach 4 Zyklen wurde das Gerät für eine halbe Stunde abgekühlt, um es wieder auf normale Betriebstemperatur zu bringen.
- 4) Der Zellextrakt wurde mittels Zentrifugation (20.000g) von den Zelltrümmern getrennt. Der zellfreie Zellextrakt wurde bei -20 °C gelagert.

Die Glassbeads wurden vor ihrem Einsatz zum Zellaufschluss säurebehandelt (1 Stunde in Salpetersäure und danach mit aqua demin. bis zur Neutralität gewaschen), um die Oberfläche aufzurauen.

#### **2.5.4 Trennung verschiedener Zellfraktionen**

Nach dem erfolgreichen Zellaufschluss sollte die Fragmentierung von Zelltrümmern, ggf. noch intakten Zellkompartimenten und intakten Zellen mit Hilfe eines Saccharosegradienten erreicht werden. Der Gradient wurde folgendermaßen geschichtet: 60, 50, 40, 30 und 20% Saccharose. Die Zentrifugenröhrchen mit dem Gradienten wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren und danach bei 4 °C langsam aufgetaut. 1ml Probensuspension wurde auf den Gradienten gegeben und für 30 Minuten bei 3.500g zentrifugiert. Anschließend wurden die verschiedenen Fraktionen regeneriert und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

#### **2.5.5 Ultrafiltration des Kulturüberstandes**

Die freie Laccase wurde durch Abzentrifugieren der Zellen und Dekantieren des Kulturüberstandes gewonnen. Allerdings waren die Enzymaktivitäten in diesem Rohextrakt sehr gering. Um höhere Laccasekonzentrationen für die nachfolgenden Versuche zu erhalten, erfolgte deshalb eine Aufkonzentrierung der Proben. Dazu wurden eine VivaCell 250 (Sartorius, Göttingen), eine 150ml-Filtron-Ultrafiltrationseinheit oder ein LV Centramate Tangential Flow System mit Minim™ Tangential Flow Filtration System von Pall, Dreieich verwendet. Das Prinzip war in allen Fällen eine Ultrafiltration über Druckluft. Im Gegensatz zu VivaCell und Filtron-Ultrafiltrationseinheit wurde beim Tangential Flow Filtration System der Filter nicht senkrecht, sondern tangential angeströmt. Das Ausschlussvolumen betrug zunächst 10 kDa, später jeweils 30 kDa (die 10 kDa Filter verblockten zu schnell). Die kleinen Proteine sowie Salze wurden dementsprechend aus der Probe entfernt und die größeren Proteine inklusive der Laccasen aufkonzentriert. Um eine Verblockung der Filter zu verhindern, wurde der Kulturüberstand vor der Ultrafiltration über einen Blaubandfilter (Ausschlussvolumen 2 µm) gefiltert, um Schwebeteilchen zu entfernen.

Die Proben wurden bei einem Maximaldruck von 4 bar (60 psi), die mit einem Kompressor erzeugt wurden, bis zu 400fach aufkonzentriert und anschließend in je 1 ml großen Aliquots bei -20 °C eingefroren. Während des Ultrafiltrationsvorganges wurden VivaCell und Filtron-Ultrafiltrationseinheit auf Eis gekühlt und geschüttelt. Weiterhin wurden die Filter regelmäßig gespült, um das sich dort angelagerte Melanin zu entfernen. Diese Maßnahmen waren beim Tangential Flow Filtration System nicht notwendig, da der Filter nicht verblockte und die Ultrafiltration so schnell ging, dass eine Kühlung unnötig war. Die Laccaseaktivität wurde vor und nach der Ultrafiltration mittels ABTS-Test bestimmt.

### **2.5.6 Saure Melaninfällung**

Da Melanin im Sauren nicht gut löslich ist, wurde die Möglichkeit einer Melaninausfällung durch Erniedrigung des pH-Wertes ins Auge gefasst. Eine zehn Tage kultivierte Kultur wurde abgeerntet und der pH-Wert des Kulturüberstandes mit konzentrierter Salzsäure auf pH 3 eingestellt. Danach wurde die Probe unter Standardbedingungen zentrifugiert und der resultierende Überstand dekantiert. Die Kulturüberstände wurden vor und nach Säurebehandlung in einem ABTS-Test auf Laccaseaktivität hin überprüft.

## **2.6 Gefriertrocknung**

Zur stabilen Lagerung der laccasehaltigen Proben wurden sowohl Kulturüberstände als auch Zellen lyophilisiert. Prinzip der Gefriertrocknung ist das Einfrieren der Proben mit darauf folgendem Anlegen eines Vakuums, so dass das Wasser aus den Proben sublimiert. Zurück bleibt ein Lyophilisat, das in der Regel gut haltbar ist. Vorteil der Methode ist, dass sie relativ schonend ist und sich deshalb auch für temperaturempfindliche Proben eignet. Die Gefriertrocknung erfolgte ohne Zusatz von Hilfsstoffen in einem Lyovac GT 2 der Firma Steris und wurde in Zusammenarbeit mit Dr. H.P. Call durchgeführt. Nach der Gefriertrocknung wurden alle Lyophilisate bei -20 °C gelagert. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch Ausplattieren auf PDA-Platten überprüft. Außerdem wurden die Lyophilisate in regelmäßigen Abständen mittels ABTS-Test (s. 2.7.1) auf ihre Laccaseaktivität geprüft, um die Lagerungsfähigkeit festzustellen.

## **2.7 Enzymassays**

Bei einer laccasekatalysierten Reaktion wird ein Substrat oxidiert und in der Regel Sauerstoff zu Wasser reduziert. Viele so genannte chromogene Substrate verfärben sich bei dieser Oxidation, was für eine Messung bei der entsprechenden Wellenlänge am Spektrophotometer ausgenutzt werden kann. Zur Bestimmung der Laccaseaktivität wurden verschiedene Tests mit chromogenen und nicht chromogenen Substraten durchgeführt. Letztere wurden indirekt über die Bestimmung der Sauerstoffabnahme im Ansatz gemessen. Außerdem wurde eine Aktivitätsfärbung von Laccasebanden nach der SDS-PAGE etabliert. Neben der Laccaseaktivität wurden auch Proteingehalt und relative Melaninkonzentration bestimmt. Es wurden Optima- und Stabilitätsbestimmungen durchgeführt.

Bei den photometrischen Tests wurde der Reaktionsverlauf je nach Enzymaktivität für 1-10 Minuten verfolgt und der Extinktionsunterschied pro Zeiteinheit aus der linearen Phase bestimmt. Über die in Abb. 2.1 dargestellte Formel wurden aus diesen Werten die resultierenden Volumenaktivitäten in mU/ml errechnet. Zur Ermittlung der spezifischen Laccaseaktivität (mU/mg) wurde die Volumenaktivität auf den Proteingehalt der Probe bezogen.

$$A = \frac{\Delta E/t \cdot V_{\text{ges.}}}{\epsilon \cdot d \cdot V_{\text{pr}}} \cdot 1000 \text{ [mU/ml] bzw. } [\mu\text{M/min}]$$

**Abb. 2.1: Formel zur Errechnung der Volumenaktivitäten.** Die Bedeutung der Abkürzungen ist im Folgenden dargestellt:  $V_{\text{ges}}$  = Gesamtvolumen;  $V_{\text{pr}}$  = Probenvolumen;  $E$  = gemessene Extinktion;  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient;  $d$  = Schichtdicke der Küvette;  $A$  = Volumenaktivität des Enzyms. Zur Ermittlung der spezifischen Enzymaktivität (mU/mg) wurde die Volumenaktivität auf den Proteingehalt bezogen.

Die zellassozierte Laccaseaktivität wurde zu Beginn der Arbeit folgendermaßen bestimmt: 1ml Kultur wurde zentrifugiert und das resultierende Sediment wurde in 1350  $\mu\text{l}$  McIlvaine Puffer aufgenommen. Die Reaktion wurde dann gestartet durch Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  3 mM ABTS. Vor Messung im Photometer wurde die Probe für eine Minute abzentrifugiert und der Überstand sofort im Photometer vermessen. Wegen des Verlustes an Zellmaterial durch Zentrifugation und Resuspendierung und wegen der Ungenauigkeit in der Reaktionszeitangabe durch den abschließenden Zentrifugationsschritt wurde im späteren Verlauf der Arbeit Zellsuspension direkt aus den Hefekulturen entnommen und in den ABTS-Test eingesetzt. Es wurden nicht mehr als 100  $\mu\text{l}$  Kultur verwendet, da sonst die Eigenfärbung der Probe zu Verfälschungen hätte führen können. Es ergab sich die Messung einer Gesamtaktivität (sezernierte und zellassozierte Laccase), von der die parallel bestimmte Laccaseaktivität im Kulturüberstand abgezogen wurde, um die Aktivität der zellassozierten Laccase zu erhalten.

Eine Unit (U) wurde definiert als  $\mu\text{mol}$  oxidiertes Substrat pro Minute. Eine Unit bezieht sich auf einen Liter Probe. Die Werte wurden deshalb meist in mU/ml angegeben. Die spezifische Laccaseaktivität wurde in mU/mg Protein angegeben. Als Positivkontrolle wurden die Assays mit einer kommerziell erhältlichen Laccase (aus *Coriolus versicolor*) durchgeführt.

### 2.7.1 ABTS-Test

Ansatz:	McIlvaine-Puffer (0,1 M, pH 2,6)	800 $\mu$ l
	Probe	100 $\mu$ l
	ABTS (3 mM)	100 $\mu$ l

Als Substrat für den Laccasetest wurde in dieser Arbeit standardmäßig ABTS (2,2'-Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-Schwefelsäure) eingesetzt. Dieses färbt sich in seiner oxidierten Form grün und weist bei 420 nm ein Absorptionsmaximum auf, was im Spektrophotometer detektierbar ist. Ist eine Laccase in der Probe vorhanden, kommt es zur Oxidation und folglich Grünfärbung des ABTS (erste Oxidationsstufe, s. auch 1.3.2). Der Extinktionskoeffizient für ABTS bei 420 nm ist  $36,1 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$  (Childs & Bardsley, 1975). Für den Test wurden Puffer und Probe zusammengegeben und die Reaktion durch Zugabe des ABTS gestartet. In der Regel wurde die Extinktionsänderung pro Minute bei 420 nm dokumentiert. Der optimale pH-Wert wurde im Laufe dieser Arbeit bestimmt und der Test daraufhin standardmäßig bei pH 2,6 in McIlvaine-Puffer durchgeführt.

### 2.7.2 DMOP-Test

Ansatz:	Citrat-HCl-Puffer/ McIlvaine Puffer	800 $\mu$ l
	Probe	100 $\mu$ l
	DMOP (20 mM)	100 $\mu$ l

DMOP (2,6-Dimethoxyphenol) ist in seiner oxidierten Form braun und weist ein Absorptionsmaximum bei 468 nm auf. Dies wird für den colorimetrischen Test genutzt. Der Test wurde analog zum ABTS-Test (s. 2.7.1.) durchgeführt, die Reaktion wurde also durch Zugabe des Substrates DMOP gestartet. Wegen der meist geringen Enzymaktivitäten wurde, wenn nicht anders angegeben, ein Extinktionsunterschied ( $\Delta E$ ) pro 10 Minuten ermittelt. Mittels oben angegebener Formel (Abb. 2.1) lassen sich diese Werte in die zugehörigen Enzymaktivitäten umrechnen. Der Extinktionskoeffizient beträgt  $14,8 \text{ cm}^2 / \mu\text{mol}$  bei der gemessenen Wellenlänge (Solano *et al.*, 2001). Der optimale pH-Wert für die verschiedenen Laccasen wurde während dieser Arbeit bestimmt (s. 2.7.13).

### 2.7.3 Guajacol-Test

Ansatz:	McIlvaine-Puffer (0,1 M)	925 $\mu$ l
	Probe	50 $\mu$ l
	Guajacol	25 $\mu$ l

Bei dem Substrat mit dem Trivialnamen Guajacol handelt es sich um 2-Methoxyphenol. Die Guajacol-Oxidation wurde bei 470 nm im Spektrophotometer gemessen. Für diese Wellenlänge beträgt der Extinktionskoeffizient von Guajacol  $26,6 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$  (Doerge *et al.*, 1997). Auch bei diesem Substrat wurde der pH-Wert des Puffers variiert (pH 1-5). Für die Guajacol-Stammlösung wurde das Substrat in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Um Artefaktmessungen durch das dadurch im Ansatz vorhandene DMSO auszuschließen, wurde als Kontrolle ein Ansatz mit 25  $\mu\text{l}$  DMSO ohne Guajacol verwendet. Da die Aktivitäten mit Guajacol als Substrat extrem gering waren, wurde ein Extinktionsunterschied pro Stunde ermittelt. Es wurde nach der Messung stets überprüft, ob die Probe eine genügend hohe Laccaseaktivität mit ABTS aufwies, um sicher zu gehen, dass die geringen Aktivitäten nicht durch einen Aktivitätsverlust in der Probe bedingt waren.

#### 2.7.4 Syringaldazin-Test

Ansatz:	Natriumacetat-Puffer (0,1 M, pH 4,5)	333 $\mu\text{l}$
	Probe	333 $\mu\text{l}$
	Syringaldazin	333 $\mu\text{l}$

Der Syringaldazintest wurde modifiziert nach Leonowicz *et al.* (1981) durchgeführt. Die Proben wurden bei 525 nm im Photometer vermessen. Der Extinktionskoeffizient für diese Wellenlänge beträgt  $65 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ .

#### 2.7.5 DAN-Test

DAN (1,8-Diaminonaphthalin) ist in Lösung braun gefärbt und polymerisiert bei Oxidation. Es entsteht ein melaninartiges Polymer. Dies kann für einen Test im SDS-Gel ausgenutzt werden (s. 2.7.12). Um die DAN-Oxidation auch am Photometer messbar zu machen, sollte die Änderung der Extinktion über eine Abnahme der Braunfärbung infolge der Polymerisierung gemessen werden. Dazu wurde zunächst ein Spektrum von 190-1000 nm aufgenommen, um die Extinktionsmaxima zu bestimmen.

Ansatz:	Acetatpuffer (0,1 M, pH 5)	800 $\mu\text{l}$
	DAN (30 mM in DMSO)	10 $\mu\text{l}$

Anschließend wurde bei den ermittelten Maxima ein DAN-Test durchgeführt und die Änderung der Extinktion während der Reaktion bestimmt.



Ansatz:	Acetatpuffer (0,1 M, pH 5)	980 $\mu$ l
	DAN (30 mM in DMSO)	10 $\mu$ l
	Laccase ( <i>Coriolus versicolor</i> , 1 mg/ml)	10 $\mu$ l

### 2.7.6 Sauerstoffelektrode

Ansatz:	Substrat	36 $\mu$ l
	Probe	ca. 500 $\mu$ l, je nach Laccaseaktivität mit ABTS
	McIlvaine-Puffer (0,1 M, pH 4,5)	ad 3600 $\mu$ l

Das Substratspektrum wurde mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Beckmann) ermittelt. Da bei der von Laccasen katalysierten Reaktion Elektronen vom Substrat auf Sauerstoff übertragen werden, dieser also zu Wasser reduziert wird, stellt die Reduktion des Sauerstoffs ein Maß für die Laccasereaktion dar. Die Sauerstoffelektrode war an eine 3600  $\mu$ l fassenden Kammer angeschlossen, in der die Reaktionen abliefen. Die Sauerstoffabnahme wurde mittels Sauerstoffelektrode bestimmt und per Schreiber aufgezeichnet. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Sauerstoffelektrode wurde mit luftgesättigtem Wasser auf 100 % Sauerstoff geeicht, indem das Wasser mit einer Aquarienpumpe für mindestens 15 Minuten belüftet wurde. Die Nulllinie wurde durch Zugabe einer Spatelspitze des Reduktionsmittels Natriumdithionit erreicht. Die sich bei der Reaktion ergebende Sauerstoffabnahme in Prozent wurde durch Vergleich der Sauerstoffsättigung des Wassers (bei der gemessenen Puffertemperatur) in die resultierenden Sauerstoffkonzentrationen umgerechnet. Hierfür wurde die Tabelle von Truesdale *et al.* (1955) verwendet. Die Substrate wurden jeweils 30  $\mu$ M (Endkonzentration) eingesetzt. Bei der Messung der nicht aufgereinigten Rohextrakte wurden die Laccasen zum besseren Vergleich so eingesetzt, dass die Laccaseaktivitäten mit ABTS als Substrat gleich waren. ABTS wird von allen untersuchten Laccasen gut umgesetzt; deshalb wurde dieses Substrat für die beschriebene Kalibrierung verwendet. Für die Untersuchung wurden folgende Substrate eingesetzt: L-DOPA, Tyrosin, 1,8-Diaminonaphthalin, Ascorbinsäure, ABTS und 2,6-DMOP. Die Membran wurde täglich erneuert und die Sauerstoffelektrode danach geeicht. Es wurde jeweils auch die Entwicklung des Sauerstoffgehaltes bei Zugabe von Puffer und Probe ohne Substrat bzw. Puffer und Substrat ohne Enzym überprüft. Bei der Messung wurde darauf geachtet, dass die Zugabe der Substanzen jeweils die gleiche Zeit beanspruchte, um Verfälschungen, die durch die Reibungswärme des Magnetührers entstanden, zu vermeiden.

### 2.7.7 Amylasetest

Es wurde untersucht, ob in *H. acidophila*-Kulturen neben der Laccase- auch eine extrazelluläre Amylaseaktivität nachgewiesen werden konnte. Dazu wurde ein Amylase-Platten-Test durchgeführt. Es wurden Agarplatten aus Anzuchtsmedium mit 1 % löslicher Stärke hergestellt. Nachdem diese Platten 1-2 Tage gelagert und getrocknet worden waren, wurden mit einem Korkbohrer Löcher mit einem Durchmesser von 0,5 cm ausgestanzt, die mit 100 µl Zellsuspension gefüllt wurden. Die Kulturen, aus denen die Zellsuspension stammte, war unter den üblichen Bedingungen angezogen und nicht mit Stärke induziert worden. Die Platten wurden für 20 Stunden bei 30 °C bzw. Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 1-2 ml Lugolscher Lösung überschichtet. So wurde die verbliebene Stärke angefärbt. Der Amylasetest wurde als positiv gewertet, wenn sich helle Höfe um die Stanzstellen zeigten, hier also Stärke abgebaut worden war.

### 2.7.8 Proteasetest

Der Test auf eine extrazelluläre Protease bei *H. acidophila* wurde mit Hide Powder Azur (HPA) nach Rinderknecht *et al.* (1968) durchgeführt. Der Test beruht auf der hydrolytischen Abspaltung des Farbstoffes, der photometrisch nachgewiesen werden kann. Dazu wurden 6mg HPA mit 1 ml Kulturüberstand versetzt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurden die Proben mit 0,5 ml Phosphorsäure versetzt und zentrifugiert. Der Überstand wurde im Spektrophotometer bei 650 nm gegen eine parallel behandelte hitzeinaktivierte Probe gemessen.

### 2.7.9 Esterasetest

Ansatz:	Phosphatpuffer (pH 7)	800 µl
	Probe	200 µl
	FDA-Lösung	40 µl

Der Kulturüberstand sollte neben dem Test auf proteolytische Aktivität auch auf das Vorhandensein anderer extrazellulärer hydrolytischer Enzyme geprüft werden. Als Esterase-Substrat wurde FDA (Fluoresceindiacetat) eingesetzt. FDA ist allerdings nicht spezifisch für Esterasen, sondern es können auch andere hydrolytische Enzyme gemessen werden. Der Test wurde in 200 mM Phosphatpuffer pH 7 und FDA-Lösung (2 mg/ml in Aceton) durchgeführt. Im Photometer wurde für 30 Minuten bei 490 nm ein Reaktionsverlauf aufgezeichnet. Aus diesen Daten wurde die maximale Extinktionsänderung pro Minute ermittelt. Als Probe wurde

konzentrierter Kulturüberstand verwendet. Als Kontrolle wurde die gleiche Probe parallel für 20 Minuten gekocht, um die Enzymaktivität zu eliminieren. Bei der Auswertung wurde der Wert der Kontrolle von der der Probe abgezogen. Als Umrechnungsfaktor der Einheit Extinktionseinheiten pro Stunde in U/ml wurde der empirisch ermittelte Proportionalitätsfaktor 9,7 verwendet.

### 2.7.10 Proteinbestimmung

Ansatz:	Probe/ Wasserkontrolle	100 $\mu$ l
	Bradford-Reagenz	1000 $\mu$ l

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1971). Zu 100  $\mu$ l Probe wurde 1 ml Bradford-Reagenz gegeben, gut gemischt und für 10 Minuten inkubiert. Danach wurde die Extinktion sofort bei 595 nm gegen eine analog zu den Proben hergestellte Wasserprobe gemessen. Die Eichreihe (0-100  $\mu$ g/ml) wurde mit BSA als Standard erstellt.

Nach der Ionenaustauschchromatographie (s 2.15.5) lag der Proteingehalt der Proben unter der Nachweisgrenze des Bradford-Tests. Deshalb wurde der Proteingehalt bei diesen Proben aus der Absorption bei 280 nm geschätzt (Rehm, 2002). Für BSA gilt: 1 mg/ml ergibt eine OD-Einheit. In diesem Fall wurde eine Eichreihe mit verschiedenen konzentrierten Proben aus dem Kulturüberstand erstellt. Es wurden jeweils der Proteingehalt mit Bradfordreagenz und die Absorption bei 280 nm ermittelt. Es ergab sich ein Umrechnungsfaktor von 45, d.h. die Werte die bei der Absorptionsmessung gemessen wurden, mussten mit dem Faktor multipliziert werden, um den richtigen Proteingehalt zu erhalten [ $\mu$ g/ml]. Nach der Ionenaustauschchromatographie wurden die Werte so über die Absorption bei 280 nm abgeschätzt, da hier die Proteinkonzentrationen zu gering waren für eine Messung mit dem Bradfordreagenz oder nicht genügend Probe zur Verfügung stand.

### 2.7.11 Melaniningehalt

Um ein Maß für den Melaniningehalt der Proben zu haben, wurde gemessen, bei welcher Wellenlänge die melaninhaltigen Proben am stärksten absorbieren. Dazu wurde ein Spektrum des Kulturüberstandes von 200-800 nm aufgenommen. Zwischen 300 und 400 nm wurde ein Maximum detektiert. Der relative Melaniningehalt wurde deshalb über die Extinktion bei 350 nm ermittelt.

### 2.7.12 Laccasetest nach der SDS-PAGE

Durch die hier beschriebene Methode ist es möglich, einen Laccasenachweis in einem SDS-Gel ohne native Bedingungen durchzuführen. Die Proben werden dabei in einem Probenpuffer ohne reduzierende Agenzien (DTT oder Mercaptoethanol) aufgenommen. Dadurch bleiben die Disulfidbrücken der Proteine erhalten. Stabile extrazelluläre Enzyme wie Laccasen und Peroxidasen bleiben trotz Anwesenheit von SDS aktiv. Sogar die Quartärstruktur soll z.T. erhalten bleiben (Hoopes & Dean, 2001).

Zugrunde liegt diesem Test, dass nach der SDS-PAGE ein Laccasesubstrat oxidiert wird und an der Stelle, wo sich die Laccase befindet, eine gefärbte Bande sichtbar wird. Dadurch kann das Molekulargewicht der Laccase abgeschätzt werden. Als Substrate kommen im Prinzip alle von der untersuchten Laccase oxidierbaren Substanzen in Frage. 1,8-Dihydroxynaphthalin, eine für Ascomyceten typische Vorstufe des DHN-Melanin der Zellwand (z.B. *Cochliobolus heterostrophus*), ist ein typisches Laccasesubstrat, insbesondere für Laccasen von Ascomyceten. Da 1,8-DHN nicht erhältlich ist, wurden alternativ 1,6-DHN und 1,8-Diaminonaphthalin verwendet. Ein weiterer Vorteil dieser Substrate ist, dass sie im Gel polymerisieren und deshalb als Bande im Gel verbleiben und nicht wie beispielsweise ABTS innerhalb von Minuten weg diffundieren (Pracht, 2002). Der Test wurde modifiziert nach den Vorgaben von Hoopes und Dean (2001) durchgeführt. Als Proben wurde konzentrierter Kulturüberstand bzw. Zellaufschluss verwendet.

Vor der SDS-PAGE wurde die Probe 1:2 mit doppelt konzentriertem Probenpuffer versetzt. Die SDS-PAGE wurde wie unter 2.13 beschrieben, allerdings bei 4 °C, durchgeführt. Danach folgten die unten aufgeführten Schritte:

- 1) Waschen des Gels: Das Gel wurde zunächst in McIlvaine Puffer pH 4,5 gewaschen, um überschüssiges SDS zu entfernen, das den folgenden Aktivitätstest negativ beeinflussen könnte.
- 2) Aktivitätstest: Das Gel wurde in 50mM Natriumacetat mit 1 % Dimethylsulfoxid und 2 mM DHN bzw. DAN gegeben (dabei wurde das Substrat unmittelbar vor dem Gel in die vorgewärmte Lösung gegeben). Daraufhin wurde das Gel für ca. 30 Minuten bei 40 °C im Wasserbad geschüttelt. Bei positiver Reaktion zeigen sich braune Banden.
- 3) Der Reaktionsstopp erfolgte in einer Lösung aus 50 % Methanol mit 10 % Essigsäure bei 50°C für etwa 10 Minuten. Um die nicht aktiven Proteinbanden sichtbar zu machen, konnte an den Aktivitätstest auch eine Serva Blue Färbung angeschlossen werden. Die gefärbten Gele wurden in Folie eingeschweißt und mittels Scanner dokumentiert.

Zur Optimierung der Testbedingungen wurde der pH-Wert des Natriumacetat-Puffers variiert: Der Test wurde bei pH 2, 3, 4 und 5 durchgeführt. Außerdem wurde ein Renaturierungsschritt eingeführt, bei dem die SDS-Gele in Triton-X-Lösung gewaschen wurden, um evt. noch vorhandenes SDS zu entfernen.

### **2.7.13 pH-Optimum**

Das pH-Optimum wurde für die Substrate ABTS, DMOP und Guajacol bestimmt. Für pH 0,5-4,5 wurde Citrat/HCl-Puffer verwendet, für pH 4,5-7,5 McIlvaine-Puffer. In den Test wurden je 50 µl Probe eingesetzt. Entsprechend wurden 850 µl Puffer verwendet. Ansonsten wurde der Test zu den unter 2.7.1-2.7.3 beschriebenen Methoden durchgeführt. Die Proben wurden sofort nach Herstellung des Reaktionsansatzes im Photometer vermessen. Der Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Bei ABTS und DMOP wurde die Extinktionsänderung pro Minute, bei Guajacol wegen der geringen Aktivität die Extinktionsänderung pro Stunde bestimmt.

### **2.7.14 pH-Stabilität**

Für die Untersuchung der pH-Stabilität wurde Citrat/HCl-Puffer von pH 0,5-2 und der Universalpuffer nach Britton & Robinson von pH 2 bis 12 verwendet (s.2.3). Dabei wurden die Puffer so eingestellt, dass bei allen Puffern die Ionenstärke gleich war, so dass diese keinen verfälschenden Einfluss auf die Stabilität der Enzyme ausüben konnten. Die Proben (je 50µl) wurden mit 550 µl Puffer versetzt und 5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Ansätze auf Eis gelagert und mit McIlvaine-Puffer pH 2,6 umgepuffert. Dies wurde wie unter 2.8 beschrieben mittels VivaSpin6 Röhrchen (VivaScience) mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa durchgeführt. Die aufkonzentrierten Proben wurden jeweils auf 900 µl aufgefüllt und durch Zugabe von 100 µl ABTS einem Laccasetest unterzogen (s 2.7.1). Der Versuch wurde analog auch mit ganzen Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Behandlung abzentrifugiert und gewaschen bevor sie in den Laccasetest mit ABTS als Substrat eingesetzt wurden.

### **2.7.15 Temperaturoptimum**

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums der Laccase(n) aus dem *H. acidophila* Kulturüberstand wurde ein temperierbarer Revolver in das Spektrophotometer eingesetzt.

Hierbei wurden Temperaturen von 10 bis 90 °C getestet. Der Revolver wurde mit Hilfe eines Wasserbades auf die gewünschte Temperatur gebracht und die Temperatur in der Küvette mit einem Thermometer kontrolliert. Die Proben wurden dann einem ABTS-Test wie unter 2.7.1 beschrieben unterzogen und der Verlauf der Reaktion am Computer aufgezeichnet.

### 2.7.16 Temperaturstabilität

Ansatz:	McIlvaine-Puffer pH 2,6	890 µl
	Probe	10 µl

Die Ansätze wurden bei unterschiedlichen Temperaturen (45, 50, 60, 70, 80°C) im Thermomixer *comfort* (1,5 ml) von Eppendorf, Hamburg, inkubiert und nach 30, 60 und 120 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt und einem ABTS-Test (s. 2.7.1) unterzogen. Als Kontrolle wurde eine auf Eis gelagerte Probe verwendet. Für 70 und 80 °C wurde der Versuch mit kürzeren Inkubationszeiten wiederholt. So wurde die Temperaturstabilität nach 10 Sekunden und einer Minute gemessen. Als Proben wurde konzentrierter Kulturüberstand bzw. Zellextrakt verwendet.

### 2.7.17 Stabilität gegenüber potenziellen Inhibitoren

Zunächst wurde die Inhibierung der Laccasen durch Natriumazid untersucht. Natriumazid wirkt unspezifisch auf Enzyme mit Kupfer im aktiven Zentrum. So wird auch die Cytochromoxidase der Atmungskette durch Azid gehemmt. Es wurde ein ABTS-Test gestartet. Nach einer Minute wurden verschiedene Konzentrationen an Azid zugegeben. Das Abknicken der Kurven wurde am Photometer verfolgt und dokumentiert. Die Konzentration der Laccasen in der Probe wurde so gewählt, dass sich die Oxidationsreaktion nach einer Minute noch in der linearen Phase befand, was durch eine parallel durchgeführte Messung ohne Azid belegt wurde. Außerdem wurde je ein Ansatz durchgeführt, bei dem Azid von Anfang an im Reaktionsansatz vorhanden war.

Auch die typischen Laccase-Inhibitoren EDTA und SDS wurden auf ihre hemmende Wirkung überprüft, da diese Substanzen in Puffern und Lösungen bei zahlreichen Methoden eine Rolle spielen. Die Inhibitoren wurden 2 mM eingesetzt. Als Kontrolle wurde demineralisiertes Wasser in den Reaktionsansatz eingesetzt.

Ansatz:	20 µl Probe
	430 µl McIlvaine Puffer pH 2,6
	450 µl EDTA, SDS bzw. aqua demin.

Die Reaktionsansätze wurden für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach durch Zugabe von 100 µl ABTS die Laccaseaktivitäten bestimmt. Als Maß für die Hemmung wurde der prozentuale Aktivitätsverlust der Proben gegenüber der Wasserkontrolle verwendet.

Außerdem wurden die zellassozierten Laccasen (ganze Zellen) für eine Stunde mit 500 mM Kalzium- bzw. Magnesiumchlorid behandelt und anschließend einem Laccasetest mit ABTS als Substrat unterzogen. Zur Kontrolle, ob ggf. Laccase von den Zellen abgelöst wurde, wurde auch die Laccaseaktivität im salzhaltigen Überstand gemessen.

## ***2.8 Pufferwechsel mit VivaSpin***

Für Pufferwechsel, z.B. bei der Ermittlung der pH-Stabilität, und für die Konzentrierung kleinvolumiger Proben wurden Zentrifugalkonzentratoren von VivaScience, Hannover, verwendet. Je nach Probenvolumen waren dies die Konzentratoren VivaSpin 500 (500 µl), VivaSpin 6 (6 ml) oder VivaSpin 20 (20 ml). Die Anwendung erfolgte nach den Herstellerangaben. In der Regel wurde bei der maximal erlaubten Zentrifugalgeschwindigkeit eingengt. Dies entsprach 4.000g bei VivaSpin 6 und 20 sowie 10.000g bei VivaSpin 500. Die Proben wurden mindestens zweimal mit dem gewünschten Puffer gewaschen. Die Dauer des Konzentrierungsvorganges variierte bei den verschiedenen Proben. Melaninhaltige Proben aus dem Kulturüberstand und Zellaufschlussproben benötigten den größten Zeitaufwand. Da die Dauer für jede Probe neu abgeschätzt werden musste, wurde in 30-Minutenintervallen zentrifugiert und die Zwischenergebnisse kontrolliert. Insgesamt nahm der Vorgang mehrere Stunden in Anspruch. Um eine Beschädigung des Filters auszuschließen, wurde das Filtrat zur Kontrolle mittels ABTS-Test auf Laccaseaktivität geprüft. Bei den melaninhaltigen Proben wurden die Filter regelmäßig durch Auf- und Abpipettieren gespült.

## ***2.9 Isoelektrische Fokussierung***

Der Isoelektrische Punkt (pI), also der pH-Wert bei dem die Nettoladung eines Enzyms gleich Null ist, ist eine wichtige Kenngröße für die pH-Stabilität eines Enzyms. Außerdem wurden die Werte für die Planung der Bedingungen bei der Aufreinigung durch Ionenaustauschchromatographie benötigt. Zur Bestimmung des pI wurden zunächst Fertiggele der Firma Serva verwendet (Servalyt Precotes 3-10 und 3-6, Serva 42965). Die Fokussierung wurde in einer kühlbaren Flachgelanlage (2117 Multiphor II Elektrophorese-Einheit)

durchgeführt. Zur Identifizierung des Isoelektrischen Punktes wurde ein Standard von Amersham Biosciences Europe, Freiburg aufgetragen, der die in Tabelle 2.4 dargestellten Referenzproteine enthielt.

**Tab. 2.4: Referenzproteine für die Isoelektrische Fokussierung im pH-Bereich von 2,5-6,5.** Es wurde ein Kit von Amersham, Freiburg, (17-0472-01) verwendet.

Referenzprotein	pI (24°C)
Pepsinogen	2,80
Amyloglukosidase	3,50
Methylrot	3,75
Glukoseoxidase	4,15
Soja Trypsin Inhibitor	4,55
β-Lactoglobulin A	5,2
Bovine Carbonanhydrase B	5,85
Humane Carbonanhydrase B	6,55

Die Proben wurden über einen Filterpapierstreifen auf das Gel appliziert. Während der gesamten Laufzeit der Fokussierung wurde das Gel auf 4 °C gekühlt, so dass danach ein Aktivitätstest durchgeführt werden konnte. Dieser erfolgte modifiziert nach der Methode von Hoopes & Dean (2001), die diesen Test für SDS-Gele etablierten (s.2.7.12). Als Proben wurde konzentrierter Kulturüberstand bzw. Zellextrakt verwendet. Da für diese Methode extrem hohe Proteinkonzentrationen notwendig waren, um den Aktivitätstest erfolgreich durchführen zu können, wurde als Alternative eine 2 dimensionale Gelelektrophorese mit nachfolgender Immunfärbung zur Bestimmung von pI und Molekulargewicht der Laccasen durchgeführt.

## **2.10 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Die zweidimensionale Gelelektrophorese gliedert sich in Isoelektrische Fokussierung und SDS-PAGE, also Auftrennung nach isoelektrischem Punkt und nach Molekulargewicht. Für die isoelektrische Fokussierung wurden speziell für die Zweidimensionale Gelelektrophorese entwickelte IPG-Streifen (IPG = immobilisierter pH-Gradient) von Bio-Rad, Hercules, CA/USA verwendet, die nach der Endpunktfokussierung auf eine SDS-PAGE aufgelegt werden können. Die Methode wurde neben der Bestimmung des pI und des Molekulargewichtes der Laccasen zur Identifizierung von Isoenzymen verwendet.



Die Proben wurden für die zweidimensionale Gelelektrophorese einer TCA-Fällung (s. 2.13.1) unterzogen. Im Vergleich zur SDS-PAGE wurde die zehnfache Menge an Laccase ausgefällt (ca. 200µg). Das Sediment wurde für 5 Minuten in 200 µl Rehydratisierungspuffer des entsprechenden pH-Bereiches (pH 3-6) bei 30 °C im Thermomixer *comfort* (1,5 ml) von Eppendorf, Hamburg, solubilisiert. Um zu überprüfen, ob die Proteine vollständig gelöst waren, wurde die Probe kurz abzentrifugiert. Die Isoelektrische Fokussierung wurde in einer Protean IEF-Zelle von Bio-Rad, Hercules/ CA durchgeführt. Zunächst musste der IPG-Streifen mit der Probe befrachtet werden. Dazu wurde die Probe gleichmäßig in einer Vertiefung der Trägerschale verteilt und der IPG-Streifen nach Entfernen der Schutzfolie luftblasenfrei in die Trägerschale gelegt. Der Streifen wurde mit 1ml Mineralöl überschichtet, damit der im Rehydratisierungspuffer enthaltene Harnstoff nicht während der Fokussierung durch die Hitzeentwicklung auskristallisierte. Die IEF-Zelle ist im Vergleich zu der für die IEF-Gele verwendeten Kammer (s. 2.9) nicht kühlbar. Für Rehydratisierung und Isoelektrische Fokussierung wurde ein Programm erstellt, indem die Steigerung der Spannung für die Endpunktfokussierung festgelegt wurde.

Das Programm war folgendermaßen aufgebaut:

Rehydratisierung der Gelstreifen bei 30-50 Volt für 12 Stunden

Schritt 1): Linearer Anstieg der Spannung auf 250 V innerhalb von 20 Minuten

Schritt 2): Linearer Anstieg der Spannung auf 1.000 V innerhalb 1 Stunde

Schritt 3): Linearer Anstieg der Spannung auf 4.000 V innerhalb von 2 Stunden

Schritt 4): Schnelles Ansteigen der Spannungskurve mit 4.000V bis 10.000 Voltstunden erreicht waren

Schritt 5): 500V für 2 Stunden.

Schritt 5 wurde durchgeführt, damit die Proteine nicht zu diffundieren beginnen. Die eigentliche Endpunktfokussierung war bereits mit Schritt 4 abgeschlossen. Schritt 4 war jedoch zeitlich schwer kalkulierbar und deshalb wurde Schritt 5 als Pufferzeitraum einprogrammiert, damit Zeit blieb, die Streifen zu entnehmen. Wurde nach der Endpunktfokussierung eine Gesamtvoltstundenzahl von über 13.000 erreicht, war die Isoelektrische Fokussierung erfolgreich.

Auf die Isoelektrische Fokussierung folgte eine SDS-PAGE (s. 2.13). Es wurde hier keine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, sondern nur ein Trenngel verwendet. Um eine Auftragstasche für den Marker zu erhalten, wurde ein einzähniger Kamm genutzt. Der IPG-Streifen wurde luftblasenfrei auf das Trenngel aufgelegt, an einem Ende wurde dabei der

überstehende Steg entfernt und der Gelstreifen ohne Lücke an der dem Marker abgewandten Seite angelegt. Als Größenstandard wurden 5 µl Marker (SM0661 von MBI Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Es wurde für ca. 1,5 Stunden eine Spannung von 100 Volt angelegt. Sowohl Isoelektrische Fokussierung als auch die nachfolgende SDS-PAGE wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und die Laccasen wurden mittels Antikörpernachweis sichtbar gemacht (s. 2.14). Als Proben wurden konzentrierter Kulturüberstand und Zellextrakt eingesetzt.

## **2.11 Atomabsorbtionsspektrophotometrie (AAS)**

Mittels Atomabsorbtionsspektrophotometrie (AAS) ist eine schnelle quantitative Analyse verschiedener Metalle in wässriger Lösung möglich. Die Proben werden dabei in einer Trägergasflamme zerstäubt. Nach Anregung mit Licht einer definierten Wellenlänge kommt es zu einer messbaren Lichtabsorption durch das gesuchte Metall. Diese Absorption wird durch das Spektrophotometer gemessen und ist proportional zur Atomkonzentration. Für die Aussendung des definierten Lichtstrahls wird eine so genannte Hohlkathodenlampe verwendet, deren Kathode aus dem untersuchten Metall besteht.

In diesem Fall wurde die AAS zur Bestimmung des Kupfergehalts in Trypton und Anzuchtmedium sowie in den Zelltrümmern von *H. acidophila* verwendet. Es wurde das Atomabsorbtions-Spektrophotometer AA-660 der Firma Shimadzu, Japan, genutzt. Das Gerät besteht aus dem Spektrophotometer und einer regulatorischen Einheit, dem Gasregulator. Letzterer kontrolliert den Gasdruck und die Flussraten der Gase und verhindert so Gasverlust. Die kupferspezifische Hohlkathodenlampe wurde von Hamamatsu Photonics K.K., Japan, bezogen. Sie strahlt Licht der Wellenlänge 327,4 nm aus. Als Trägergas wurde Acetylen verwendet. Die AAS wurde analog zur Bedienungsanleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurde folgendermaßen vorgegangen: Nach Einschalten des Gerätes, des Abzugs und der Einstellung der Gaszufuhr (Druckluft 3,5 kg/cm<sup>2</sup>; Acetylen 0,9 kg/cm<sup>2</sup>) wurde die Hohlkathodenlampe montiert. Danach erfolgte automatisch eine Überprüfung auf Gasverlust durch den Gasregulator. Währenddessen wurden am Bedienelement des Gerätes die Parameter Spaltweite (0,25) und Wellenlänge (327,4 nm) eingestellt. Es wurde im HCL-Modus ohne Hintergrundabgleich gemessen. In einem nächsten Schritt wurden die Vergleichswerte der Eichreihen eingegeben. Zur Quantifizierung wurden Eichgeraden mit

Kupfersulfat erstellt (0-500  $\mu\text{M}$  und 0-100  $\mu\text{M}$ ). Schließlich wurde die Flamme entzündet und die Messung von Eichreihenwerten und Proben gestartet. Als Proben wurden eingesetzt: 0,4% Trypton, Anzuchtmedium, Zellwandfraktion von *H. acidophila*.

## **2.12 Deglykosylierung**

Extrazelluläre Proteine sind in der Regel glykosyliert, da das Vorhandensein der Zuckerreste auf der Enzymoberfläche die Stabilität, insbesondere auch gegen niedrige pH-Werte, erhöht. Diese Zuckerreste verändern das Laufverhalten in der SDS-PAGE, so dass das Molekulargewicht nicht exakt bestimmt werden kann. Für die Ermittlung des Molekulargewichtes der Laccasen und des Glykosylierungsgrades der Proteine sollte deshalb eine Deglykosylierung durchgeführt werden. Die Proben wurden verschiedenen Deglykosylierungsverfahren unterzogen und vor und nach der Behandlung in einer SDS-PAGE aufgetrennt um einen etwaigen Unterschied im Molekulargewicht zu dokumentieren. Als Positivkontrolle wurde die Laccase von *Coriolus versicolor* verwendet.

Zunächst wurde eine Oxidation der Zuckerketten mit **Perjodsäure** durchgeführt. Die Probe (ca. 2  $\mu\text{g}$  Protein) wurde dazu 1:1 mit einem doppelt konzentrierten Perjodsäurepuffer versetzt, für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert und anschließend gefällt.

Mit **Trifluoromethansulfonsäure** (TFMS) soll nach Rehm (2002) eine vollständige (90 %) chemische Deglykosylierung erfolgen, d.h., sowohl die O- als auch die N-glykosidisch gebundene Zucker sollen mit dieser Methode entfernt werden. Das N-Acetylgalactosamin am Serin bzw. Threonin bleibt bei dieser Methode erhalten. 4 $\mu\text{g}$  gefälltes Protein wurden mit 1ml der Reaktionslösung (s. 2.3) versetzt, für 2,5 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend gefällt.

Mittels  $\beta$ -Oxidation mit **Ammoniumhydroxid** können nach Rademaker *et al.* (1998) die O-glykosidisch gebundenen Zuckerreste abgespalten werden. Der Zuckerrest wird bei dieser Methode durch Ammoniak ersetzt, das Peptid bleibt jedoch intakt. Die Proteine (2  $\mu\text{g}$ ) wurden für 18 Stunden in 25 % Ammoniumhydroxid im Thermomixer (45 °C) inkubiert und anschließend gefällt.

Neben der bereits beschriebenen chemischen Deglykosylierung wurde außerdem eine enzymatische Deglykosylierung mit **Endoglykosidase H** durchgeführt. Mit dieser Methode werden die N-glykosidisch gebundenen Zuckerreste so vom Peptid abgespalten, dass ein Zuckermonomer am Asparagin verbleibt. Eine Spaltung der O-glykosidischen Bindungen ist nicht möglich. Es wurde die Endoglykosidase H von New York Biolabs verwendet und die Methode nach Herstelleranweisung durchgeführt. Das Protein (2 µg) wurde zunächst für 10 Minuten bei 99 °C im mitgelieferten Denaturierungspuffer denaturiert. Danach wurden Reaktionspuffer und Enzym zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung mittels VivaSpin 500 (s. 2.8).

## **2.13 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird traditionell angewandt, um Proteingemische im elektrischen Feld zu trennen. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes, zur Kontrolle des Aufreinigungserfolges sowie bei Zweidimensionaler Elektrophorese und als Vorbereitung auf Western-Blots verwendet.

### **2.13.1 Probenvorbereitung**

Eine **Chloroform-Methanol-Fällung** wurde modifiziert nach Wessel & Flügge (1984) durchgeführt. Zu 600 µl Probe wurden 600 µl Methanol und 150 µl Chloroform gegeben, gevortext und 10 Minuten bei 4 °C und 23.600g zentrifugiert. Die Oberphase wurde abgenommen und erneut 600 µl Methanol zugegeben, gevortext und wie zuvor zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand abgenommen und das resultierende Proteinsediment auf einem Heizblock getrocknet. Die Proteine wurden nun in Probenpuffer Roti-Load 1 der Firma Roth (Menge je nach Taschengröße des SDS-Gels 15-30 µl) aufgenommen und für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock solubilisiert. Der Probenpuffer Roti-Load 1 enthält sowohl SDS als auch DTT und reduziert somit die Disulfidbrücken. Durch das SDS kommt es aber im Gegensatz zur nativen Elektrophorese zu einer Maskierung der Eigenladung der Proteine und die Proteine wandern einheitlich abhängig von ihrer Größe durchs elektrische Feld. Die Erhitzung der Proben auf 95 °C soll eine Spaltung der Wasserstoffbrücken und damit ein Aufbrechen der Sekundär- und Tertiärstruktur sicherstellen. Sollte ein Aktivitätstest nach der SDS-PAGE durchgeführt werden, wurde ein Probenpuffer verwendet, der keine reduzierenden Agenzien wie DTT oder β-Mercaptoethanol enthielt (s. 2.3).

Bei Proben mit hohem Salzgehalt wie z.B. in den Zellextrakten wurden die Proteine nach Fällung mit der Methode nach Wessel und Flügge in der SDS-PAGE nicht distinkt aufgetrennt. Deshalb wurden auch andere Möglichkeiten der Konzentrierung der Proben getestet.

Bei der **TCA-Fällung** wurde zu 1ml Probe 333 µl TCA (75 %) gegeben und gevortext. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation bei 4 °C. Anschließend wurde die Probe für 20 Minuten bei 18.200g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 1 ml 80%igem eisgekühlten Aceton gewaschen. Nach Vortexen wurde die Probe für 15 Minuten bei -20 °C inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment getrocknet (Heizblock, 30 °C). Danach wurde wie bei der Chloroform-Methanol-Fällung Probenpuffer zugegeben und das Proteinsediment im Heizblock solubilisiert.

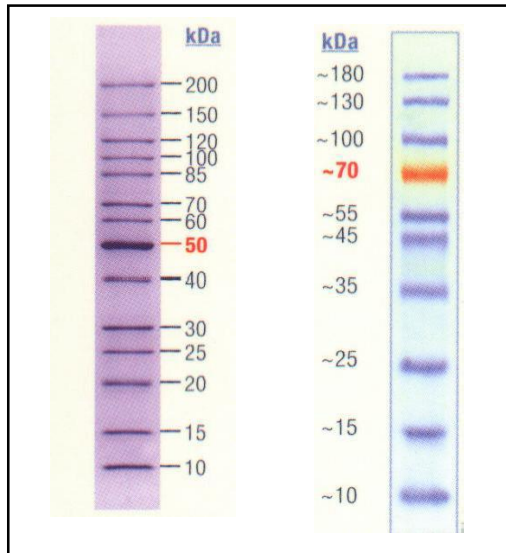
### **2.13.2 Versuche zur Erhöhung der Stringenz**

Um Schwierigkeiten bei der Reproduzierbarkeit der Laufhöhen der Proteinbanden entgegen zu wirken, sollte ausgeschlossen werden, dass während der Proteinfällungen ein Verdau der Peptidkette erfolgte. Zu diesem Zweck wurden die Proben über VivaSpin 500 Reaktionsgefäße aufkonzentriert. Außerdem wurden die Proben vor dem Auftragen aufs SDS-Gel mit Probenpuffer versetzt, der eine erhöhte SDS (6 %)- und DTT-Konzentration (4 %) aufwies. Außerdem wurden in einem weiteren Ansatz die Proben 5 bzw. 10 Minuten bei 95°C hitzebehandelt oder nur moderat auf 30 °C erhitzt.

### **2.13.3 Größenstandards**

Als Größenstandards wurden die Marker SM0661 (10-200 kDa) und der vorgefärbte Marker SM0671 (10-180 kDa) von MBI Fermentas, St. Leon-Rot verwendet. Beim ungefärbten Marker dient eine intensivere Referenzbande bei 50 kDa zur besseren Identifizierung der einzelnen Größen, beim vorgefärbten Marker liegt die hier rot gefärbte Referenzbande bei ca. 70 kDa. Laut Hersteller ergibt sich durch das Anhängen des gefärbten Epitops ein unterschiedliches Verhalten je nach Elektrophoresesystem, was zur Folge hat, dass für den gefärbten Marker nur ungefähre Molekulargewichte angegeben werden können. Aus diesem Grunde wurde wie empfohlen der vorgefärbte Marker gegen den ungefärbten kalibriert und die realen Größen der Proteinbanden für unser Elektrophoresesystem bestimmt. Diese

Auswertung erfolgte über eine Regression der Rf-Werte über den Logarithmus der Molekulargewichte. Nachfolgend ist das Bandenmuster der beiden Marker mit den vom Hersteller angegebenen Größen dargestellt (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2** Bandenmuster der Größenstandards SM0661 (links) und SM0671 (rechts) von Mbi Fermentas, St. Leon-Rot

#### 2.13.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Schägger und Jagov (1987) durchgeführt und basiert auf einem Laufpuffer-System auf Tris-Tricin-Basis. Es wurden ein Kathoden- und ein Anodenpuffer verwendet. Zur besseren Auftrennung der Proteine im mittleren bis hohen Größenbereich wurden 7%ige Gele hergestellt. Die Gele wurden vor Verwendung maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Die SDS-Konzentration in den Gelen betrug 0,1 %. Es wurde eine MiniProtean Zelle von Bio-Rad, Hercules, CA/USA verwendet. Für die Mini-Gele wurden 0,75 mm dicke Abstandhalter und Käme (maximal 10 Proben pro Gel) verwendet. Nach dem Probenauftrag wurde mit einem PowerSupply von Bio-Rad, Hercules, CA/USA eine konstante Spannung von 110 V angelegt. Diese wurde nach dem Übergang der Proben vom Sammelgel ins Trenngel auf maximal 150 V erhöht. Eine diskontinuierliche Gelelektrophorese wurde durchgeführt, da bei dieser Methode schärfere Banden zu erwarten sind und größere Probenvolumina aufgetragen werden können. Die Minigele waren folgendermaßen zusammengesetzt:

<b>Trenngel</b>	<b>10%</b>	<b>7%</b>
Reinstwasser	1,8 ml	3,67 ml
Rotiphorese Gel A (3037.1)	3,2 ml	3,45 ml
Rotiphorese Gel B (3039.2)	1,5 ml	1,38 ml
Gelpuffer (s. 2.3)	3,35 ml	5 ml
Glycerin	1,15 ml	1,5 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	50 µl	68 µl
TEMED	6,3 µl	8,6 µl

<b>Sammelgel:</b>	
Reinstwasser	5,6 ml
Rotiphorese Gel A (3037.1)	0,9 ml
Rotiphorese Gel B (3039.2)	0,375 ml
Gelpuffer (s. 2.3)	1,6 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	75 µl
TEMED	20 µl

### **2.13.5 Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen**

Um einen Aktivitätstest nach der SDS-PAGE durchführen zu können, musste die Struktur der Laccasen so weit wie möglich erhalten bleiben. Um dies zu gewährleisten, wurden keine denaturierenden Agenzien verwendet. Die Proben wurden ungefällt mit Probenpuffer versetzt, nicht hitzebehandelt und in die Probentaschen appliziert. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese selbst wurde analog zur reduzierenden Methode (2.13.4) durchgeführt. Die Elektrophorese wurde allerdings bei 4 °C durchgeführt, um die Enzymaktivität zu erhalten. Der sich anschließende Aktivitätstest ist unter 2.7.12 dargestellt.

### **2.13.6 Anfärbung der Proteine im Gel**

Nach der SDS-PAGE wurde eine Serva Blue G Färbung, eine Coomassiefärbung oder eine Silbernitratfärbung der Proteine im Gel vorgenommen.

Bei der **Coomassiefärbung** wurden die Gele für 1-15 Stunden in der Färbelösung gefärbt. Danach wurde der Hintergrund mit dem Entfärberreagenz (s. 2.3) wieder entfärbt. Meist wurde diese Methode jedoch zur Färbung von geblotteten Proteinen genutzt. Um eine Überfärbung der Blots zu vermeiden, wurde die Färbung auf 10 Minuten verkürzt und die Entfärbung mit Entfärbelösungen 1 und 2 sofort angeschlossen. Die Coomassie-Färbung hat eine Sensitivität von 200-400 ng pro Bande (Rehm, 2002).

Bei der **Serva-Färbung** wurden die Proteine zunächst für 45 Minuten mit Fixierlösung im Gel fixiert. Es folgte die Färbung der Proteine, die in der Regel über Nacht erfolgte, jedoch zumindest für 1 Stunde. Schließlich wurden die Gele mit Entfärberlösung gewaschen bis der Hintergrund klar war. Die Serva-Färbung wurde als Standard-Färbemethode für Gele in dieser Arbeit genutzt. Wurde offensichtlich, dass die Proteine zu gering konzentriert waren, um ein Signal zu erhalten, wurde nach der Entfärbung eine Färbung mit Silbernitrat angeschlossen, welche wesentlich sensitiver ist. Die Sensitivität der Serva Blue Färbung ist der von Coomassie-Lösung vergleichbar.

Die **Silbernitratfärbung** wurde mit dem RotiBlack Kit der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Prinzip der Silberfärbung ist die Komplexierung des Silberions mit bestimmten Aminosäuren der Proteine (Glutamat, Aspartat, Cystein). Aus diesem Grund werden verschiedene Proteine auch unterschiedlich angefärbt und die Färbung ist nicht quantitativ. Die Proteine wurden zunächst für 1-12 Stunden im Gel fixiert. Dann wurden die Gele mehrmals mit 15 % Ethanol gewaschen. Dann folgten Sensibilisierung, Imprägnierung und Entwicklung der Proteinbanden. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Gele jeweils mit Reinstwasser gewaschen. Bis die Banden entwickelt waren dauerte es in der Regel nur einige Minuten. Die Reaktion wurde dann mit Stopplösung abgebrochen. Formaldehyd, das die Silberionen ( $\text{Ag}^+$ ) zu Silber ( $\text{Ag}$ ) reduziert, wurde in allen Fällen frisch zugesetzt. Bei silbergefärbten Gelen kann man Proteine bis zu einer Nachweisgrenze von 5-30 ng pro Bande sichtbar machen.

### **2.13.7 Gel Trocknung**

Die Gele wurden in Folie eingeschweißt und mittels Scanner oder Digitalkamera dokumentiert.

## **2.14 Western-Blot**

Durch Western-Blot-Analyse sollten die Laccasen auf Molekulargewicht und Lokalisation hin untersucht werden. Der Western-Blot gliederte sich in die SDS-PAGE (s. 2.13), den Transfer der dort aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Cellulosenitrat BA 83, 0,2  $\mu\text{m}$ ), Immunhybridisierung mittels Antikörpern und den kolorimetrischen Nachweis der markierten Proteine. Auch für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen wurde ein Western-Blot durchgeführt. Allerdings wurde hierfür eine PVDF



(Polyvinylidendifluorid)-Membran statt der Nitrocellulose verwendet, da Nitrocellulose chemisch unbeständig und somit für die bei der Sequenzierung verwendeten Chemikalien anfällig ist.

### **2.14.1 Western-Transfer**

Der Western-Transfer wurde in einer Trans Blot Cell von Bio-Rad, Hercules/ CA durchgeführt. Der Blot wurde dabei möglichst luftblasenfrei in folgender Schichtung aufgebaut: Textilfaser, Whatman Filterpapier, SDS-Gel, Membran, Whatman Filterpapier, Textilfaser. Der Transfer erfolgte bei 4 °C und einer Spannung von 110 Volt für ca. 1,5 Stunden. Wurde die Spannung nicht erreicht, wurde die Transferzeit entsprechende verlängert. Je nachdem, ob der Transfer auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran erfolgte, wurden unterschiedlichen Transferpuffer verwendet (s. 2.3). Das Methanol im Blotpuffer wurde durch Ethanol ersetzt und aktiviert bei der Nitrocellulosemembran die Proteinbindungsstellen. Die PVDF-Membranen mussten wegen ihrer Hydrophobizität vor Gebrauch für 20 Sekunden in Methanol quellen.

Das Anfärben der Proteine auf dem Western-Blot erfolgte mittels Coomassie- (bei PVDF-Membranen) oder Ponceau-Färbung (bei Nitrocellulose- und PVDF-Membranen). Die Färbelösungen wurden bei der Verwendung mit Membranen nur einmalig verwendet. Die Färbung der Blots mittels Coomassie-Färbelösung erfolgte für 2 Minuten, es folgte eine Entfärbung mit Entfärberlösung 1 für 10 Minuten. Mit Entfärberlösung 2 wurde die Membran danach gewaschen bis der Hintergrund weiß war. Bei Färbung mit Ponceau S dauerte der Färbeschritt 5-10 Minuten. Im Folgenden wurde der überschüssige Farbstoff mit aqua demin. abgewaschen. Die Ponceaufärbung hat eine Sensitivität von ca. 50 ng/ Bande und ist vollständig reversibel. Im Anschluss an die Proteinfärbung wurde eine Immunfärbung durchgeführt.

### **2.14.2 Immunohybridisierung**

Es wurden folgende Primärantikörper verwendet: 1) polyklonaler Antikörper gegen die Laccase von *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen *et al.*, 2004), 2) polyklonaler Antikörper gegen die Laccase von *Ceriporiopsis subvermispora* (Ruel *et al.*, 1998). Beide Antikörper wurden im Kaninchen hergestellt. Als Sekundärantikörper wurde in beiden Fällen Anti-Kaninchen Alkaline Phosphatase verwendet. Bei der Immunfärbung wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 1) Die Blockierung mit PBS-Puffer + 5 % Magermilchpulver zum Absättigen der freien Proteinbindungsstellen auf der Membran erfolgte über Nacht.
- 2) Danach wurde dreimal für je 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen.
- 3) Im folgenden Schritt wurde das Gel für eine Stunde mit Primärantikörper inkubiert. Der Antikörper wurde dazu 1:2000 in TBST-Puffer + 1 % Magermilchpulver verdünnt.
- 4) Anschließend wurde dreimal für je 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen.
- 5) Der Sekundärantikörper wurde 1:8000 verdünnt (in TBST-Puffer + 1 % Magermilchpulver) und für mindestens eine Stunde auf die Membran gegeben.
- 6) Anschließend wurde fünfmal für 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und die Membranen danach in ein neues Gefäß überführt, um Verunreinigungen durch übrig gebliebenen Antikörper zu vermeiden.

Zunächst wurde TBS-Puffer statt TBST-Puffer verwendet (s.2.3). Um weniger Hintergrund zu haben, wurde dem TBS-Puffer im folgenden Tween 20 zugesetzt. Tween 20 hat eine ergänzende Wirkung als Blockierungsreagenz. Allerdings wird bei zu hohen Tween-Konzentrationen Protein vom Blot abgelöst.

### **2.14.3 Kolorimetrischer Nachweis**

Der Kolorimetrische Nachweis wurde mit 5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate (BCIP)/nitroblue tetrazolium (NBT) -Lösung durchgeführt. BCIP wirkt dabei als Substrat der alkalinen Phosphatase (Sekundärantikörper). Die Farbe der rötlich-braunen Präzipitate, die an den Reaktionsorten entstehen, wird durch NBT verstärkt. Durch Waschen mit aqua demin. wurde die Reaktion abgestoppt. Die Membran wurde dann auf Filterpapier getrocknet und dunkel gelagert.

## **2.15 Aufreinigungsmethoden**

Für die Aufreinigung der Laccasen aus dem Zellextrakt bzw. dem Kulturüberstand wurden verschiedene Methoden auf ihre Eignung geprüft, bevor eine Aufreinigungsstrategie entworfen wurde. Die Aufreinigung der Laccasen wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert.

### **2.15.1 Ammoniumsulfatfällung**

Eine Möglichkeit der nativen Fällung von Proteinen bietet das so genannte Aussalzen. Hierbei werden die Proteine nach ihrer Löslichkeit in wässrigem Milieu, also nach

Ladungsunterschieden, getrennt. Durch die Salzzugabe werden die weniger gut löslichen Proteine zuerst ausgefällt. Durch eine schrittweise Steigerung der Salzkonzentration erfolgt so eine fraktionierte Ausfällung von Proteinen. Die Aktivität der Proteine bleibt bei dieser Methode erhalten. Um die Methode auf Eignung zur Reinigung der *H. acidophila* Laccasen zu testen, wurde konzentrierter Kulturüberstand unter ständigem Rühren mit gemörsertem Ammoniumsulfat versetzt. Es wurde eine Reihe verschiedener Konzentrationen getestet: 10, 20, 30, 40, 50 %. Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden bei 23.000g abzentrifugiert und das entstandene Sediment in McIlvaine-Puffer, pH 2,6, aufgenommen. Es erfolgte ein ABTS-Test zur Überprüfung, ob Laccase ausgefällt wurde. Mit Zellextrakt und nicht aufkonzentriertem Kulturüberstand wurde der Versuch nicht durchgeführt, da das im Extraktionspuffer enthaltene Triton-X 100 mit dem Ammoniumsulfat interagiert hätte und die Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand ohne Aufkonzentrierung zu gering für eine Fällung gewesen wären (Rehm, 2002).

### **2.15.2 Laccasefällung mit Eisen(III)-Chlorid**

Dieser Fällung liegt das gleiche Prinzip zugrunde wie der Ammoniumsulfatfällung. Zu 1 ml Kulturüberstand wurde unter Rühren 0,2 g feinermörsertes  $\text{FeCl}_3$  gegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 4°C abzentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde erneut mit 0,2 g  $\text{FeCl}_3$  versetzt und es wurde ebenso verfahren wie nach der ersten Zugabe von  $\text{FeCl}_3$ . Die Sedimente wurden getrocknet und mit 500 µl McIlvaine-Puffer pH 2,6 versetzt. Auch hier wurden die Proben anschließend einem ABTS-Test unterzogen.

### **2.15.3 Ethanolfällung**

Laut Assavanig *et al.* (1992) ist eine Fällung von Laccasen durch Zugabe von Ethanol möglich. Es sollte getestet werden, ob sich diese Fällung eignet, um eine partielle Aufreinigung der Laccase aus *H. acidophila* zu ermöglichen. 500 µl Probe wurden mit 1500 µl eiskaltem Ethanol (99,8 %) versetzt und gevortext. Der Fällungsschritt erfolgte über Nacht bei 4 °C. Es folgte eine Zentrifugation bei 23.000g für 10 Minuten. Das resultierende Sediment wurde in 300 µl McIlvaine-Puffer, pH 2,6, aufgenommen und in einen Laccasetest (s. 2.7.1) und eine Proteingehaltsbestimmung (s.2.7.10) eingesetzt. Außerdem wurden die resultierenden Proben einer SDS-PAGE unterzogen.

#### **2.15.4 Gelfiltrationschromatographie**

Bei dieser Methode handelt es sich um die so genannte Größenausschlusschromatographie und die Trennung der Proteine erfolgt, wie der Name schon sagt, über die Größenunterschiede der Proteine. In dieser Arbeit wurden Fertigsäulen von Bio-Rad, Hercules/CA (EconoPac 10-DG) mit einem Ausschlussvolumen von 6 kDa verwendet. Die Methode wurde modifiziert nach dem angegebenen „Minimal Dilution Protocol“ durchgeführt: Die 10-DG-Säule wurde zunächst mit 20 ml des gewünschten Puffers äquilibriert. Dann wurden 500 µl der Probe aufgetragen und mit 2,5 ml Puffer gewaschen. Der resultierende Durchlauf wurde verworfen. Nach einer weiteren Zugabe von 1100 ml Puffer wurde die laccasehaltige Fraktion aufgefangen. Insgesamt wurden die Proben bei diesem Verfahren also 1:2,2 verdünnt.

Die Verwendung von Fertigsäulen hat den Vorteil der besseren Reproduzierbarkeit, birgt in diesem Fall aber den Nachteil des auf 3ml begrenzten Probenvolumens. Um die Gelfiltration in größerem Maßstab durchführen zu können, wurde deshalb ein weiterer Versuch durchgeführt. Dazu wurde eine Glassäule (150 ml) mit Bio-Gel P-6 DG befüllt und an das Bio-Rad-FPLC- Niederdruck System angeschlossen. Bei dem Säulenmaterial handelte es sich um das gleiche Material wie das, das in den Fertigsäulen enthalten ist. Die Schlauchverbindungsstücke wurden mit Teflonband abgedichtet. Als Probe wurden 6,5 ml konzentrierter Kulturüberstand aufgetragen. Als Puffer wurde McIlvaine Puffer pH 4,5 verwendet. Dieser wurde nach der Probe mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben. Die Trennung der Probenbestandteile wurde am Computer aufgezeichnet und die Fraktionen mit hohen UV-Absorptionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden anschließend einem Laccase-Test (s. 2.7.1) unterzogen. Dieser Versuch wurde analog auch mit dem Säulenmaterial Superdex 75 durchgeführt.

#### **2.15.5 Ionenaustauschchromatographie**

Bei der Ionenaustauschchromatographie binden die Proteine durch elektrostatische Wechselwirkungen an das Säulenmaterial und können durch Steigerung der Ionenstärke oder Änderung des pH-Wertes wieder abgelöst werden. Eine Trennung erfolgt hier nach Ladungsunterschieden. Dies kann man sich für die Proteinreinigung zunutze machen. Zunächst wurden pH-Stabilität (s. 2.7.14) und isoelektrischer Punkt (s. 2.9) der Laccasen ermittelt und daraufhin die optimalen Startbedingungen abgeleitet. Das optimale Verfahren zur Aufreinigung der Laccasen mit dieser Methode wurde mittels Variation der verschiedenen

Bedingungen ermittelt. So wurden Kationen- und Anionenaustauscher sowie verschiedene Start- und Elutionsbedingungen getestet. Bei Kationenaustauschern trägt die Matrix negativ geladene Gruppen, bei Anionenaustauschern positive. Die Bindung der Proteine an die Matrix hängt nun von verschiedenen Parametern wie Ionenstärke von Puffer und Probe, pH-Wert und pI sowie Ladungsdichte auf der Matrix ab. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf die Säule entsalzt.

### **Säulenmaterialien:**

Es wurden Fertigsäulen von Bio-Rad, Hercules CA/USA (EconoPac High S) und von Amersham Biosciences Europe, Freiburg (HiTrap DEAE FF) verwendet. Das Säulenvolumen betrug je 1 ml.

EconoPac High S ist ein starker Kationenaustauscher. EconoPac High S Säulen sind mit Macro-Prep<sup>®</sup> Säulenmaterial gepackt. Dieses Material besteht aus runden (50 µm Durchmesser), festen Partikeln mit SO<sub>3</sub><sup>-</sup> als funktioneller Gruppe.

HiTrap DEAE FF ist ein schwacher Anionenaustauscher. DEAE (Diethylaminoethyl) Sepharose Fast Flow ist das Säulenmaterial, mit dem diese Säule von Amersham Biosciences Europe, Freiburg gepackt ist. Demnach besteht die Matrix aus Agarose und die funktionelle Gruppe ist DEAE.

### **Startbedingungen**

Bei der Anionenaustauschchromatographie wurde der Start-pH-Wert jeweils so gewählt, dass er oberhalb des isoelektrischen Punktes der aufzureinigenden Laccase lag. Der Start-pH-Wert wurde deshalb von pH 5-7 variiert. Bei der Kationenaustauschchromatographie wurde der Start-pH-Wert so gewählt, dass er unterhalb des isoelektrischen Punktes der aufzureinigenden Laccase lag. Der Start-pH-Wert wurde hier von pH 1,5-5 variiert.

Als Puffer wurden verwendet: Citrat/ HCl-Puffer für den pH-Bereich von pH 1,5-5 und Phosphatpuffer für den pH-Bereich von pH 5-7 sowie McIlvaine-Puffer für den pH-Bereich von pH 2-6. Da diese Puffer evt. mit der Matrix des Anionenaustauschers interagieren können, wurde für diese Säule zusätzlich Methylpiperazin-Puffer (20 mM), pH 5 getestet.

Um eine Überladung der Säulen auszuschließen, wurden Proben unterschiedlicher Konzentration auf die Säulen gegeben. Wenn nicht anders vermerkt, wurden bei der Ionenaustauschchromatographie 500 µl (ca. 300 µg Protein pro ml) Zellextrakt verwendet, die dann über die Gelfiltration umgepuffert wurde (s. 2.15.4). Dies entspricht der Menge an Probe, die sich bei einem Zellaufschluss ergab.

### **Elution**

Für die Elution von der Säule wurde die Verwendung von Natriumchlorid-Gradienten sowie von pH-Gradienten getestet. Für die Versuche zur Elution via pH-Wert bei der Anionenaustauschchromatographie wurde McIlvaine Puffer pH 6-2 zur Elution verwendet. Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurde die Fließgeschwindigkeit des Waschschruttes nach Auftragen der Probe auf die Säule variiert: Es wurden Fließgeschwindigkeiten von 2; 1,5; 1 und 0,5 ml/min getestet.

### **System**

Die Säulen wurden mit dem computergestützten FPLC-System BioLogic von Bio-Rad, Hercules/ CA, angesteuert. Das BioLogic Chromatographiesystem bestand aus einer Arbeitsstation, einem Controller und einem Fraktionssammler (Modell 2128). Die Probe wurde über eine Probenschlaufe mittels automatischen Injektionsventils (AV7-3) auf die Säule appliziert. Zwischen Säule und Fraktionssammler war ein UV-Detektor geschaltet, über den ein Monitoring des Proteingehalts (Absorption bei 280 nm) möglich war. Die Fraktionen wurden in 5ml-Röhrchen aufgefangen. Am Computer wurden die Änderungen im Proteingehalt und der Verlauf des Salzgradienten sowie die Zuordnung zu den einzelnen Fraktionen dokumentiert. Die Säule wurde vor und nach der eigentlichen Chromatographie laut Hersteller-Beschreibung äquilibriert. Die Probenapplikation mit anschließender Elution der gewünschten Proteinfraction wurde im Verlauf der Arbeit optimiert.

### **Programm**

Für einen typischen Lauf wurde mit Hilfe der Anwendung BioLogic folgendes Programm erstellt:

Vorbehandlung der Säule:

- 1) Spülen mit 20 ml Puffer (2 ml/min)
- 2) Spülen mit 4 ml Low Salt Buffer (2 ml/min)
- 3) Spülen mit 60 ml High Salt Buffer (2 ml/min)

- 4) Spülen mit 60 ml Low Salt Buffer (2 ml/min)
- 5) Spülen mit 10 ml Puffer ohne Zusatz von Salz

Die Probenapplikation erfolgte über die Auftragsschlaufe durch das Injektionsventil. Es wurde 1 ml Probe mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/ min aufgetragen.

Elution der Laccasefraktion:

- 1) Spülen mit 20 ml Puffer ohne Zusatz von NaCl
- 2) Ggf. pH- oder NaCl- Gradient
- 3) Spülen mit High Salt Buffer

Zur Regeneration der Säule wurde diese mit 20 ml Puffer ohne Salz und anschließend mit ca. 250 ml Reinstwasser gespült. Es wurde ein maximaler Druck von 50 psi angelegt. Die Lagerung der Säulen erfolgte in 20 % Ethanol. Alle Puffer wurden vor Verwendung durch einen Sterilfilter mit einem Porenvolumen von 0,2 µm gegeben und entgast. Die Probe wurde vor dem Auftragen auf die Säule für 15 Minuten bei 20.000g zentrifugiert, um Schwebeteilchen, die die Säule verstopfen könnten, aus der Probe zu entfernen.

### **2.15.6 Präparative SDS-PAGE**

Der präparativen Gelelektrophorese liegt eine Auftrennung nach Molekulargewicht zugrunde. Das gewünschte Protein kann aus dem Gel eluiert werden, indem die Proteinbänder ausgeschnitten und die Proteine über das Anlegen einer Spannung aus dem Gelstück herausgelöst werden. Diesen Vorgang nennt man auch Elektroelution. Die negativ geladenen Proteine wandern dabei im elektrischen Feld aus dem Gelstück heraus. Die präparierten Proteine liegen dann als Protein-SDS-Komplex vor und sind demnach denaturiert und inaktiv. Zunächst wurde eine SDS-PAGE (s. 2.13.4) durchgeführt. Wegen der geringen Probenmenge wurden keine dickeren Gele (0,75 mm) verwendet als für die analytische SDS-PAGE üblich. Die Elektroelution wurde mit Hilfe eines Roti -Elektroelutionskits von Carl Roth GmbH, Karlsruhe durchgeführt. Dazu wurde ein einer Gelfiltration unterzogener konzentrierter Kulturüberstand einer SDS-PAGE unterzogen, um die 70 kDa große Laccasebande auszuschneiden. Die Proteine wurden mit Electro-Blue Färbelösung von Qbiogene gefärbt. Die Färbelösung sollte sich speziell für die Anwendung mit folgender Elektroelution von Proteinen aus dem Gel eignen, da die Proteine bei dieser Methode nicht fixiert werden. Um Interaktionen des Farbstoffes mit am Gel verbliebenem SDS zu vermeiden, sollte das Gel

zunächst laut Herstellerangaben für dreimal 10 Minuten in aqua demin. Gewaschen werden. Danach wurden die Proteine für 1 Stunde mit der Färbelösung angefärbt. Eine Entfärbung erfolgte durch erneutes Waschen mit aqua demin. Mit einer Rasierklinge wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten. Dabei wurde darauf geachtet, das Volumen des Gelstücks so klein wie möglich zu halten. Das Protein wurde dann im elektrischen Feld aus dem Gelstück in 800 µl Laufpuffer eluiert. Die so gewonnene Probe wurde einer TCA-Fällung bzw. Methanol-Chloroform-Fällung unterzogen und sollte in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung auf seine Reinheit geprüft werden.

### **2.16 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz**

Um einen Abgleich der Laccasen mit den potenziell zugehörigen Genen und einen Vergleich der Laccasen untereinander durchführen zu können, wurde die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt. Zur Bestimmung dieser Sequenz wurden Proben an das Zentrum für Molekulare Medizin Köln, Zentrale Bioanalytik (ZBA) geschickt. Die Sequenzierung wurde dort mittels Edman-Abbau auf einem ABI Procise 491 Sequencer durchgeführt. Prinzip der Methode ist die Abspaltung je einer Aminosäure, die über ihre Retentionszeit in einer HPLC bestimmt wird.

Zur Probenvorbereitung wurden die Fraktionen aus der optimierten Kationenaustauschchromatographie nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Ponceau S angefärbt (s. 2.14). Auch eine partiell über Gelfiltration gereinigte Probe aus dem Kulturüberstand wurde der Prozedur unterzogen. Daraufhin wurden die Proteinbanden ausgeschnitten und eingesandt.

### **2.17 Verwendete Chemikalien und Materialien**

#### **Aminosäuren**

DL-Alanin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
DL-Histidin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
DL-Isoleucin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
DL-Methionin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
DL-Phenylalanin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
DL-Serin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
DL-Threonin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
DL-Tryptophan	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
DL-Valin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
L-Arginin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
L-Asparaginsäure	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
L-Cystein	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg



L-Glutaminsäure	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
L-Leucin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
L-Lysin,	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
L-Prolin	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
L-Tyrosin	Fluka Chemie, Buchs/Schweiz

### **Detergenzien**

SDS, Natriumsalz in Pellets	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Triton X	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### **Farbstoffe**

BCIP/ NBT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	Bio-Rad, Hercules/ CA
Coomassie Blue G 250	Bio-Rad, Hercules/ CA
Coomassie Blue R 250	Bio-Rad, Hercules/ CA
Electro-Blue Färbelösung	Qbiogene, Heidelberg
Fluoresceindiacetat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Phenolsufonphthalein	Riedel-de-Haen Seelze GmbH, Seelze
Ponceau S	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Serva Blue R	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

### **Laccasesubstrate**

DMOP, ABTS, DAN, DHN, L-DOPA	Fluka Chemie GmbH Buchs/ Schweiz
Guajacol	VWR International GmbH, Darmstadt
Syringaldazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

### **Lösungsmittel/ Säuren/ Laugen**

Aceton (99,5 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Borsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Chloroform (99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure (99 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (96 %, reinst)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L(+) Ascorbinsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
o-Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Perjodsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trichloressigsäure	VWR International GmbH, Darmstadt
Trifluormethansulfonsäure	VWR International GmbH, Darmstadt
Zitronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### **Salze**

Ammoniumsulfat	Fluka Chemie GmbH Buchs/ Schweiz
CAPS, CHAPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
EDTA, Tetranatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Eisen(III)-Chlorid Hexahydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
Eisen- (III) sulfat Monohydrat	Fluka Chemie GmbH Buchs/ Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kalziumchlorid Dihydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
Kobalt(II)chlorid Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kupfer- (II) chlorid (wasserfrei)	Fluka Chemie GmbH Buchs/ Schweiz
Kupfer- (II) sulfat Pentahydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid Hexahydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mangan- (II) sulfat Monohydrat	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumacetat (wasserfrei)	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zinksulfat Heptahydrat	VWR International GmbH, Darmstadt

### Medienbestandteile

Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Biotin, DABA	Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg
D(+) Glukose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
D-Sorbitol, Stärke	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
D (+)-Galaktose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nicotinamid	Dr. Call, Übach-Palenberg
PDA (Kartoffelextrakt-Glukose-Agar)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharose	VWR International GmbH, Darmstadt
Thiamin HCl	Fluka Chemie GmbH Buchs/ Schweiz
Tricyclazol (BEAM)	Dr. E. Thines, Kaiserslautern
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
D(+)-Xylose	VWR International GmbH, Darmstadt

### Gelelektrophorese/ IEF/ Western Blot

Acrylamidlösung "Rotiphorese <sup>®</sup> -Gel A"	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bio-Lyte, pH 3-6	Bio-Rad, Hercules/ CA
Bisacryllösung "Rotiphorese <sup>®</sup> -Gel B"	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Bio-Rad, Hercules/ CA
Glycerin	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycin	Bio-Rad, Hercules/ CA
Harnstoff	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Mineralöl	Bio-Rad, Hercules/ CA
Rotiload 1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sucofin <sup>®</sup> Milchpulver	TSI GmbH & Co KK, Zeven
TEMED	Fluka Chemie GmbH Buchs/ Schweiz
Tricin	ICN Biomedicals Inc., Ohio/ USA

### Sonstige Chemikalien

Anisol	VWR International GmbH, Darmstadt
1-Methylpiperazin	VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumdithionit	VWR International GmbH, Darmstadt

### Enzyme und Proteine

Vorgefärbter Proteinmarker SM0671	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
-----------------------------------	-----------------------------

Proteinmarker SM0661  
Laccase *Coriolus versicolor*, 1,5U/mg  
Primärantikörper (*C. subvermispota*)  
Primärantikörper (*M. albomyces*)  
Proteaseinhibitorcocktail  
IEF- Calibration Kit  
„Anti-Rabbit IgG (Fc) AP Conjugate“  
BSA, Bovines Albumin  
Endoglykosidase H

MBI Fermentas, St. Leon-Rot  
Fluka Chemie GmbH Buchs/ Schweiz  
Dr. H.-P. Call, Übach-Palenberg  
Dr. Kiiskinen, Stockholm/ Schweden  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen  
Amersham Biosciences Europe, Freiburg  
Promega, Madison/USA  
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen  
New England Biolabs Inc., Beverly/USA

### Kits

Silberfärbungskit Roti-Black®P  
Roti® Elutions-Kit  
Zellaufschlusskit „Fast Protein™ Red“

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe  
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe  
Bio101, Carlsbad/ CA

### Sonstiges Material

Ascorbinsäureteststreifen „Quantofix“  
IPG-Streifen “Ready Strips™”  
Filterpapier (Chromatographie Papier 3 mm)  
Membranfilter (Cellulose Acetat, 0,45 µm)  
Servalyt Precotes pH 3-10/ pH 3-6, 150 µm  
Kationenaustauscher “EconoPac High S”  
Gelfiltrationssäule „EconoPac DG10“  
Säulenmaterial Bio-Gel P-6DG  
Anionenaustauscher „HiTrap DEAE FF  
Sterilfilter „Filtropur S“, 0,2 µm  
Rundfilter Blauband 589<sup>3</sup>  
Cellulosenitrat BA 83, 0,2 µm  
PVDF-Membran 0,2 µm  
VivaSpin 20, 6, 0,5 ml/ VivaCell250  
Braunkohle (Typ Bergheim, Lithotyp A)

Macherey-Nagel, Düren  
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe  
Whatman, Maidstone/ UK  
Sartorius AG, Göttingen  
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg  
Bio-Rad, Hercules/ CA  
Bio-Rad, Hercules/ CA  
Bio-Rad, Hercules/ CA  
Amersham Biosciences Europe, Freiburg  
Sarstedt, Nümbrecht  
Schleicher & Schuell, Dassel  
Schleicher & Schuell, Dassel  
Bio-Rad, Hercules/ CA  
Vivascience AG, Hannover  
Rheinbraun AG

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die oxidativen Enzyme untersucht, die von der Schwarzen Hefe *H. acidophila* synthetisiert werden. Es konnte zunächst in Vorversuchen die Hypothese gestärkt werden, dass es sich bei dem extrazellulären oxidativen Enzym um eine Laccase handelte. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte diese Laccase isoliert und näher charakterisiert werden. Die einzelnen Methoden zu erarbeiten, stellte dabei aufgrund der wenigen über den Organismus zur Verfügung stehenden Informationen und insbesondere wegen des von der Hefe gebildeten Melanins eine besondere Schwierigkeit dar. Ein Problem waren auch die geringen Laccasekonzentrationen und das langsame Wachstum von *H. acidophila*. Der erste Arbeitsschritt war folglich eine Optimierung der Kulturbedingungen, um die Laccaseausbeuten zu erhöhen und die Handhabung der Hefe zu verbessern sowie eine Abtrennung des Melanins zu erreichen. Im Zuge der Isolierung der Laccase stellte sich heraus, dass eine Laccaseaktivität nicht nur im Überstand der Hefekulturen vorlag, sondern auch zellassoziiert und im Zellextrakt. Ein Nachweis mittels laccasespezifischer Antikörper und Aktivitätstest im SDS-Gel ermöglichten eine Aussage über Anzahl, Lokalisation und Struktur der verschiedenen Laccasen in *H. acidophila*. Parallel zu dieser Charakterisierung wurde mit der Reinigung der Laccasen aus den verschiedenen Extrakten begonnen, um Material für eine N-terminale Aminosäuresequenzierung zu erhalten. Außerdem wurden die Rohextrakte zur Ermittlung einiger Charakteristika wie Stabilität, pH-Optima und Isoelektrischer Punkt herangezogen, um das Potenzial der Laccasen für eine biotechnologische Applikation zu evaluieren. In einem letzten Schritt wurden die Charakteristika den einzelnen Laccasen zugeordnet und die ermittelten Aminosäuresequenzen mit den Laccasegenen aus *H. acidophila* verglichen.

#### **3.1 Vorversuche zur Einordnung des zu untersuchenden Enzyms**

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde eine Oxidaseaktivität in *H. acidophila*-Kulturen gezeigt (Pracht, 2002). Daraufhin wurde das Vorhandensein einer für Pilze typischen extrazellulären Laccase postuliert. Aufgrund der Acidophilie der untersuchten Hefe, lag es außerdem nahe, anzunehmen, dass auch die extrazellulären Enzyme, die von *H. acidophila* synthetisiert werden, im Sauren optimal arbeiten. Laccasen mit sauren pH-Optima sind von biotechnologischem Interesse, weil sie sich für den Einsatz für verschiedene Applikationen in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie eignen können. Da aber auch andere Enzyme

(Peroxidasen, Tyrosinasen, Katalasen) für Oxidationsreaktionen verantwortlich sein können, sollte zunächst das Vorliegen einer Laccase bestätigt werden.

### 3.1.1 ABTS-Oxidation im Plattentest

Wurde *H. acidophila* auf Agarplatten angezogen, denen das Laccasesubstrat ABTS zugesetzt worden war, ergab sich im Verlaufe des Koloniewachstums eine Grünfärbung im direkten Umfeld der Kolonien. Dies sprach für das Vorhandensein eines extrazellulären oxidativen Enzyms, das das ABTS oxidierte und so die grüne Färbung hervorrief.



**Abb. 3.1: ABTS-Oxidation durch *H. acidophila* im Plattentest.** *H. acidophila* (schwarze Kolonien) wurde auf Festmedium mit  $\text{KNO}_3$  als Stickstoffquelle angezogen. Die Grünfärbung rührt vom oxidierten ABTS her.

In Abb. 3.1 ist das Ergebnis eines solchen Versuchs dargestellt. Es wurde hier nicht das übliche Anzuchtmedium (2.2.1) mit Trypton als Stickstoffquelle verwendet, sondern ein Medium mit der anorganischen Stickstoffquelle  $\text{KNO}_3$ , da es auf Anzuchtmedium mit Trypton zu einer so starken Oxidationsreaktion kam, dass ABTS direkt in die zweite Oxidationsstufe (violett) überging, was aber aufgrund der leichten Eigenfärbung des Mediums kaum unterschieden werden konnte. Allerdings dauerte das Wachstum von *H. acidophila* mit  $\text{KNO}_3$  mehrere Wochen. Dieser Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dipl. Biol. Larissa Tetsch durchgeführt.

### 3.1.2 Substratumsetzungen des Enzyms

Obwohl Laccasen verschiedene Substrate umsetzen können, gibt es doch ein typisches Substratspektrum, anhand dessen man Rückschlüsse auf die Natur des Enzyms ziehen kann. So können Tyrosin und L-Dopa von echten Laccasen nicht umgesetzt werden, wohingegen ABTS, Syringaldazin, DMOP, 1,8-Diaminonaphthalin (DAN) oder Guajacol typische Laccasesubstrate darstellen.

Für den Test der eingesetzten Substrate wurde zellfreier und durch Ultrafiltration konzentrierter Kulturüberstand verwendet, da das oxidative Enzym im Kulturüberstand schon nachgewiesen worden war (Pracht, 2002), wohingegen die Existenz weiterer Laccasen noch nicht bekannt war. Die Ergebnisse der Substrattests sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Neben ABTS, DMOP und Syringaldazin, deren Eignung als Substrat photometrisch überprüft werden konnte, wurden verschiedene andere ungefärbte Substanzen getestet (Ascorbinsäure, L-DOPA, 1,8-Diaminonaphthalin (DAN) und Tyrosin). Hierzu wurde eine Sauerstoffelektrode verwendet, mit der eine indirekte Messung der Laccase-Reaktion über die Reduktion des Sauerstoffs möglich ist. Es erfolgte eine Oxidation der Substrate ABTS, DMOP, DAN und Ascorbinsäure, während L-DOPA, Tyrosin und Syringaldazin nicht oxidiert wurden. Da keine Umsetzung von Tyrosin und L-Dopa erfolgte, konnte ausgeschlossen werden, dass der untersuchte Kulturüberstand eine Tyrosinase enthielt. Der in die Substrattests eingesetzte Kulturüberstand wurde durch die vorhergehende Ultrafiltration so vorbehandelt, dass ein Vorhandensein von  $H_2O_2$  ebenfalls ausgeschlossen werden konnte. Deshalb war es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem untersuchten Enzym um eine Peroxidase handelte, da für die Umsetzung der Substrate durch Peroxidasen Wasserstoffperoxid als Elektronenakzeptor benötigt wird. Außerdem zeigt der Sauerstoffverbrauch im Test mit der Sauerstoffelektrode, dass höchstwahrscheinlich Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor fungierte, was einen weiteren signifikanten Hinweis auf das Vorhandensein einer Laccase darstellen würde. Eine Inhibition durch 10 mM Natriumazid konnte ebenfalls belegt werden. Azid ist zwar kein spezifischer Hemmstoff für Laccasen, wirkt aber in der Regel auf kupferhaltige Enzyme.

**Tab. 3.1: Substratumsatz durch die Laccasen im Kulturüberstand von *H. acidophila*.** Für die Messung wurde konzentrierter Kulturüberstand verwendet. Die Tests wurden für die chromogenen Substrate im Photometer und für die anderen Substrate in einer Sauerstoffelektrode durchgeführt. Die Werte beziehen sich jeweils auf einen Milliliter dieses Konzentrates. Die angegebenen Laccaseaktivitäten sind Volumenaktivitäten. Die Proteinkonzentration der eingesetzten Probe betrug 477,2 µg/ml.

Substrat	Testmethode	Laccaseaktivität [U/ml]
Syringaldazin	Photometer	0
ABTS	Photometer	0,78
	Sauerstoffelektrode	2,16
DMOP	Sauerstoffelektrode	0,54
Ascorbinsäure	Sauerstoffelektrode	1,1
DAN	Sauerstoffelektrode	9,2
L-Dopa	Sauerstoffelektrode	0
Tyrosin	Sauerstoffelektrode	0

### 3.1.3 Einfluss von Kupfer auf die Enzymbildung

Da Laccasen kupferhaltige Enzyme sind und nur bei Vorhandensein von Kupfer katalytisch aktiv sein können, erschien es sinnvoll, den Einfluss von Kupfer auf die Bildung des Enzyms zu untersuchen. Es konnte eine Kupferabhängigkeit nachgewiesen werden. Bei Anzucht der Hefe mit verschiedenen Kupferkonzentrationen zeigte sich, dass die Enzymaktivität mit steigender Kupferkonzentration anstieg. Dieser Effekt war jedoch nicht mit einem Anstieg der Zellmasse korreliert. Bei der hohen Kupferkonzentration war die Zellmasse im Vergleich zu den Kulturen mit der niedrigeren Kupferkonzentration deutlich reduziert. Durch die eindeutige Abhängigkeit der Enzymbildung von der Kupferkonzentration des Mediums wurde die Hypothese über das Vorliegen eines kupferhaltigen Enzyms (Laccase) gestärkt und demnach die Möglichkeit eines hämhaltigen Enzyms wie z.B. einer Katalase weitgehend unwahrscheinlich. Die Ergebnisse dieses Vorversuches wurden während der Optimierung der Wachstumsbedingungen genauer quantifiziert (Abb. 3.9).

Die beschriebenen Vorversuche bestätigten die These über das Vorliegen mindestens einer Laccase in *H. acidophila*. Um genauere Informationen über das Enzym zu erhalten, sollte die Laccase im Folgenden gewonnen, isoliert und charakterisiert werden. Im späteren Verlauf der Arbeit wurden neben der Laccaseaktivität im Kulturüberstand auch Laccasen im Zellextrakt und assoziiert mit den Zellen nachgewiesen. Für diese Laccasen wurde in weiteren Versuchen ebenfalls Substratspektrum und Kupferabhängigkeit untersucht, was auch für diese Enzyme bestätigte, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Laccasen handelt (Tab. 3.7).

### 3.1.4 Weitere extrazelluläre Enzyme in *H. acidophila*

Als weiterer Vorversuch wurde der Kulturüberstand auf Begleitaktivitäten untersucht, um festzustellen, ob neben den Laccasen noch andere interessante Enzyme von *H. acidophila* ins Medium sezerniert werden. Es wurden ein Amylasetest, ein Hydrolasetest und ein Proteasetest durchgeführt. Weder der Proteasetest mit Hide Powder Azur noch der Amylasetest, bei dem der Stärkeabbau auf einer Agarplatte mit Lugolscher Lösung getestet wurde, ergaben ein positives Ergebnis. Allerdings war die *H. acidophila* Kultur nicht mit Stärke induziert worden; eine induzierbare Amylase kann durch diesen Versuch also nicht ausgeschlossen werden. Der Test auf Hydrolaseaktivität im Kulturüberstand von *H. acidophila* wurde mit Fluoresceindiacetat (FDA) durchgeführt. Bei hydrolytischer Aktivität wird Acetat abgespalten, wodurch sich eine messbare Fluoreszenz ergibt. Als Vergleich wurde ein hitzeinaktiviertes Aliquot des Kulturüberstandes verwendet, um eine FDA-

Hydrolyse durch Bestandteile des Mediums ausschließen zu können. Bei der photometrischen Messung wurde im *H. acidophila* Kulturüberstand eine Extinktionsänderung von 0,052 pro Stunde festgestellt. In der Kontrollprobe wurden 0,044 pro Stunde gemessen. Es ergibt sich eine Enzymaktivität von 0,388 U/ml Kulturüberstand. Außer einer geringen Menge Hydrolase konnte also kein weiteres extrazelluläres Enzym in *H. acidophila* Kulturen nachgewiesen werden.

### **3.2 Etablierung eines geeigneten Testsystems zur Messung der Laccaseaktivität**

Da 1,8-Diaminonaphthalin (DAN) in den Versuchen mit der Sauerstoffelektrode die höchste Aktivität gezeigt hatte, sollte eine Adaptation dieses Tests an eine Photometermessung durchgeführt werden, da die Messung an der Sauerstoffelektrode als Standardmesssystem zu aufwändig gewesen wäre. Da sich das Substrat bei der Reaktion bräunlich färbte, lag es nahe, einen Laccasetest im Photometer zu versuchen. Ein Spektrum von DAN zeigte Maxima bei 220 und 320 nm. Wurde eine laccasekatalysierte Oxidation des DAN bei diesen Wellenlängen gemessen, ergab sich zwar ein Anstieg der Extinktion, jedoch schwankten die Werte so stark, dass sie nicht verwertbar waren. Es stellte sich heraus, dass DAN nach Oxidation polymerisierte und deshalb ausfiel. DAN konnte deshalb nur als Substrat für die Sauerstoffelektrode und für den Laccasenachweis im SDS-Gel verwendet werden. Beim Test nach der SDS-PAGE war die Polymerisation sogar von Vorteil, da die durch den Aktivitätstest angefärbte Bande im Gel fixiert wurde. Als Alternative zu DAN wurde der photometrische ABTS-Test als Standard etabliert. Dieser Test wurde sowohl mit gelösten Proben, z.B. aus dem Kulturüberstand oder Zellextrakt, als auch mit ganzen Zellen durchgeführt. Wurde eine Zellsuspension in den Test eingesetzt, erfolgte die Messung über höchstens fünf Minuten, da die Zellen anschließend zu sedimentieren begannen und keine verlässliche Messung mehr möglich war. Außerdem kam es unmittelbar nach Reaktionsstart zunächst zu einem Abfall der Extinktion. Dieser Abfall wurde verfolgt und die Extinktionsdifferenz aus dem ersten linearen Anstieg der Extinktion bestimmt. Trotzdem führten die Messungen mit ganzen Zellen im Reaktionsansatz zu unsichereren Ergebnissen als bei gelösten Proben, wie man auch an den hohen Standardabweichungen der entsprechenden Tests erkennen kann.



### 3.3 Isolierung der Laccasen

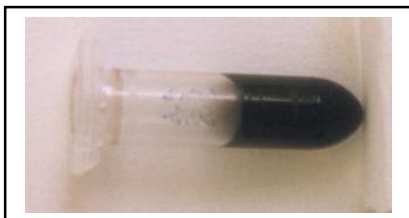
Neben der Enzymaktivität im Kulturüberstand wurde auch eine Laccaseaktivität gefunden, die mit den Zellen assoziiert war. Dies konnte gemessen werden, wenn die Zellen als Ganzes in einen ABTS-Test eingesetzt wurden (s.3.2). Im späteren Verlauf der experimentellen Arbeit wurde zudem eine Laccaseaktivität im Zellextrakt nachgewiesen.

#### 3.3.1 Gewinnung der Laccasen aus dem Kulturüberstand

Da die Laccaseaktivität im Kulturüberstand zu gering war für weitere Arbeiten, musste eine Konzentrierung der Laccaseaktivität durchgeführt werden. Als Methoden kamen Ultrafiltration oder native Fällung der Laccase(n) in Frage.

##### 3.3.1.1 Ultrafiltration

Um ausreichend Material an Laccasen aus dem Kulturüberstand zu gewinnen, wurden *H. acidophila*-Kulturen verschiedenen Ultrafiltrationsverfahren unterzogen (Tab. 3.2). Nach Entfernen eventueller Schwebeteilchen, wurde der *H. acidophila* Kulturüberstand mittels VivaCell 250 bzw. mit einer 150ml-Ultrafiltrationseinheit von Filtron aufkonzentriert. Die Probe wurde dabei mit Druckluft durch eine Polyethersulfonmembran gepresst. Um möglichst geringe Enzymverluste zu haben, wurde zunächst eine Membran mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa verwendet. Diese erwiesen sich jedoch aufgrund steigender Viskosität und ebenfalls steigendem Melaningehalt des aufkonzentrierten Kulturüberstandes als ungeeignet und es wurden im Weiteren Membranen mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa verwendet. Aber auch diese Membranen mussten während der Ultrafiltration regelmäßig mit Puffer gespült werden, um eine beginnende Verblockung durch das Melanin zu lösen. Außerdem konnte bei den 30kDa-Filtern auch im Filtrat eine Laccaseaktivität von bis zu 0,35 mU/ml (ca. 5 % der Ausgangsaktivität) nachgewiesen werden.



**Abb. 3.2: Ein Milliliter zellfreier Kulturüberstand nach 100facher Konzentrierung mittels Ultrafiltration (30 kDa Ausschlussvolumen).** Deutlich ist die durch Melanin verursachte dunkle Färbung zu erkennen.

Neben den Systemen, bei denen die Probe unmittelbar durch die Membran gepresst wird, wurde ein weiteres Ultrafiltrationssystem getestet, um das Problem der Verblockung der Filter zu beheben. Dazu wurde ein LV Centramate™ der Firma Pall verwendet. Eine

Membrankassette wurde hierbei tangential angeströmt und die Probe im Kreis geführt bis sie auf das gewünschte Volumen (minimal 20 ml) aufkonzentriert war.

**Tab. 3.2: Laccaseaktivitäten vor und nach Ultrafiltration im Vergleich der verschiedenen Ultrafiltrationsmethoden.** Es wurden jeweils Filter mit einem Ausschlussvolumen von 30 kDa verwendet. Die Laccaseaktivitäten wurden mit ABTS als Substrat unter Standardbedingungen bestimmt und beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf einen Milliliter Probe. Bei den Gesamtaktivitäten wurden die Gesamtvolumina, auf die sich die Laccaseaktivitäten beziehen, in Klammern angegeben.

	Vor Ultrafiltration		Nach Ultrafiltration	
	Laccase-aktivität	Gesamt-aktivität	Laccase-aktivität	Gesamt-aktivität
<b>LV Centramate™ Tangential Flow System (Pall)</b>	6,9 mU/ml	5520 mU (800 ml)	152,4 mU/ml	5334 mU (35 ml)
<b>VivaCell 250 (VivaScience)</b>	10,5 mU/ml	6300 mU (600 ml)	277 mU/ml	415,5 mU (1,5 ml)
<b>150ml-Filtron-Zelle</b>	8,5 mU/ml	424 mU/ml (50 ml)	64,5 mU/ml	258,2 mU (4 ml)

Bei der Ultrafiltrationsanlage von Pall wurde die Probe um Faktor 23 eingeeengt. Es gab keinen Verlust der Laccaseaktivität. Der Zeitaufwand lag bei ca. 2 Stunden. Das Volumen, das maximal mit diesem Gerät aufzukonzentrieren war, lag bei 200ml. Deshalb war mit diesem Gerät in einem Versuchsdurchlauf nur eine Aufkonzentrierung um den Faktor 10 möglich. Mit der Vivacell konnte eine Konzentrierung des Kulturüberstandes um den Faktor 400 erreicht werden. Allerdings war diese Methode mit hohen Verlusten an Laccaseaktivität von bis zu 93 % verbunden. Der Zeitaufwand war mit 8 Stunden und regelmäßigem Spülen der Membran zur Entfernung der Verblockung beträchtlich. Das maximal einzuengende Volumen betrug 250 ml. Durch Auffüllen konnten bis zu 400 ml auf 1 ml aufkonzentriert werden. Höhere Konzentrationen waren aufgrund der steigenden Viskosität des aufkonzentrierten Kulturüberstandes nicht mehr möglich. Durch die Filtron-Ultrafiltrationseinheit konnte der Kulturüberstand um den Faktor 12,5 aufkonzentriert werden. Dies war mit einem Verlust von etwa 40 % verbunden. Der Zeitaufwand betrug ca. 2 Stunden. Auch hier mussten die Filter regelmäßig gespült werden. Die Filtroneinheit besaß ein integriertes Rührsystem, was die Verblockung der Filter etwas abmilderte. Aufgrund des geringen Maximalvolumens von 150 ml mussten mehrere Versuchsdurchläufe durchgeführt

werden. Die optimale Ultrafiltrationsmethode war demnach der LV Centramate, der aber nicht für alle Versuche zur Verfügung stand. Alternativ wurde die Viva Cell 250 verwendet.

### 3.3.1.2 Native Protein-Fällungen

Für die nativen Fällungen wurden Eisenchlorid, Ammoniumsulfat oder Ethanol verwendet.

Um die Laccase aus dem Kulturüberstand auszufällen wurde neben Ammoniumsulfat auch **Eisen(III)chlorid** verwendet. Melanin ist in  $\text{FeCl}_3$ -Lösung sehr gut löslich und so bestand mit dieser Methode potenziell die Möglichkeit, die Laccase vom Melanin zu trennen. Bei der Eisenchloridfällung ergaben sich drei Fraktionen nach Behandlung mit 20, 40 bzw. 60 % Salz. Nach der Zentrifugation ergab sich jeweils ein Sediment, das nach Trocknung bei Raumtemperatur auf Laccaseaktivität untersucht wurde. Auch die resultierenden Überstände wurden einem ABTS-Test unterzogen. In allen Proben entstand zunächst eine starke Grünfärbung. Bei der Kontrolle mit Puffer, ABTS und Eisenchlorid stellte sich jedoch heraus, dass diese Grünfärbung nicht enzyspezifisch war, sondern auch ohne Anwesenheit einer Laccase auftrat. Die ABTS-Oxidation war also wahrscheinlich auf Reste von Eisenchlorid im untersuchten Sediment zurückzuführen. Deshalb wurden die Sedimente bei weiteren Versuchen vor dem Laccasetest über VivaSpin Konzentratoren umgepuffert, um die restlichen Salze zu entfernen. Hiernach ergaben sich aber keine reproduzierbaren Laccaseaktivitäten im Test mit ABTS als Substrat.

**Tab. 3.3: Laccaseaktivitäten und Proteingehalte der mit 10, 20, 30, 40 und 50 % Ammoniumsulfat gefällten Proben.** Konzentrierter Kulturüberstand wurde mit schrittweise steigenden Ammoniumsulfatkonzentrationen versetzt, für zehn Minuten auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Die resultierenden Sedimente wurden in Puffer aufgenommen, umgepuffert und einem Laccasetest mit ABTS als Substrat unter Standardbedingungen und einer Proteinbestimmung nach Bradford (1971) unterzogen. Der Proteingehalt der eingesetzten Probe betrug  $2077\mu\text{g/ml}$ , die Laccaseaktivität vor dem Versuch lag bei  $137,1\text{ mU/ml}$  bzw.  $66\text{ mU/mg}$ .

Ammoniumsulfat	Spezifische Laccaseaktivität [mU/mg]	Proteingehalt [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
10 %	142	261	3	2,2
20 %	90	412	3	1,4
30 %	235	196	3	3,6
40 %	176	261	3	2,7
50 %	12	736	6	< 1

Bei der **Ammoniumsulfatfällung** wurden 10, 20, 30, 40 bzw. 50 % Salz zu konzentriertem Kulturüberstand gegeben. Nach der Zentrifugation ergaben sich jeweils Sedimente, die in  $100\mu\text{l}$  Puffer aufgenommen und in einen Laccasetest mit ABTS als Substrat eingesetzt

wurden (Tab. 3.3). Die Ausbeuten waren mit maximal 6 % extrem gering. Die maximale Reinigung konnte mit einem Faktor von knapp 4 bei 30 % Ammoniumsulfatsättigung erreicht werden. In allen Fällen wurde jedoch auch Melanin mit ausgefällt: Je mehr Protein ausgefällt wurde, umso dunkler waren die Sedimente. Es konnte durch diese Methode also keine Trennung von Laccase und Melanin erreicht werden. Der Versuch wurde bei vergleichbaren Ergebnissen mehrfach wiederholt. Die Methode wurde jedoch nicht zur Aufreinigung einer der Laccasen herangezogen, da die Ausbeuten zu gering waren.

Aus konzentriertem Kulturüberstand und Zellextrakt wurden die Laccasen mittels **Ethanol** ausgefällt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Die Ausbeuten bei diesem Verfahren waren im Vergleich zur Ammoniumsulfatfällung hoch. Sie lagen beim Zellextrakt bei 93 % und beim konzentrierten Kulturüberstand bei etwas mehr als 50 %. Es wurden allerdings Reinigungsfaktoren von maximal 1,4 erzielt, da durch die Ethanolzugabe auch die anderen Proteine größtenteils ausgefällt wurden.

**Tab. 3.4: Vergleich der Laccasefällung durch Ethanol aus Zellextrakt bzw. Kulturüberstand.** Zellextrakt bzw. konzentrierter Kulturüberstand wurden mit final 75 % Ethanol versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und einem Laccaseaktivitätstest unter Standardbedingungen mit ABTS als Substrat sowie einer Proteinbestimmung nach Bradford (1971) unterzogen.

	Spezifische Laccaseaktivität [mU/mg]		Proteingehalt [µg/ml]		Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
	Vorher	Nachher	Vorher	Nachher		
<b>Zellextrakt</b>	522	718	456	308	93	1,4
<b>Konzentrierter Kulturüberstand</b>	49	32	1085	870	53	< 1

Neben den schon beschriebenen Proben, wurde eine weitere Probe einer Ethanol-fällung unterzogen: ein Kulturüberstand der unter Zusatz von Ascorbinsäure zum Medium gewonnen worden war (s. 3.6.1.4). Das sich nach der Fällung ergebene Sediment wurde einem Laccasetest mit ABTS als Substrat unter Standardbedingungen unterzogen. Es ergab sich eine Laccaseaktivität von 0,71 mU/ml. In der Kulturüberstandsprobe war optisch weder vor noch nach der Fällung ein Melaninanteil erkennbar. Möglicherweise wurden die Melaninvorstufen durch die Fällung von der Laccase getrennt, so dass nach Entfernen der Ascorbinsäure kein Melanin entstehen konnte. Da die Laccaseaktivitäten bei diesem Versuch extrem gering und schwer zu reproduzieren waren, wurde dieser Ansatz jedoch nicht weiter verfolgt.

### **3.3.2 Isolierung der zellassozierten Laccasen**

Da im ABTS-Test mit ganzen Zellen eine hohe Laccaseaktivität gemessen worden war, wurde das Vorliegen einer zellassozierten Laccase postuliert, die im Folgenden von den Zellen isoliert werden sollte. Über die Bindungsart der Laccase(n) an die Zellen war jedoch noch nichts bekannt. Neben der Möglichkeit einer kovalenten Bindung erschienen auch ionische Wechselwirkungen möglich. Deshalb wurde zunächst die Frage verfolgt, ob die Laccaseaktivität mittels hoher Salzkonzentration, insbesondere bivalenter Kationen, gelöst werden könnte. Deshalb wurden die Zellen mit verschiedenen Salzen behandelt, um (i) eine effektive Methode für die Isolierung der Laccase zu finden und (ii) Aufschluss über die Bindung der Laccase an die Zellen zu erhalten.

In einem alternativen Ansatz wurden die Zellen mit dem anionischen Detergenz SDS gewaschen, um möglicherweise existierende hydrophobe Wechselwirkungen aufzubrechen, sollte es sich bei der Laccase um ein membranständiges Protein handeln. Eine weitere Möglichkeit für die Lokalisierung der zellassozierten Laccase war zwischen der Plasmamembran und der Melaninauflagerung auf die Hefezellwand. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen in Puffer gewaschen. Außerdem wurden verschiedene Zellaufschlussverfahren erprobt.

#### **Behandlung der Zellen mit verschiedenen Salzen**

Als Salzlösungen (0,5 M) wurden Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Magnesiumsulfat und Calciumchlorid eingesetzt. Nach einer einstündigen Behandlung der Zellen bei Raumtemperatur wurden sowohl Zellen als auch die resultierenden Überstände in einen ABTS-Test eingesetzt. Im Vergleich zu einer mit Wasser behandelten Probe (100 %) unterschieden sich die meisten Proben nicht signifikant, da die Standardabweichungen recht hoch waren (Tab. 3.5). Trotzdem kann man die zellassozierte Laccaseaktivität in den mit Kalziumchlorid (79 %) und Magnesiumchlorid (88 %) behandelten Proben als leicht reduziert interpretieren. Die Laccaseaktivitäten in den salzhaltigen Überständen waren aber sehr gering und die Standardabweichungen extrem hoch, so dass geschlussfolgert werden muss, dass es durch diese Methode nicht zur Ablösung einer aktiven Laccasefraktion, sondern eher zu einer Inhibition der Laccase gekommen ist. Lediglich bei der Behandlung mit Magnesiumchlorid könnte eine kleine Menge an Laccase abgelöst worden sein, da sich im Überstand eine geringe Aktivität zeigte. Ein späterer Versuch gab einen weiteren Hinweis auf eine Hemmung der Laccaseaktivitäten durch Salze. Nach Salzbehandlung (ebenfalls mit je 0,5 M Salzkonzentration) des Zellextraktes zeigte sich eine 32%ige Hemmung der

Laccaseaktivitäten mit Natriumchlorid, eine 49%ige Hemmung mit Kalziumchlorid und eine 54%ige Hemmung mit Magnesiumchlorid. Mit Magnesiumsulfat konnte keine Hemmung nachgewiesen werden. Dies spricht für eine hemmende Wirkung des Chloridions, was aber im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft wurde.

**Tab. 3.5: Laccaseaktivitäten nach einstündiger Salzbehandlung (je 0,5 M Salz) der *H. acidophila* Zellen.** Die Laccaseaktivitäten wurden unter Standardbedingungen mit ABTS als Substrat ermittelt. Die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Versuchen ermittelt und sind kursiv dargestellt.

	<b>Laccaseaktivität im Überstand</b>	<b>Zellassozierte Laccaseaktivität</b>
<b>Magnesiumchlorid</b>	0,060 mU/ml +/- 0,016	17,3 mU/ml +/- 1,572
<b>Natriumchlorid</b>	0,028 mU/ml +/- 0,028	18,9 mU/ml +/- 0,383
<b>Kalziumchlorid</b>	0,000	15,6 mU/ml +/- 0,614
<b>Magnesiumsulfat</b>	0,014 mU/ml +/- 0,014	20,4 mU/ml +/- 1,408
<b>Wasserkontrolle</b>	0,014 mU/ml +/- 0,024	19,8 mU/ml +/- 0,961

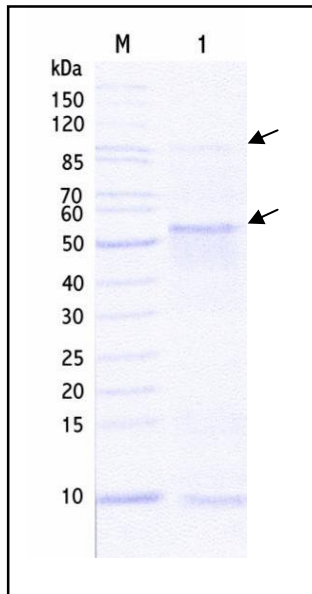
### **SDS-Behandlung der Zellen**

Nach Behandlung der Zellen mit 1,7 mM SDS wurden die Proben abzentrifugiert und sowohl im resultierenden Überstand als auch im Sediment die Laccaseaktivität mit ABTS als Substrat bestimmt. Im Überstand konnten nach der Behandlung ungefähr 60 % der Laccaseaktivität der Wasserkontrolle (0,29 mU/ml) gemessen werden. An den Zellen blieb die Laccaseaktivität in etwa gleich (etwa 22 mU/ml). Es erfolgte also keine zusätzliche Isolierung der zellassozierten Laccaseaktivität durch Behandlung der Zellen mit SDS.

### **Abwaschen der Laccaseaktivität von Zellen**

Schließlich wurden lyophilisierte Zellen mit Puffer gewaschen, um die zellassozierte Laccase zu isolieren. Dabei wurde eine kleine Menge an Laccase von den lyophilisierten Zellen isoliert. Im resultierenden Überstand wurde hier eine Aktivität von 1,73 mU/ml und ein Proteingehalt von 3,08 µg/ml ermittelt. In einer SDS-PAGE aufgetrennt ergaben sich unter anderem eine distinkte Bande bei ca. 55 kDa und weitere bei ca. 110 kDa und 10 kDa (Abb. 3.3).

Wie erwähnt, wurden auch verschiedene Zellaufschlussverfahren getestet. Da sich im weiteren Verlauf der Arbeit jedoch herausstellte, dass durch den Zellaufschluss neben den zellassozierten Laccasen noch weitere, intrazelluläre, Laccasen isoliert wurden, sind die Zellaufschlussverfahren unter 3.3.3 zusammengefasst.



**Abb. 3.3: Von lyophilisierten *H. acidophila* Zellen abgewaschene Laccase.** Der laccasehaltige Waschrückstand, wurde in einem SDS-Gel (10 %) aufgetrennt. Die markanten Banden bei ca. 55 und 110 kDa sind durch Pfeile markiert. M = Marker; 1 = Waschrückstand der lyophilisierten Zellen. Die Probe wurde nach einer Chloroform-Methanol-Fällung einer reduzierenden SDS-PAGE unterzogen.

### 3.3.3 Gewinnung der intrazellulären Laccasen

Nachdem verschiedene Verfahren zur Isolierung der Laccase von den Zellen getestet worden waren, die alle im Vergleich mit den an ganzen Zellen gemessenen Laccaseaktivitäten nur zu niedrigen Ausbeuten geführt hatten, wurden verschiedene Zellaufschlussverfahren getestet und eine Methode zum mechanischen Aufschluss mittels Glassbeads optimiert. Der Aufschluss erforderte die Durchführung wiederholter Aufschlusszyklen, da sich die Zellen, wohl aufgrund der melaninhaltigen Zellwand, als sehr stabil erwiesen. Wie sich im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellte, waren die Laccasen aus dem Zellaufschluss nicht identisch mit der zellassoziierten Laccase, die durch Abwaschen von lyophilisierten Zellen gewonnen wurde.

#### 3.3.3.1 Freeze-Thaw-Aufschluss

Nach 5 Zyklen aus Einfrieren und Auftauen der Zellen zeigte das mikroskopische Bild überwiegend intakte Zellen, aber auch einige Zelltrümmer. Es wurde eine geringe Laccaseaktivität im Überstand detektiert (1,04 mU/ml). Mit den Zellen assoziiert waren noch 12,17 mU/ml. Es wurde durch diese Methode also weniger als 10 % der Laccase von den Zellen gelöst.

#### 3.3.3.2 Zellaufschluss mit flüssigem Stickstoff

In Anlehnung an ein typisches Protokoll zum Aufschluss filamentöser Pilze wurde *H. acidophila* in flüssigem Stickstoff gemörsert. Der Zellaufschluss wurde im mikroskopischen

Bild überprüft: Es waren einzelne Zelltrümmer zu sehen, überwiegend jedoch intakt erscheinende Zellen. Nach dem versuchten Aufschlussverfahren war mit ABTS als Substrat weder an den Zellen noch in der zellfreien Fraktion eine Laccaseaktivität messbar.

### **3.3.3.3 *Ultraschallbehandlung***

Die Zellen wurden sowohl mit einem Ultraschallstab als auch in einem Ultraschallbad in verschiedenen Intervallen dem Ultraschall ausgesetzt. Keine der Ultraschallbehandlungen führte, wie das mikroskopische Bild bestätigte, zu einem Zellaufschluss. Auch konnte nach Entfernen der Zellen durch Zentrifugation keine Laccaseaktivität in den resultierenden Überständen detektiert werden.

### **3.3.3.4 *Zellaufschluss durch das FastProtein Red-Kit***

Das Zellaufschlusskit FastProtein Red ist speziell auf den Aufschluss von Zellen abgestimmt. Der Zellaufschluss wurde analog zur Herstellerbeschreibung mit dem mitgelieferten Puffer durchgeführt. Wie im mikroskopischen Bild zu erkennen war, konnte mit dieser Methode ein partieller Zellaufschluss erreicht werden. Dies wurde zudem auch durch den Proteingehalt nach dem Aufschluss in der zellfreien Fraktion (1 mg/ml) belegt. Auch die Laccaseaktivität wurde bestimmt, es konnte im Zellextrakt jedoch nur eine sehr geringe Extinktionsänderung im ABTS-Test nachgewiesen werden. Während des Testverlaufes kam es außerdem zu einer Trübung der Probe, so dass die Extinktionsänderung wahrscheinlich nicht auf eine ABTS-Oxidation und damit eine echte Laccaseaktivität zurückzuführen war.

Beim Aufschluss von Zellen, die für 3 Tage unter Zusatz von 0,1 % Ascorbinsäure gewachsen waren (s. 3.6.1.4), konnte hingegen ein vollständiger Zellaufschluss erreicht werden. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde die Zellaufschlussprobe einem ABTS-Test unterzogen. Im Medium ohne Zusatz von Kupfer wurden 4,5 mU/ml gemessen, bei einem Medium mit Zusatz von 0,04 mM Kupfer konnten bis zu 8 mU/ml Laccaseaktivität detektiert werden. Die hier vermessenen Proben enthielten keine Ascorbinsäure mehr und befanden sich am Anfang des Pigmentierungsprozesses. Geringe Mengen an Melanin hatten sich bis zur Laccasemessung bereits gebildet, die Proben waren also nicht absolut melaninfrei. Wurde zu einem früheren Zeitpunkt gemessen und war also noch Ascorbinsäure im Medium vorhanden, erfolgte jedoch kein positiver ABTS-Test.



### 3.3.3.5 Mechanischer Zellaufschluss

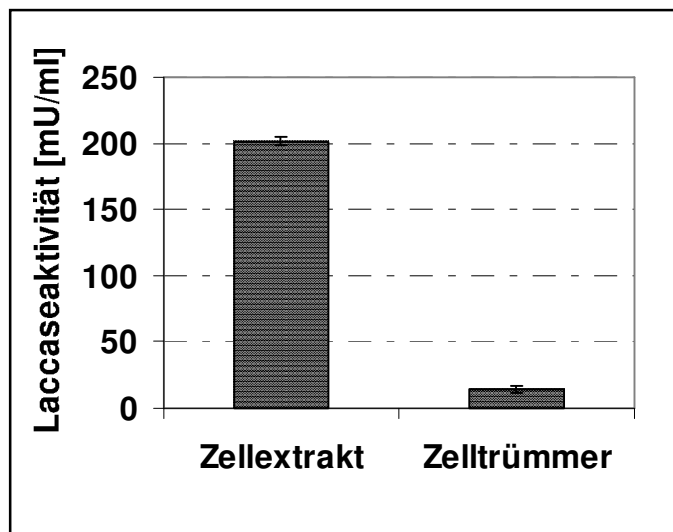
Ein Zellaufschluss konnte schließlich mit einem mechanischen Verfahren erreicht werden, bei dem Glasperlen und der detergentienhaltige TSN-Puffer eingesetzt wurden. Mit einem Standardprotokoll, das zur DNA-Extraktion genutzt wird (2.5.3.5), konnte allerdings praktisch kein Zellaufschluss erreicht werden (Tabelle 3.6, 1). Um die Methode zu optimieren, wurden deshalb Puffer und Schüttelfrequenz bzw. –dauer variiert. Der Erfolg der Methode wurde durch Test der Laccaseaktivität im Zellextrakt und lichtmikroskopische Bild kontrolliert. Die Entwicklung der Methode ist in Tabelle 3.6 dargestellt.

**Tab. 3.6: Optimierung des Zellaufschlusses unter der Prämisse der Laccasegewinnung.** Lyophilisierte *H. acidophila* Zellen wurden verschiedenen Schüttelfrequenzen und –zeiten unterzogen. Die Proben wurden nach jedem Schüttelzyklus auf Eis abgekühlt. Die Laccaseaktivitäten wurden unter Standardbedingungen mit ABTS als Substrat ermittelt und die Werte repräsentieren je einen typischen Aufschlussversuch. 0 = kein Aufschluss, + partieller Aufschluss, ++ vollständiger Zellaufschluss.

	Schüttelfrequenz	Schüttel- dauer	Puffer	Laccaseaktivität im zellfreien Zellextrakt	Erfolgreicher Zellaufschluss (Lichtmikroskop)
1	Vortexen	2 Minuten	TSN	15 mU/ml	0
2	Stufe 6 Ribolyser	3 x 40 Sekunden	TSN	56 mU/ml	+
3	Stufe 6 Ribolyser	6x 40 Sekunden	TSN	69 mU/ml	+
4	Stufe 6 Ribolyser	8x 45 Sekunden	TSN	241 mU/ml	++
5	Stufe 6 Ribolyser	8x 45 Sekunden	McIlvaine pH 4,5	187 mU/ml	++

Um einen Zellaufschluss zu erreichen, waren wiederholte Schüttelzyklen mit dem Hybrid Ribolyser notwendig. Vortexen führte nicht zu einem im Mikroskop sichtbaren Zellaufschluss. Dabei mussten die Proben wegen der Erhitzung durch die Reibungswärme nach jedem Zyklus auf Eis abgekühlt werden, um die Laccaseaktivität zu erhalten. Mit Methode 4 (Tab. 3.6) wurden 93 % der Laccaseaktivität von den Zellen abgelöst (Abb. 3.4).

Die Güte des Zellaufschlusses war stark von der Wahl des Puffers abhängig. Die besten Ergebnisse wurden mit detergentienhaltigem TSN-Puffer erzielt. Mit McIlvaine-Puffer wurden nur ca. 80% der Aktivität der analog durchgeführten Methode mit TSN-Puffer erreicht. Für weitere Versuche wurde deshalb TSN-Puffer verwendet.



**Abb. 3.4: Effektivität des optimierten Zellaufschlusses.** Der Zellaufschluss wurde mit Glassbeads, TSN-Puffer und 8 Schüttelzyklen à 45 Sekunden erreicht. Anschließend wurden die verbliebenen Laccaseaktivitäten an den Zelltrümmern und die Laccaseaktivitäten im zellfreien Zellextrakt mit ABTS als Substrat bestimmt. Die Aktivitäten beziehen sich auf einen Milliliter Zellextrakt bzw. die Menge Zellen, die zum Aufschluss dieses Milliliters Zellextrakt notwendig waren.

Wurden die Proteine des Zellextraktes in einer SDS-PAGE aufgetrennt, so ergab sich kein distinktes Bild, was von der Vielzahl der im Zellextrakt enthaltenen Banden zeugte. Aus TSN-Puffer direkt gefällte Proben konnten für die Elektrophorese nicht verwendet werden, da sich hierbei ein verzögertes Laufverhalten der Proteine zeigte was wohl auf die hohe Salz- und SDS-Konzentration im Puffer zurückzuführen ist. Die Zellextrakt-Proben wurden deshalb vor der SDS-PAGE über VivaSpin Röhren umgepuffert.

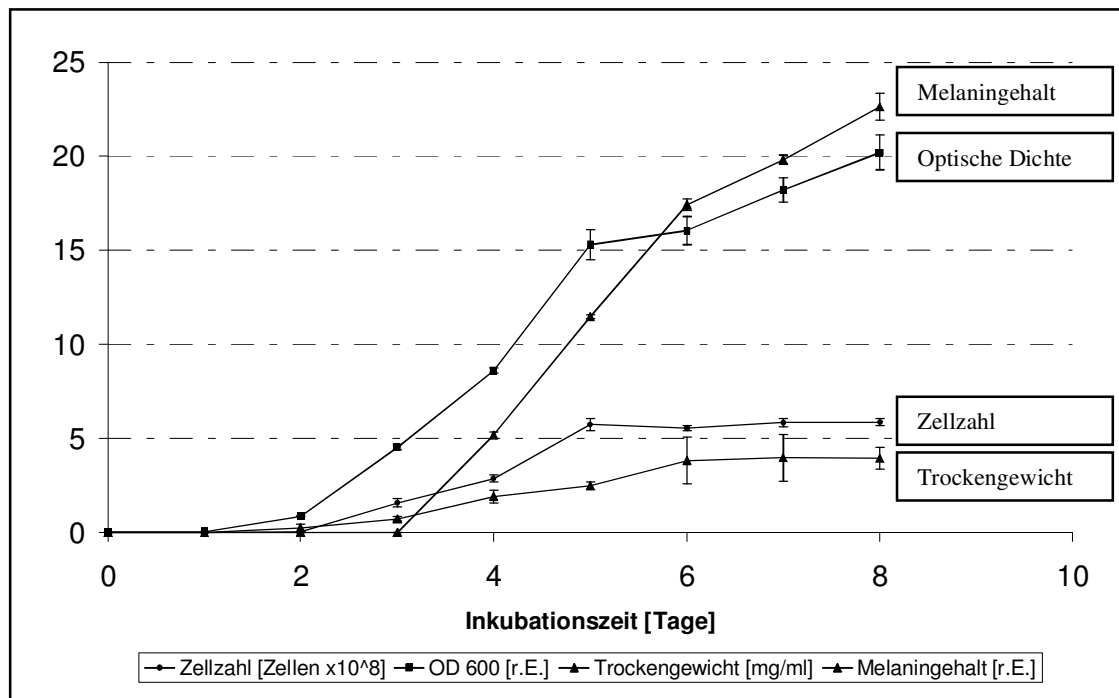
### **3.4 Optimierung der Kulturbedingungen zur Steigerung der Laccaseaktivität**

Unter nicht optimierten Bedingungen dauerte es verhältnismäßig lange (9 Tage) bis im Kulturüberstand Aktivitäten für eine ausreichende Ernte erreicht wurden. Deshalb sollten die Kulturbedingungen dahingegen geändert werden, eine höhere Ausbeute in kürzerer Zeit zu erreichen. Außerdem stellte sich heraus, dass während des Wachstums von *H. acidophila* im Kulturüberstand eine steigende Melaninkonzentration messbar wurde, welches erhebliche Probleme bei der Handhabung hervorrief (s. 3.6.1.1). Deshalb war ein weiterer Ansatz für die Optimierung eine Reduzierung des Melaningehaltes im Kulturüberstand. Als veränderbare Parameter kamen in Frage: pH-Wert, Stickstoffquelle, Kohlenstoffquelle, Schüttelfrequenz, Inkubationstemperatur und Zusatz von potenziellen Induktoren. Außerdem wurde eine Kultur unter Zugabe von Ascorbinsäure angezogen, bei der die Melaninproduktion durch die antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure unterbunden werden sollte. Da zu Beginn der Optimierungsversuche noch von dem Vorliegen von ausschließlich extrazellulären Laccasen ausgegangen wurde, wurden die Kulturbedingungen auf die extrazellulären Laccasen von *H. acidophila* hin optimiert.

#### **3.4.1 Vergleich der Tests zur Biomassebestimmung**

Um festzustellen welcher Test für die Biomassebestimmung in *H. acidophila* Kulturen am geeignetsten war, wurden OD<sub>600</sub>, Trockengewicht und Zellzahl parallel über 8 Tage Wachstum verfolgt (Abb. 3.5). Außerdem wurde der relative Melaningehalt über die Zeit ermittelt. Der Melaningehalt lag nach fünftägiger Inkubation unter Optimalbedingungen bei 0,23 relativen Einheiten und stieg im weiteren Verlauf der Inkubation noch deutlich an. Zellzahl, Trockengewicht und optische Dichte verliefen bis zur stationären Phase parallel, danach stiegen die Werte, die über die optische Dichte ermittelt wurden, jedoch weiter an, obwohl Zellzahl und Trockengewicht in etwa konstant blieben. In der exponentiellen Phase eignen sich also alle getesteten Verfahren zur Biomassebestimmung, in der stationären Phase hingegen ist die optische Dichte nicht mehr verlässlich und es sollte eine Zellzahl- oder eine Trockengewichtsbestimmung durchgeführt werden. Für eine verlässliche Trockengewichtsbestimmung waren allerdings große Kulturvolumina nötig, die nicht für alle Versuche zur Verfügung standen. In der Regel wurde deshalb die Zellzahl zur Biomassebestimmung herangezogen. Unter den getesteten Bedingungen wuchs *H. acidophila* überwiegend als Hefe, was die Zellzahlbestimmung erst möglich und verlässlich machte. Ob

die Zellzahlbestimmung auch für sehr suboptimale Bedingungen, bei denen *H. acidophila* mehr Mycel bildet, geeignet ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

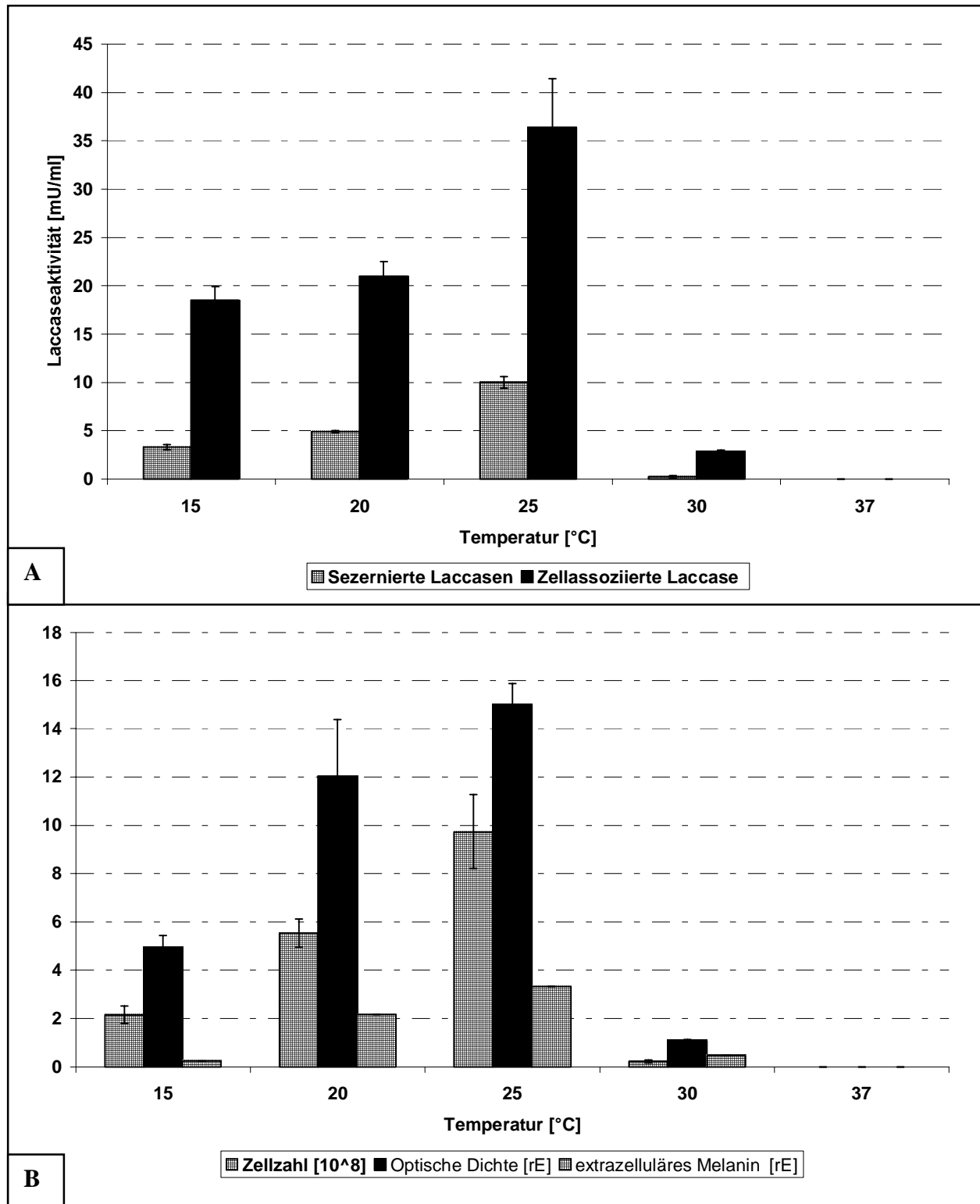


**Abb. 3.5 Biomasseentwicklung und Melaningehalt im Kulturüberstand im Kulturverlauf von *H. acidophila* Kulturen.** Die Kulturen wurden bei 25 °C, 120 rpm Schüttelfrequenz und mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Thomazählkammer bestimmt, der Melaningehalt als Extinktion bei 350 nm. Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden je nach Zelldichte bis zu 10ml Kultur entnommen, die Zellen mehrfach mit Reinstwasser gewaschen und dann bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurde die Gewichts Differenz bestimmt. Für die Bestimmung der optischen Dichte wurde die Probe so verdünnt, dass die OD unter 0,3 lag. r.E. = relative Einheiten.

### 3.4.2 Inkubationstemperatur

Eine Erhöhung der Wachstumstemperatur ließ ein gesteigertes Wachstum erwarten, das möglicherweise mit einer Steigerung der Laccaseaktivitäten einherging. Deshalb wurde der Effekt der Inkubationstemperatur auf Zellwachstum und Laccaseaktivität untersucht. *H. acidophila* wurde bei 15, 20, 25, 30 und 37 °C angezogen. Biomasse, Melaningehalt des Kulturüberstandes, Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand und assoziiert mit den Zellen zeigten einen Anstieg unterhalb von 25 °C und einen deutlichen Abfall oberhalb dieser Temperatur. Wie in Abb. 3.6B dargestellt ist, lag die optimale Wachstumstemperatur der Hefe bei 25 °C. Bei 37 °C konnte auch nach dreimonatiger Inkubation kein Wachstum beobachtet werden. Die Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand und assoziiert mit den Zellen waren nach fünftägiger Inkubation bei 25 °C fast doppelt so hoch wie bei der parallel behandelten Kultur von 20 °C (Abb. 3.6 A). Bei Steigerung der Inkubationstemperatur um weitere 5 °C auf 30 °C kam es jedoch nicht zu einem erneuten Anstieg der Laccaseaktivitäten, sondern zu einem über

90%igen Abfall. Die optimale Temperatur in Bezug auf die extrazelluläre Laccaseaktivität war demnach 25 °C und wurde für die weiteren Versuche verwendet.



**Abb. 3.6: Laccaseaktivitäten (A), Biomasse und extrazellulärer Melaningehalt (B) in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.** Die Messung erfolgte nach fünftägiger Inkubation von *H. acidophila* bei 150 rpm, pH 3,5 und Trypton als Stickstoff- und Glukose als Kohlenstoffquelle. Die Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand wurden mit ABTS als Substrat ermittelt und beziehen sich auf 1 ml Kultur. Der extrazelluläre Melaningehalt wurde durch Messung bei 350 nm ermittelt (rE = relative Einheiten). Die gebildete Biomasse wurde über die Optische Dichte bei 600 nm bzw. über die Zellzahl bestimmt. Die Standardabweichungen wurden aus drei Versuchen ermittelt (Fehlerbalken).

### 3.4.3 pH-Wert

Zur Optimierung des Kultur-pH-Wertes wurde *H. acidophila* bei pH 3, 4, 5 bzw. 6 angezogen. Nach 5 Tagen Inkubation bei 25 °C wurden die Optische Dichte (OD<sub>600</sub>) sowie Melaningeht und extrazelluläre Laccaseaktivität im Kulturüberstand bestimmt. Die Laccaseaktivitäten bei pH 3 und 4 lagen mit 5,9 mU/ml in etwa gleich, bei höheren pH-Werten sanken die Aktivitäten deutlich ab. Der Melaningeht im Kulturüberstand stieg kontinuierlich mit steigendem pH-Wert. Das Wachstum der Hefekulturen war am besten zwischen pH 3 und 4. Es wurden hier optische Dichte um 10 gemessen, während die OD<sub>600</sub> bei pH 5 bei etwa 7 und bei pH 6 bei nur noch 5,8 lag. Da für die Aufreinigung der Laccase eine Anzucht mit gutem Zellwachstum, maximaler Laccaseausbeute und minimaler Melaninkonzentration gewünscht war, wurde für die weiteren Versuche wie zuvor ein Medium mit pH 3,5 verwendet.

### 3.4.4 Stickstoffquelle

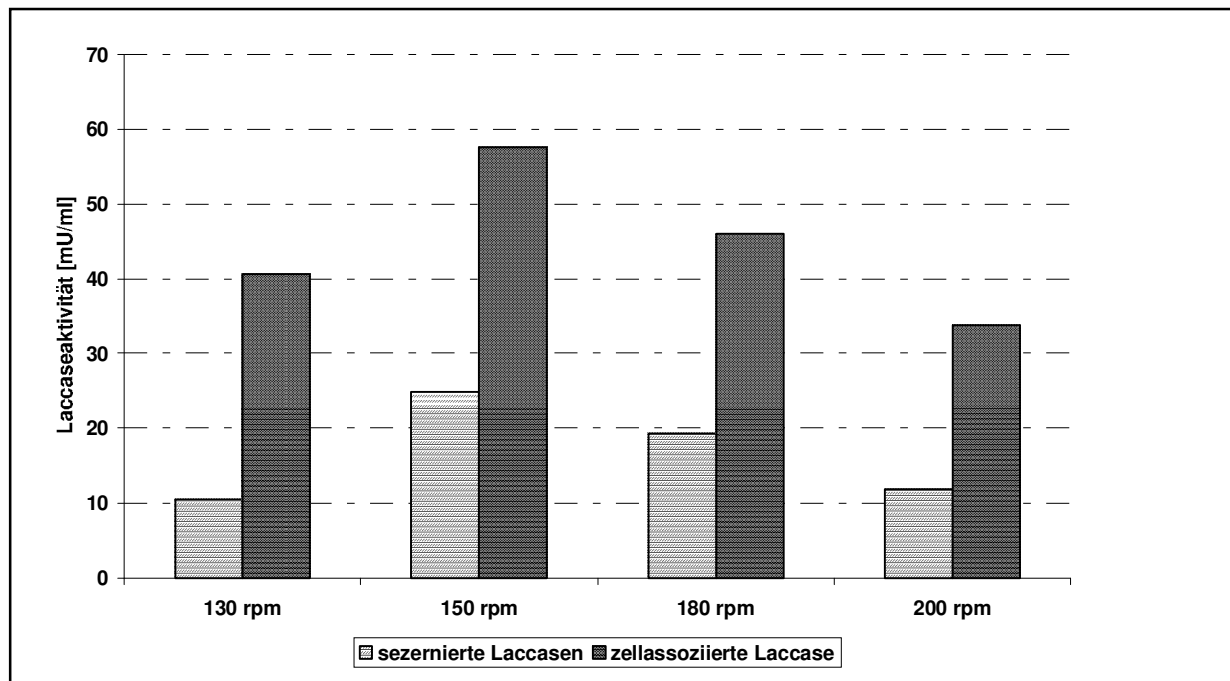
Im Standardanzuchtsmedium wurde stets Trypton, ein Caseinhydrolysat, als komplexe Stickstoffquelle verwendet. Um die Hefe bei definierten Bedingungen anziehen zu können, wurde dem Medium eine Mischung verschiedener Aminosäuren und Vitamine zugesetzt (s.2.2.2). Die Laccaseaktivität im Kulturüberstand in diesem definierten Medium und in einem parallel behandelten Standardmedium (mit Trypton) wurde über 5 Tage verfolgt. Die Hefe wuchs im Medium mit Aminosäure-/Vitaminmix statt Trypton wesentlich langsamer als in den Kontrollkulturen. Nach 5 Tagen Wachstum bei 25 °C wurde hier eine Zelldichte von  $0,18 \times 10^7$  Zellen pro ml erreicht, in den Kontrollkulturen waren es hingegen  $4,5 \times 10^7$  Zellen/ml. Das Wachstum war also in den Minimalmediumskulturen in etwa um den Faktor 25 schlechter als bei der standardmäßigen Anzucht. Die Laccaseaktivitäten stiegen in der Kultur mit Trypton ebenfalls deutlich schneller an. Nach 5 Tagen lag die Laccaseaktivität im Kulturüberstand bei Zusatz von Trypton (10,70 mU/ml) ungefähr fünffach höher als in den definierten Kulturen (2,13 mU/ml). In den definierten Kulturen mit Aminosäuren und Vitaminen als Stickstoffquelle konnte im Gegensatz zu den Standardkulturen kein Melanin im Kulturüberstand nachgewiesen werden.

Neben dem Zusatz von Aminosäuren wurde auch das Wachstum mit anorganischen Stickstoffquellen getestet. Mit Kaliumnitrat ergab sich nach 14 Tagen nur ein sehr geringes Wachstum der Hefe auf festen Medien (Abb. 3.1). Mit Ammoniumsulfat stellte sich die Situation ähnlich dar. Es kam nach 2-3 Wochen zu einem erkennbaren Wachstum auf festen

Medien. In Flüssigkultur dauerte es mehrere Monate bis eine akzeptable Zelldichte erreicht war. Die Anzucht von *H. acidophila* mit einer alternativen Stickstoffquelle trug demnach nicht zu einer Steigerung der Laccaseaktivitäten bei. Deshalb wurde weiterhin die komplexe Stickstoffquelle Trypton eingesetzt.

### 3.4.5 Schüttelfrequenz

Um die optimale Schüttelfrequenz zu ermitteln, wurden die Schüttelgeschwindigkeiten 130, 150, 180 und 200 rpm auf einem Rotationsschüttler getestet. Der Versuch wurde wegen der größeren Platzkapazitäten in Zusammenarbeit mit Dr. H.P. Call in Übach-Palenberg durchgeführt.



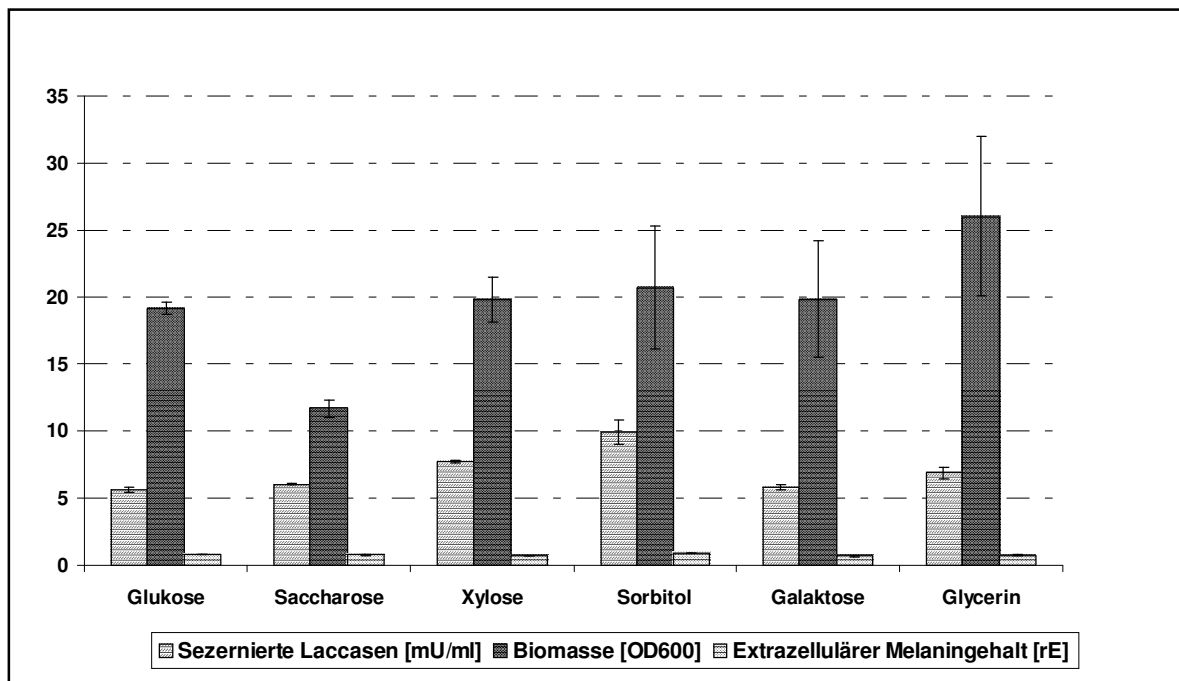
**Abb. 3.7 Laccaseaktivitäten in Abhängigkeit von der Schüttelfrequenz.** Nach viertägiger Inkubation der *H. acidophila* Kulturen bei 25 °C, pH 3,5, Glukose als Kohlenstoffquelle und Trypton als Stickstoffquelle wurden die Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand bzw. an den Zellen mit ABTS als Substrat bestimmt. Die angegebenen Laccaseaktivitäten beziehen sich jeweils auf 1ml Kultur. Die Werte stellen exemplarisch einen typischen Versuch dar.

Dabei ergaben sich die in Abb. 3.7 dargestellten Laccaseaktivitäten. Die höchste Aktivität wurde in bei 150 rpm geschüttelten Kulturen erreicht. Parallel zur Anzucht in Rundschüttelkolben wurden auch Erlenmeyerkolben genutzt. Zudem wurde ein Schüttler mit linearer Schüttelbewegung in die Untersuchungen mit einbezogen. Bei Verwendung der anderen Kolben oder des anderen Schüttlers wurden keine signifikanten Änderungen bei den

Laccaseaktivitäten festgestellt. In den nachfolgenden Versuchen wurden die Kulturen bei 150rpm geschüttelt.

### 3.4.6 Kohlenstoffquelle

Der Einfluss der Wahl der Kohlenstoffquelle auf Wachstum und Laccaseaktivität von Pilzen wird in der Literatur diskutiert. Deshalb wurde auch für *H. acidophila* getestet, welche Kohlenstoffquelle sich am besten zur Anzucht von *H. acidophila* eignet und mit welcher Kohlenstoffquelle die höchsten Laccaseaktivitäten erreicht werden können. Die Hefe wurde dazu im üblichen Anzuchtsmedium (2.2.1) angezogen, bei dem allerdings Glukose durch eine äquimolare Menge einer anderen Kohlenstoffquelle ersetzt worden war.



**Abb. 3.8. Laccaseaktivitäten, Biomasse und Melaningegehalt im Kulturüberstand in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle des Mediums.** Die Messung erfolgte nach fünftägiger Inkubation von *H. acidophila* bei 25 °C, 120 rpm, pH 3,5 und Trypton als Stickstoffquelle. Die Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand wurden mit ABTS als Substrat ermittelt und beziehen sich auf 1ml Kultur. Der extrazelluläre Melaningegehalt wurde durch Messung bei 350 nm ermittelt (rE = relative Einheiten). Die gebildete Biomasse wurde über die Optische Dichte bei 600nm [rE] bestimmt. Die Standardabweichungen wurden aus drei Versuchen ermittelt (Fehlerbalken).

Es wurden Saccharose, Xylose, Sorbitol, Galactose und Glycerin verwendet. Als Kontrolle wurde das übliche Anzuchtsmedium mit Glukose verwendet. Nach fünftägiger Inkubation bei 22 °C, 120 rpm, pH 3,5 und Trypton als Stickstoffquelle wurden Melaningegehalt, optische Dichte und Laccaseaktivität im Kulturüberstand bestimmt. Wie man in Abb. 3.8 erkennen kann, waren die Kulturen mit Glycerin am besten gewachsen, die Kulturen mit Saccharose am

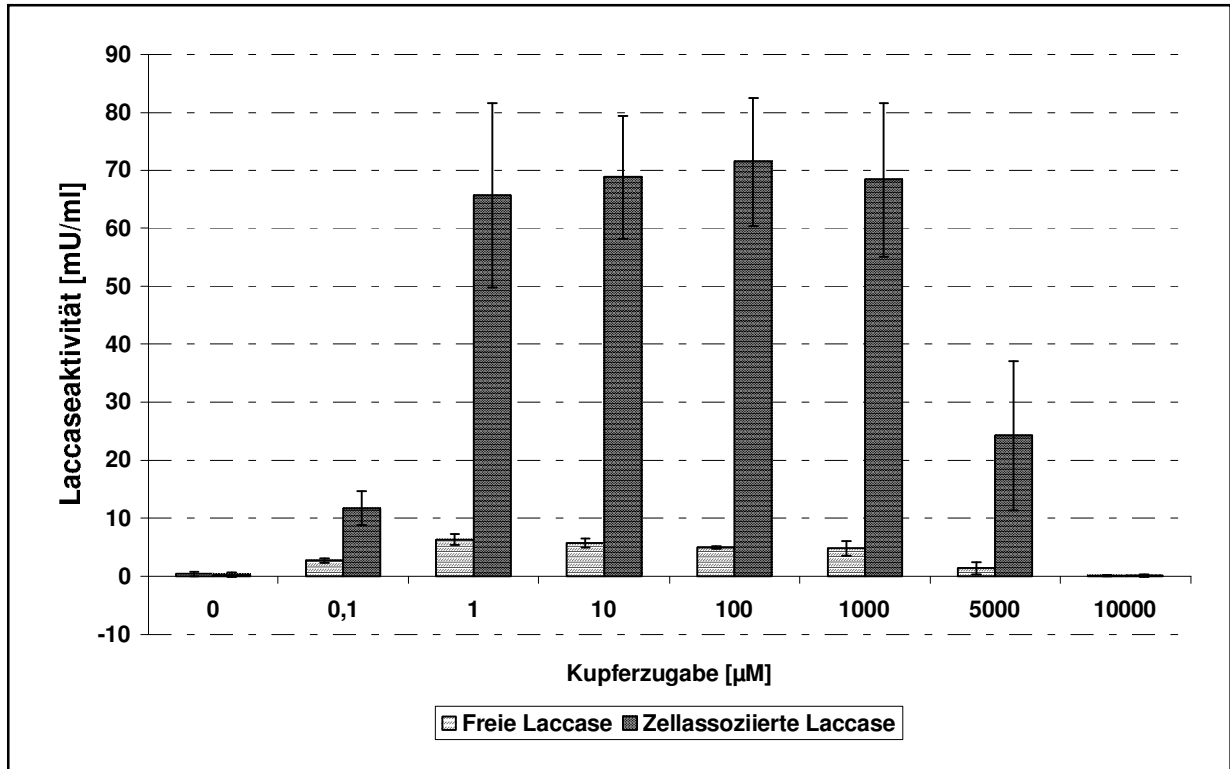


schlechtesten. Die höchste Laccaseaktivität zeigte sich in den Kulturen mit Sorbitol. Bei ähnlich gutem Wachstum wie mit Glukose war die Laccaseaktivität hier ca. doppelt so hoch wie im Standardmedium. Melanin wurde von den Hefen offensichtlich in Abhängigkeit vom Wachstum gebildet: Je besser *H. acidophila* gewachsen war, desto mehr Melanin wurde im Kulturüberstand nachgewiesen. Allerdings waren die Unterschiede in der Melaninkonzentration bei den verschiedenen Kohlenstoffquellen marginal. Das Kontrollmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle ergab im Verhältnis eine geringere Laccaseaktivität, jedoch hohe Melaninkonzentrationen. Sorbitol schien sich also als Kohlenstoffquelle für den Zweck der Laccasegewinnung in *H. acidophila* am besten zu eignen und wurde deshalb für die folgenden Versuche als Standard eingesetzt.

### **3.4.7 Steigerung der Laccaseaktivität durch Zusatz von potenziellen Induktoren**

**Kupfer:** Um die Laccaseproduktion anzuregen, wurde zunächst die Kupferkonzentration im Medium erhöht, da sich die Kupferabhängigkeit der Laccasen aus dem Kulturüberstand ja schon in den Vorversuchen erwiesen hatte (s.3.1). Wurde dem Medium kein Kupfer zugegeben, war sowohl die freie als auch die mit den Zellen assoziierte Laccaseaktivität sehr gering (Abb. 3.9). Eine Erhöhung der Kupferkonzentration auf 100  $\mu\text{M}$  Kupfer im Medium ergab eine etwa 70fache Steigerung der Laccaseaktivität. Eine Erhöhung der Kupferkonzentration über mehrere 1000  $\mu\text{M}$  Kupfer hinaus hatte ein vermindertes Wachstum und ebenso verminderte Laccaseaktivitäten zur Folge. Im Bereich zwischen 10 und 1000  $\mu\text{M}$  Kupfer gab es die Laccaseaktivität betreffend kaum Unterschiede. Für die folgenden Versuche wurde die Anfangskupferkonzentration standardmäßig auf 250  $\mu\text{M}$  Kupfer im Medium festgelegt.

Der Zeitpunkt der Kupferzugabe spielte keine Rolle. Wurde das Kupfer an Tag 2 oder 3 der Inkubation zugegeben und nicht direkt zum Wachstumsmedium, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Laccaseaktivität.



**Abb. 3.9 Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand und assoziiert mit den Zellen in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration im Medium.** Die Messung erfolgte nach fünftägiger Inkubation von *H. acidophila* bei 150 rpm, pH 3,5 und Trypton als Stickstoff- und Glukose als Kohlenstoffquelle. Durch das Trypton kam es zu einer Kupferverunreinigung des Mediums von etwa 8 µM, die in allen Kulturen schon vor Zusatz des Kupfersulfates vorlag. Die Laccaseaktivitäten wurden mit ABTS als Substrat ermittelt und beziehen sich auf 1ml Kultur. Die Zelldichten waren am höchsten in den Kulturen bis zu 1µM Kupfersulfatzusatz, danach kam es zu einem Abfall derselben. Die Standardabweichungen wurden aus drei Versuchen ermittelt (Fehlerbalken).

Ein bekannter Schutzmechanismus gegen hohe Schwermetallkonzentrationen ist der Einbau der Ionen ins Melaningerüst. Um festzustellen, ob Kupfer auch in die Zellwand von *H. acidophila* eingebaut wird, wurden die Zellwandfragmente enthaltenden Zelltrümmer nach einem Zellaufschluss einer Atomabsorptionsspektroskopie unterzogen. In den Zelltrümmern konnten 5,4 mg Kupfer pro g Zellen (Trockengewicht) detektiert werden. Im Kulturmedium waren vor der Anzucht 16,4 mg/l Kupfer enthalten. Insgesamt wurde also etwa ein Drittel des im Medium enthaltenen Kupfers aus dem Medium in die Zellen bzw. Zellwände eingelagert. Außerdem wurden die Kulturüberstände vor und nach Anzucht auf ihren Kupfergehalt untersucht. Nach der Anzucht waren im Kulturüberstand von mit 250 µM Kupfersulfat induzierten Kulturen noch 177 µM Kupfer vorhanden. Das sind etwa 30 % weniger als zu Anfang.

Wenn Kupfer in die Zellwand eingelagert wird, müsste dieser Effekt umso stärker sein, je mehr Zellen vorhanden sind. Um dies zu überprüfen, wurden Kulturen unter

Standardbedingungen für 3 Tage angezogen und dann mit einer Kupferkonzentration (10 mM) konfrontiert, in der *H. acidophila* normalerweise nicht wachsen konnte (Abb. 3.9). Das weitere Wachstum nach dieser Kupferzugabe wurde dokumentiert. Es ließ sich tatsächlich eine Zunahme des Wachstums zeigen. Bei Kupferzugabe lag die Optische Dichte bei 3, zwei Tage später lag sie bei 5,7 und weitere zwei Tage später bei 11,1. Die Laccaseaktivitäten waren mit 2,58 mU/ml im Kulturüberstand und 27,43 mU/ml an den Zellen im Vergleich zu normalen Kulturen nicht erhöht.

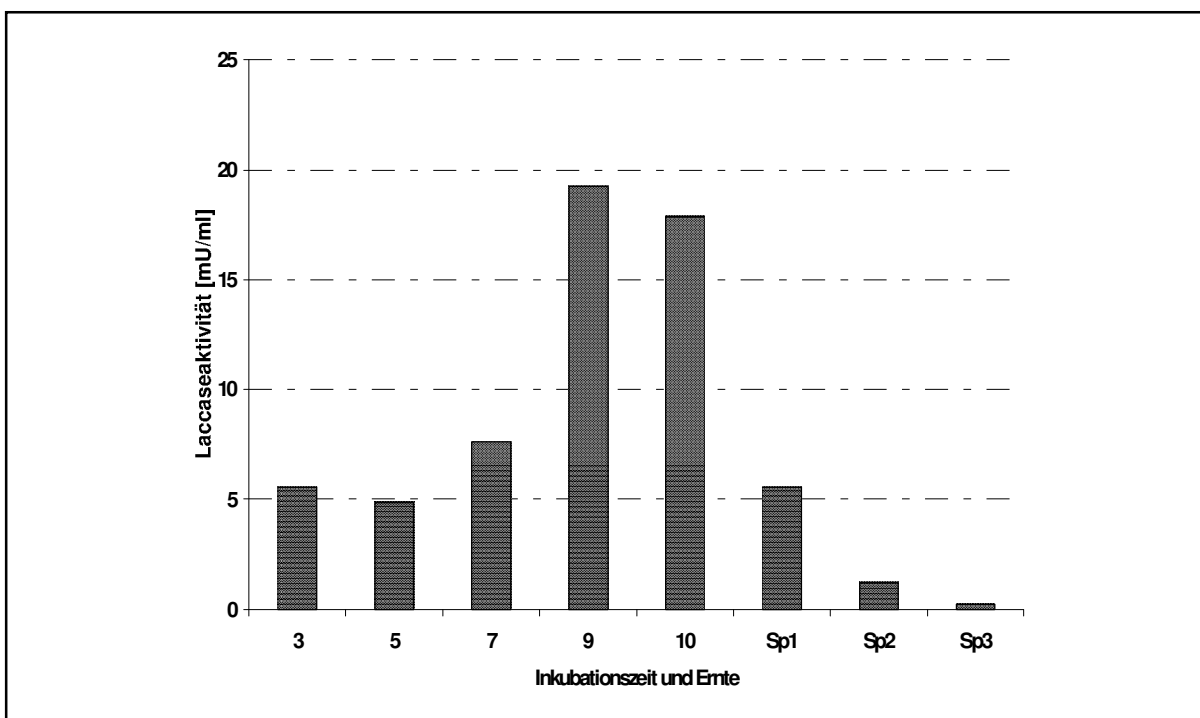
### **Huminsäuren, Phenolsulfonphthalein**

Neben der Induktion durch Kupfer wurden den *H. acidophila* Kulturen verschiedene potenzielle Induktoren zugesetzt. Die Stoffe wurden den Hefekulturen jeweils in der exponentiellen Phase zugegeben. Es wurden Huminsäuren und Phenolsulfonphthalein (Phenolrot) verwendet. 6 Stunden, 1 Tag und 1,5 Tagen nach der Induktion wurde die Laccaseaktivität im Kulturüberstand bestimmt. Als Referenz dienten gleichbehandelte Kontrollkulturen, die nicht mit einem Zusatz versehen worden waren. Die Kulturen, denen Huminsäuren zugesetzt worden waren, zeigten bei allen Testreihen nur etwa die Hälfte der Aktivität der Kontrollkulturen. Nur nach Zugabe von Phenolrot ergab sich die Tendenz zu einer Aktivitätssteigerung. Nach 6 Stunden waren in diesen Kulturen 11 %, nach einem Tag 16 % und nach 1,5 Tagen immer noch 8 % mehr Laccaseaktivität im Kulturüberstand vorhanden als in den Kontrollkulturen. Bei der Messung der zellassoziierten Laccaseaktivität war die Aktivität um 4% gesteigert. Der Zusatz von Phenolrot zu den Kulturen führte aber nicht zu einer so deutlichen Steigerung, dass er als Standard für die nachfolgenden Versuche verwendet worden wäre.

### **3.4.8 Anzucht von *H. acidophila* im Rieselfilmverfahren**

Durch die Anzucht im Rieselfilmverfahren sollte eine Enzymgewinnung in größerem Maßstab realisiert werden, da dieses Verfahren für Pilze und die Produktion extrazellulärer Enzyme besonders geeignet ist. Die Grundidee ist dabei, den Pilz auf einem Träger zu immobilisieren und die extrazellulären Enzyme mit der Rieselflüssigkeit zu ernten. Auch *H. acidophila* wurde auf einem inerten Träger (Polyurethanschaum) inokuliert und regelmäßig mit Rieselmedium benetzt, um Wachstum und Enzymproduktion zu fördern. Die Laccaseaktivität im Rieselmedium wurde über die Zeit verfolgt. Die Laccaseaktivität nahm bis Tag 9 deutlich bis auf einen Wert von 19,25 mU/ml zu, sank danach aber wieder ab. Die Zellen konnten durch dieses Verfahren nicht auf dem inerten Träger immobilisiert werden,

sondern die Zellen wuchsen auch im Rieselmedium an. Anhand der Proteingehalte konnte man feststellen, dass die Rieselflüssigkeit trotz fehlender Immobilisierung der Zellen deutlich stärker konzentriert war als ein vergleichbarer Kulturüberstand aus Submerskultur: Die Proteingehalte lagen bei 3,8  $\mu\text{g/ml}$  im Kulturüberstand der submers angezogenen Kontrollkultur, 15  $\mu\text{g/ml}$  im Rieselmedium und 25  $\mu\text{g/ml}$  in der ersten Spülflüssigkeit. Nach 9 Tagen war das Maximum der Laccaseaktivität erreicht (Abb. 3.10). Die Werte waren fast doppelt so hoch wie in der Kontroll-Submerskultur. Da aber jeweils nur wenige Milliliter der laccasehaltigen Lösungen vorhanden waren und deshalb die Gesamtausbeute gering war, wurde dieser Versuchsansatz nicht weiter verfolgt.

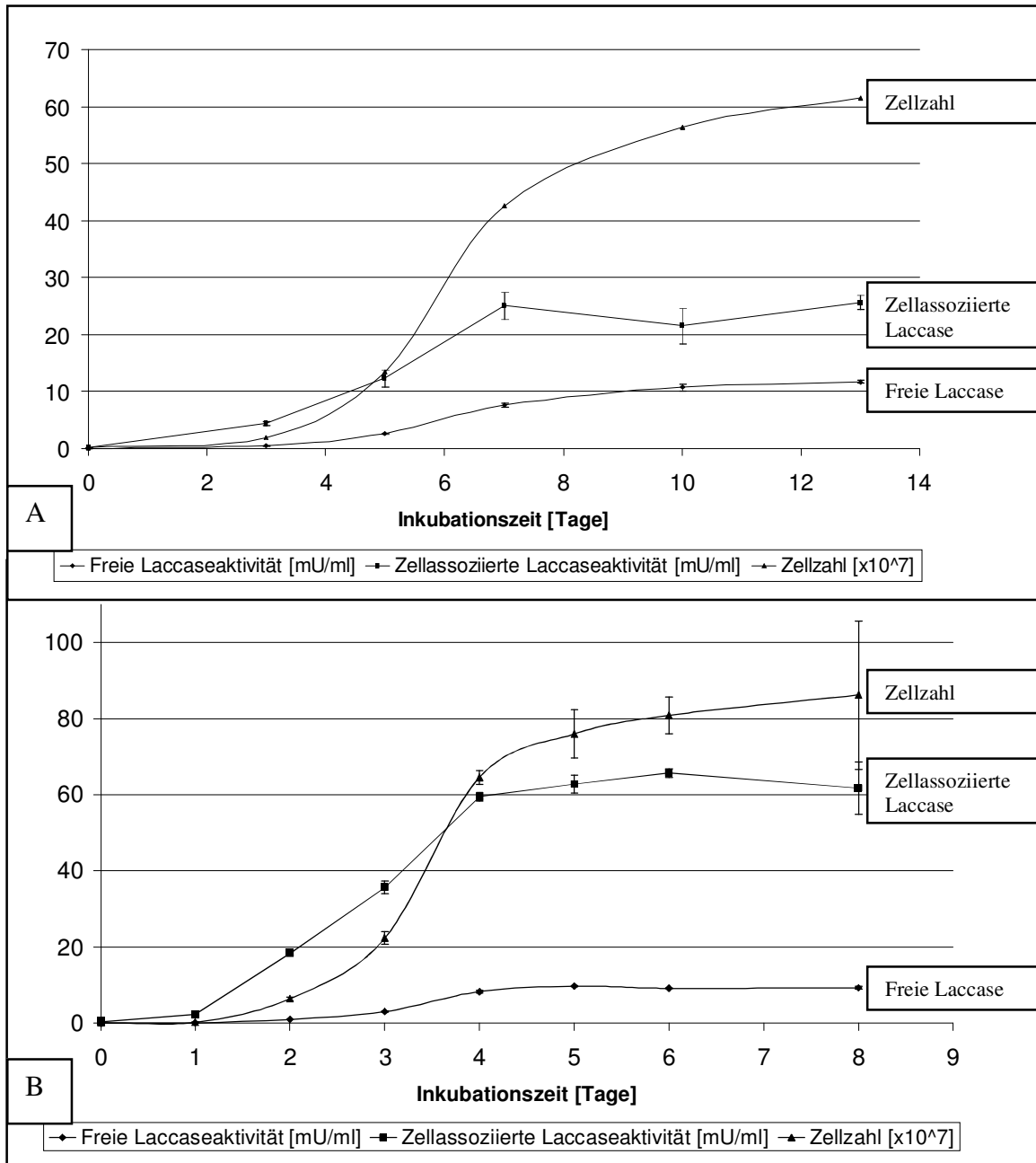


**Abb. 3.10: Laccaseaktivitäten während der Fermentation im Rieselfilmverfahren und nach der Ernte in den einzelnen Spülflüssigkeiten** *H. acidophila* wurde in einem Fungtrix Feststofffermenter auf dem inerten Träger PU-Schaum mit dem üblichen Anzuchtsmedium als Rieselmedium unter Standardbedingungen bei 22 °C angezogen. Während des Wachstums wurde das Medium mehrfach täglich im Kreis geführt, um die Nährstoffversorgung des Organismus zu gewährleisten. In dieser Rieselflüssigkeit wurde die Laccaseaktivität bestimmt. Nach 10 Tagen wurde der Fermenter durch Spülen mit Puffer abgeerntet und auch in diesen Spülflüssigkeiten wurde die Laccaseaktivität bestimmt. Die Laccaseaktivitäten wurden mit ABTS als Substrat ermittelt und beziehen sich jeweils auf einen Milliliter. 3-10: Tage nach Inokulierung des Fermenters, Sp1/ Sp2/ Sp3 = Spülflüssigkeiten 1-3 bei Ernte.

### 3.4.9 Anzucht unter optimierten Kulturbedingungen

Aus den vorangegangenen Versuchen wurden die Standardbedingungen wie folgt festgelegt:

- 25 °C
- 150 rpm Schüttelfrequenz
- Kohlenstoffquelle: Sorbitol
- Stickstoffquelle: Trypton
- pH-Wert: 3,5
- Induktion durch 250  $\mu\text{M}$  Kupfersulfat



**Abb. 3.11: Anzucht von *H. acidophila* unter den ursprünglichen (A) und den optimierten Bedingungen (B).** Wachstumsbedingungen bei A: pH 3,5; Glukose; Trypton; 22 °C; 250  $\mu\text{M}$  Kupfersulfat, 120rpm Schüttelfrequenz; Wachstumsbedingungen bei B: pH 3,5, Sorbitol, Trypton, 25°C, 250  $\mu\text{M}$  Kupfersulfat, 150 rpm Schüttelfrequenz. Die Laccaseaktivitäten wurden mit ABTS als Substrat ermittelt und beziehen sich jeweils auf einen Milliliter Kultur. Es wurden Zellzahl sowie die zellassozierte Laccaseaktivität und die Laccaseaktivität im Kulturüberstand ermittelt.

Um die Optimierung der Kulturbedingungen zu quantifizieren wurden Wachstumskurven mit den Parametern zellassozierte Laccaseaktivität, Laccaseaktivität im Kulturüberstand und Zellzahl unter optimierten und nicht optimierten Bedingungen aufgenommen (Abb. 3.11). Der nicht optimierten Kultur wurde genau wie der optimierten Kultur 250  $\mu\text{M}$  Kupfersulfat zugesetzt, da sich ohne diesen Zusatz keine reproduzierbaren Laccaseaktivitäten ergaben. Anhand der Grafiken kann man sehen, dass durch die Optimierung eine Verkürzung der Inkubationszeit (bis zur Ernte) von 10 auf 5 Tage erreicht wurde. Weiterhin konnte die Generationszeit von etwa 31 auf 17 Stunden gesenkt werden. Die Wachstumsrate wurde demzufolge nahezu verdoppelt. Die Laccaseaktivität im Kulturüberstand unter nicht optimierten Bedingungen nach 10 Tagen entsprach in etwa der Laccaseaktivität unter optimierten Bedingungen nach 5 Tagen. Die zellassozierte Laccaseaktivität wurde durch die Variation der Kulturbedingungen um den Faktor 2,5 gesteigert, die Biomasseproduktion wurde ebenfalls leicht nach oben verschoben.

### **3.5 Charakteristika der Laccasen**

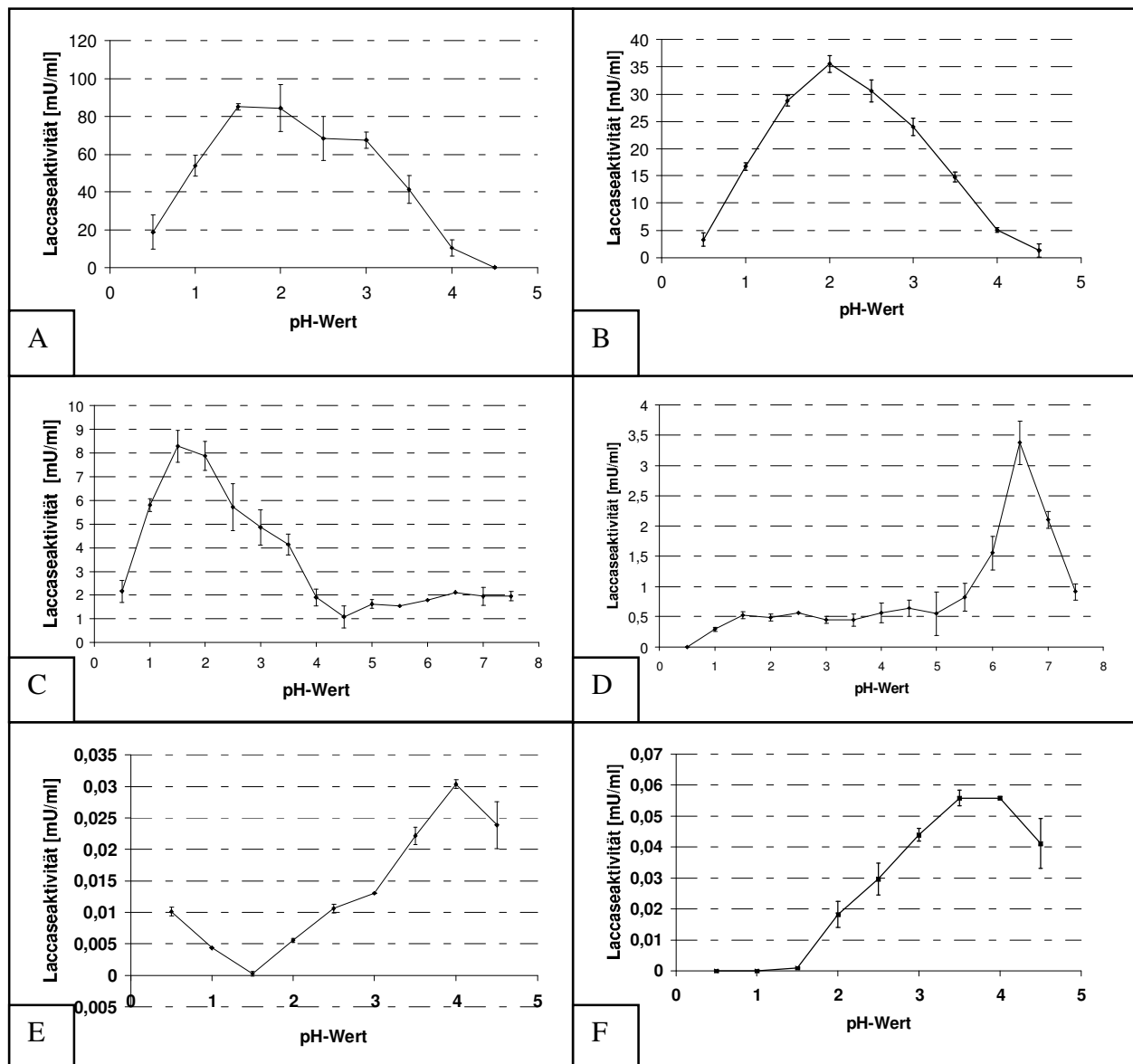
Da es sich bei *H. acidophila* um einen acidophilen Organismus handelt, war es wahrscheinlich, dass die extrazellulären Laccasen ein niedriges pH-Optimum aufweisen. Um genauere Aussagen über die verschiedenen Laccaseaktivitäten treffen zu können, musste zunächst geklärt werden, ob die Laccasen tatsächlich im Sauren ihre höchste Aktivität zeigten, wie viele Laccasen in *H. acidophila* synthetisiert wurden und wo diese lokalisiert waren. Dazu wurden verschiedene Tests zur Charakterisierung der Laccasen durchgeführt, sowie Immunhybridisierungen mit laccasespezifischen Antikörpern. Außerdem wurden als Vorbereitung für die nachfolgende Aufreinigung verschiedene Stabilitätsparameter für die verschiedenen Laccaseaktivitäten ermittelt.

#### **3.5.1 pH-Optima**

Es wurden die pH-Optima der Laccasen aus dem Kulturüberstand und dem Zellextrakt von *H. acidophila* bestimmt. Dazu wurden als Substrate ABTS, DMOP und Guajacol (2-Methoxyphenol) genutzt. Wie aus Abb.3.12 ersichtlich, lagen die pH-Optima mit ABTS sowohl mit der freien als auch mit den intrazellulären Laccasen bei pH 2. ABTS ist in seiner ersten Oxidationsstufe bei pH-Werten über 5-6 nicht stabil, weshalb das Optimum von pH 0,5-4,5 ermittelt wurde. Mit DMOP als Substrat lag das pH-Optimum der Laccase(n) im Kulturüberstand zwischen pH 6,5 und 7, während die intrazelluläre Laccaseaktivität auch mit DMOP als Substrat im Sauren, nämlich bei 1,5 optimal war. Mit Guajacol als Substrat war die Reaktion der Laccase aus dem Zellextrakt deutlich geringer als die Laccaseaktivität des Kulturüberstandes. Die pH-Optima lagen in beiden Fällen bei etwa 4. Bei den intrazellulären Enzymen gab es darüber hinaus einen Anstieg der Aktivität unterhalb von pH 1,5. Allerdings lagen die maximalen Aktivitäten nur bei 0,15 (Kulturüberstand) bzw. 0,03 mU/ml (Zellen). Als Puffer wurden Citrat/HCl-Puffer bzw. McIlvaine Puffer verwendet. Der für die Bestimmung der pH-Stabilität verwendete Britton & Robinson Puffer, der über einen sehr breiten pH-Bereich puffert, eignete sich nicht für die Bestimmung des pH-Optimums, da die Aktivitäten mit den phenolischen Substraten nicht messbar waren.

Auch für die zellassozierte Laccase wurde ein Test zur Bestimmung des pH-Optimums durchgeführt. Dazu wurden ganze Zellen in einen ABTS-Test eingesetzt. Da es bei diesem Test aber zu starken Extinktionsschwankungen kam, konnten keine verlässlichen Extinktionsunterschiede ermittelt und kein pH-Optimum bestimmt werden. Auch mit von den

Zellen abgelöster Laccase war es aufgrund zu geringer Aktivität nicht möglich, das pH-Optimum zu bestimmen.



**Abb. 3.12:** Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der Laccasen aus dem *H. acidophila* Zellextrakt (A, C, E) und aus dem Kulturüberstand (B, D, F) mit ABTS (oben), DMOP (Mitte) bzw. Guajakol (unten) als Substrat. Die Laccaseaktivitäten beziehen sich jeweils auf einen Milliliter Probe. Die Bestimmung der Laccaseaktivitäten wurde mit McIlvaine Puffer (pH 2,5-7,5) bzw. Citrat-HCl-Puffer (pH 0,5-2) des entsprechenden Test-pH-Wertes durchgeführt. Die Extinktionsänderungen der Reaktionsansätze wurden sofort im Photometer gemessen und über 10 Minuten verfolgt. Bei Guajakol wurde die Extinktionsänderung aufgrund der geringen Aktivität nach 12 Stunden bestimmt.

### 3.5.2 Substratspektrum

Generell ist das Substratspektrum kennzeichnend für Laccasen: In der Regel werden mehrfach substituierte phenolische Substrate umgesetzt, während Tyrosin und L-Dopa nicht von echten Laccasen oxidiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Substratspektrum für die



Laccasen aus konzentriertem Kulturüberstand, die von lyophilisierten Zellen abgewaschene Laccase und aus dem Zellextrakt von *H. acidophila* bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.7 dargestellt. Die Substrate 1,6-Dihydroxynaphthalin, 1,8-Diaminonaphthalin, Ascorbinsäure und ABTS wurden von den Laccasen aus Zellextrakt und Kulturüberstand aus *H. acidophila* gut umgesetzt. Es ergab sich für die untersuchten Substrate das gleiche Substratspektrum für die Laccasen aus *H. acidophila* Kulturüberstand und Zellextrakt. Die zellassozierte Laccase setzte ABTS und DAN um. Da von dieser Probe nicht ausreichend Material vorhanden war, konnten die anderen Substrate nicht untersucht werden.

**Tab.3.7: Substratspektrum der Laccasen aus dem Kulturüberstand, der Laccasen aus dem Zellextrakt bzw. für die zellassozierte Laccase (Waschrückstand) von *H. acidophila*.** Die Versuche wurden mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode bei pH 4,5 durchgeführt und der Substratumsatz indirekt über den Sauerstoffverbrauch der Reaktion bestimmt. ++ = hoher Substratumsatz + = Substratumsatz, - = kein Substratumsatz; n.b. nicht bestimmbar, da zu geringe Konzentrationen der Laccase vorlagen.

<b>Substrat</b>	<b>Laccasen aus dem Kulturüberstand</b>	<b>Laccasen aus dem Zellextrakt</b>	<b>Zellassozierte Laccase</b>
ABTS	++	++	+
DAN	++	++	+
DHN	++	++	n.b.
Ascorbinsäure	++	++	n.b.
DMOP	+	+	n.b.
Guajacol	+	+	n.b.
Syringaldazin	-	-	n.b.
L-Dopa	-	-	n.b.
Tyrosin	-	-	n.b.

### 3.5.3 Enzymstabilität

Um eine ausreichende Qualität der Proben auch nach Lagerung zu gewährleisten, wurden die Laccaseaktivitäten der aufbewahrten Proben regelmäßig überprüft und erwiesen sich als verhältnismäßig stabil. Wie in Tabelle 3.8 dargestellt, konnte konzentrierter Kulturüberstand für einen Tag bei Raumtemperatur, für eine Woche bei 4 °C oder für über ein Jahr bei -20 °C ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Bei Lagerung im Kühlschrank bei 4 °C war nach 2 Wochen noch mehr als 90 % der Laccaseaktivität erhalten. Die Proben wurden deshalb in der Regel aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**Tab. 3.8. Verbliebene Laccaseaktivitäten der Laccasen aus dem Kulturüberstand nach verschiedenen Lagerungszeiten unter den angegebenen Lagerungsbedingungen.** Die Laccaseaktivitäten wurden mit ABTS als Substrat bestimmt. Die Laccaseaktivität zu Beginn des Versuches wurden als 100 % definiert. Bei im Gefrierschrank bei -20 °C gelagerte Proben war auch nach über einem Jahr Lagerung die volle Aktivität erhalten.

	<b>1 Tag</b>	<b>2 Tage</b>	<b>5 Tage</b>	<b>10 Tage</b>	<b>15 Tage</b>
<b>Lagerung bei Raumtemperatur</b>	100 %	80 %	57 %	25 %	-
<b>Lagerung bei 4 °C</b>	100 %	100 %	100 %	95 %	93 %
<b>Lagerung bei -20°C</b>	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %

Alternativ erfolgte eine Lyophilisation von Zellen und Kulturüberständen. Diese wurden anschließend bei -20 °C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurden auch hier die Aktivitäten überprüft, um die Lagerfähigkeit zu untersuchen. Im Gegensatz zum konzentriertem aliquotierten Kulturüberstand (Tab. 3.8), zeigte Lyophilisat des Kulturüberstandes normal angezogener Kulturen schon nach 10 Wochen einen ca. 50%igen Aktivitätsverlust. Das Lyophilisat von Kulturen, die mit der einem Aminosäure-/Vitaminmix angezogen worden waren (s. 2.2.2) und in denen kein schwarzes Pigment vorhanden war, zeigte schon nach 2 Wochen keine Aktivität mehr. Die mit den lyophilisierten Zellen assoziierte Laccaseaktivität war nach 6 Wochen nicht mehr nachweisbar. Interessanterweise galt dies nur für die Laccasaktivität, die mit den ganzen Zellen im ABTS-Test bestimmt wurde. Erfolgte ein Zellaufschluss, so wurde in den Zellextrakten eine genauso hohe Laccaseaktivität detektiert wie zu Beginn der Lagerung der lyophilisierten Zellen. Die Gefriertrocknung war demzufolge weniger gut geeignet als die Lagerung im Gefrierschrank. Nur *H. acidophila* Zellen wurden weiterhin lyophilisiert und für den Zellaufschluss verwendet.

### **3.5.3.1 Inhibition der Laccasen**

In einigen der verwendeten Puffer war SDS oder EDTA enthalten (u.a. bei SDS-PAGE oder im Zellaufschlusspuffer). Um den Einfluss dieser Substanzen auf die Stabilität der Laccasen einschätzen zu können, wurden Versuche zur Inhibition durch 2 mM SDS und EDTA durchgeführt. Dazu wurden Zellextrakt bzw. konzentrierter Kulturüberstand für 90 Minuten mit den potenziellen Inhibitoren behandelt. Eine parallel behandelte Wasserkontrolle wurde als Referenz zur Errechnung des Aktivitätsverlustes herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 dargestellt. Der Versuch konnte aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Materials nicht mit zellasoziiierter Laccase, sondern nur mit Kulturüberstand und Zellextrakt durchgeführt werden. Die Laccaseaktivität aus dem Kulturüberstand zeigte eine 82%ige

Inhibition durch EDTA und eine 45%ige Inhibition durch SDS. Die Laccaseaktivität aus dem Zellextrakt wurde durch Zusatz von EDTA um 17 % und durch SDS um 64 % gehemmt.

**Tab. 3.9: Inhibition der Laccaseaktivitäten durch Zusatz verschiedener potenzieller Inhibitoren.** Zu konzentriertem Kulturüberstand und zu Zellextrakt wurde EDTA bzw. SDS (je 2 mM) gegeben und für 90 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben vollständig in einen Laccasetest eingesetzt und die verbliebenen Laccaseaktivitäten mit ABTS als Substrat bestimmt. Eine parallel behandelte Wasserkontrolle wurde als 100%-Wert verwendet. Dargestellt ist die Inhibitionswirkung von EDTA und SDS auf die einzelnen Laccasen. Die Werte bezeichnen den Verlust der Laccaseaktivität.

	Laccasen aus dem Zellextrakt	Laccasen aus dem Kulturüberstand
2mM EDTA	17 %	82 %
2mM SDS	64 %	45 %

### 3.5.3.2 Temperaturstabilität

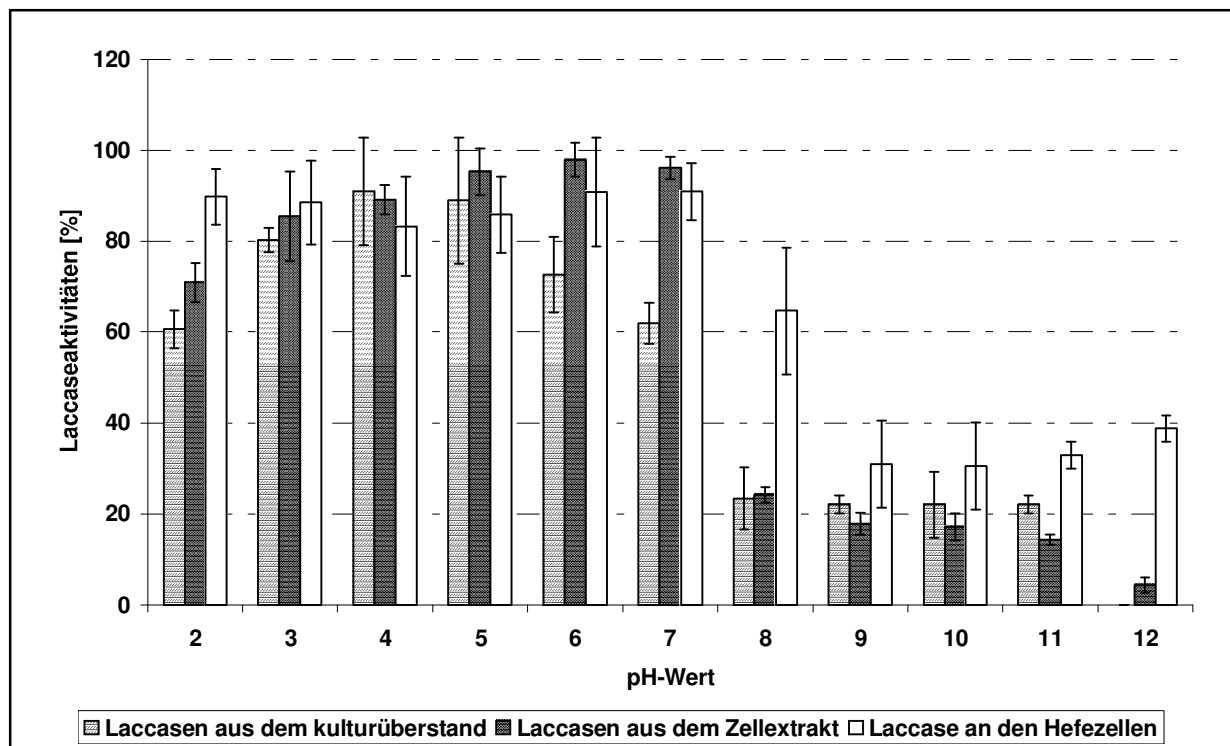
Um die Stabilität der Laccasen bei verschiedenen Temperaturen zu bestimmen, wurden Proben aus Kulturüberstand bzw. Zellextrakt, bei verschiedenen Temperaturen nach Zeit gestaffelt inkubiert. Bei 45 °C war die Laccaseaktivität in konzentriertem Kulturüberstand auch noch nach 120 Minuten so hoch wie in der auf Eis gelagerten Kontrolle. Die Kontrolle zeigte im Vergleich zum Versuchsbeginn keinen Aktivitätsverlust. Die Halblebenszeiten der Laccasen aus dem Kulturüberstand waren etwa 60 Minuten bei 50 °C, 30 Minuten bei 60 °C und 1 Minute bei 70 °C. Die Restaktivitäten der Laccasen aus dem Zellextrakt lagen zu diesen Zeitpunkten bei 87 % (50 °C, 60 Minuten), 76 % (60 °C, 30 Minuten) und 71 % (70 °C, 1 Minute) (Tab. 3.10). Die Versuche wurden jeweils mit Kulturüberstand und mit Zellextrakt durchgeführt. Von der zellassozierten Laccase war nicht ausreichend Material vorhanden, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die Laccasen aus dem Kulturüberstand von *H. acidophila* zeigten ein Temperaturoptimum zwischen 40 und 45 °C.

**Tab. 3.10 Restaktivität in % nach Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. A: Laccaseaktivität im Zellextrakt, B: Laccaseaktivität im Kulturüberstand.** Konzentrierter Kulturüberstand bzw. Zellextrakt wurden für die angegebenen Zeiten bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt und bei Raumtemperatur einem ABTS-Test unterzogen. Als Referenz wurde eine Probe mit hitzeinaktivierter Probe verwendet. Die Aktivität einer auf Eis gelagerten Kontrolle wurde als 100%-Wert definiert.

[%]	50°C		60°C		70°C		80°C	
	A	B	A	B	A	B	A	B
10 Sekunden	100	100	100	100	94	100	8	20
1 Minute	95	100	94	96	71	54	0	0
30 Minuten	95	67	76	51	0	0	0	0
60 Minuten	87	54	61	32	0	0	0	0

### 3.5.3.3 pH-Stabilität

Die Versuche zur Stabilität der Laccasen bei verschiedenen pH-Werten wurden über den pH-Bereich von 2-12 durchgeführt. Kulturüberstand, Zellextrakt bzw. ganze Zellen wurden dazu mit dem Puffer des entsprechenden pH-Wertes versetzt und für 5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Als Puffer wurde ein Puffergemisch nach Britton & Robinson verwendet (s. 2.3), das über den gesamten pH-Bereich Pufferwirkung besitzt. Vor Messung wurden die Proben aus Kulturüberstand und Zellextrakt umgepuffert bzw. die Zellen abzentrifugiert und in Puffer gewaschen. Danach wurden alle Proben beim gleichen pH-Wert (pH 2,6) einem ABTS-Test unter Standardbedingungen unterzogen. Die verbliebenen Laccaseaktivitäten nach fünfstündiger Inkubation bei dem entsprechenden pH-Wert sind in Abb. 3.13 dargestellt.



**Abb. 3.13: pH-Stabilität der Laccasen im Kulturüberstand, im Zellextrakt und der zellassozierten Laccasen.** Dargestellt sind die verbliebenen Laccaseaktivitäten (in % vom Ausgangswert) nach fünfstündiger Inkubation bei dem entsprechenden pH-Wert. Die Laccaseproben wurden nach der Inkubation umgepuffert und unter Standardbedingungen mit ABTS als Substrat bei pH 2,6 gemessen. Die Zellen wurden nach der Inkubation abzentrifugiert, mit McIlvaine Puffer pH 2,6 gewaschen und danach in den ABTS-Test eingesetzt. Durch Umpuffern bzw. Waschen der Zellen kam es zu einem geringfügigen Aktivitätsverlust.

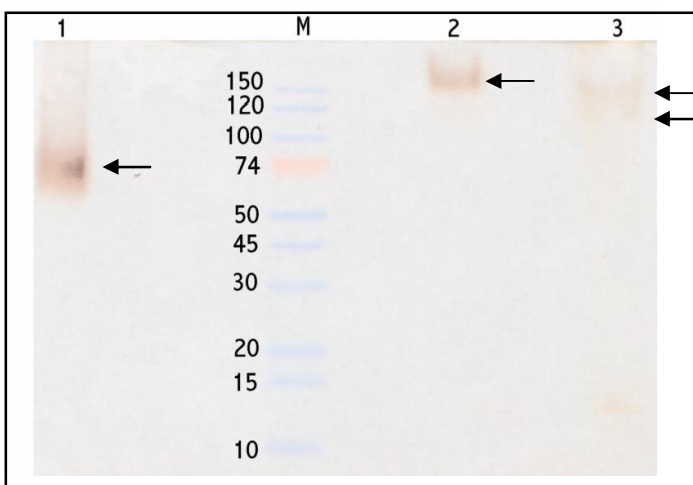
Alle Laccasen waren über einen weiten Bereich im Sauren (pH 2-7) stabil. Oberhalb von pH 7 waren nach der Inkubation nur noch deutlich reduzierte Laccaseaktivitäten messbar. Die Laccaseaktivität aus dem Kulturüberstand war am stabilsten bei pH 4-5. Bei den Laccasen aus dem Zellextrakt lag dieses Optimum bei pH 6. Bei der zellassozierten Laccase kann aufgrund

der hohen Standardabweichungen kein genaues Optimum angegeben werden. Die maximal gemessenen Laccaseaktivitäten nach der Inkubation lagen bei 853 mU/ml für den Zellaufschluss, bei 108 mU/ml für die Laccaseaktivität aus dem Kulturüberstand und 49mU/ml für die zellassozierte Laccase. Es waren Proben mit Aktivitäten von 873 mU/ml, 119 mU/ml bzw. 54 mU/ml eingesetzt worden. Durch Umpuffern und Waschen der Zellen kam es also zu einem Verlust von ca. 2-9 %.

### 3.5.4 Molekulargewichte

Um die Molekulargewichte der Laccasen zu bestimmen, wurden mehrere Strategien verfolgt. Es wurden (1) Aktivitätstests nach einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE durchgeführt und (2) die Laccasen nach Blotten der Proteine auf Nitrocellulose immunhistologisch nachgewiesen.

Laccasen erhalten ihre Aktivität nicht nur bei der Auftrennung in einer nativen Elektrophorese, sondern es kann auch eine SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden, der ein Aktivitätstest angeschlossen wird. Dazu wird auf den Zusatz von DTT und Mercaptoethanol im Probenpuffer verzichtet. Prinzipiell kann der Aktivitätstest mit jedem Laccasesubstrat durchgeführt werden. Die Substrate, die bei Oxidation auspolymerisieren (DHN, DAN) erwiesen sich für die Laccasen aus *H. acidophila* als am besten geeignet. Als Positivkontrolle wurde jeweils eine kommerziell erhältliche Laccase von *Coriolus versicolor* verwendet.



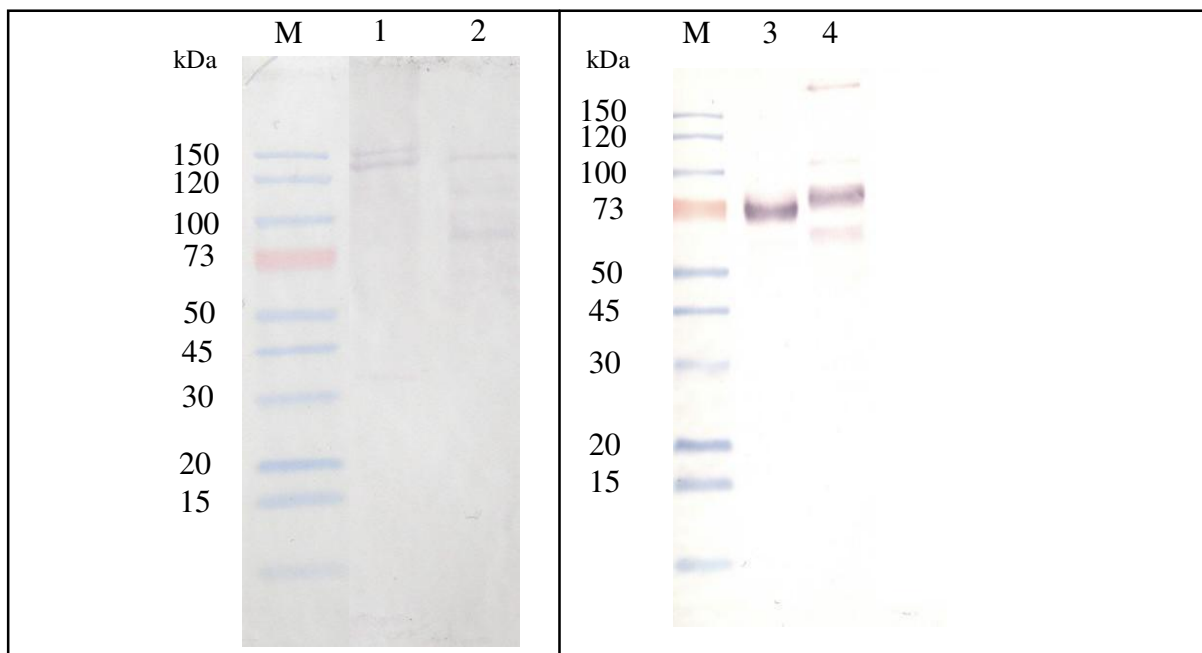
**Abb. 3.14: Aktivitätsfärbung der Laccasen aus Zellextrakt und Kulturüberstand nach der SDS-PAGE mit DHN als Substrat (pH 2).** Die nicht gefällten Proben wurden in nicht reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. 1 = Laccase aus *Coriolus versicolor* (Positivkontrolle), M = Marker, 2 = *H. acidophila* Zellextrakt, 3 = *H. acidophila* Kulturüberstand. Die im Aktivitätstest angefärbten Banden wurden durch Pfeile hervorgehoben.

Wie in Abb. 3.14 zu sehen ist, konnten sowohl im Kulturüberstand als auch im Zellextrakt Banden mit aktivem Enzym angefärbt werden. Diese (einschließlich der Positivkontrolle) waren jedoch nicht sehr distinkt, wodurch eine exakte Bestimmung der Molekulargewichte schwierig war. Die gefärbten Laccase-Banden im Kulturüberstand lagen bei etwa 140 und 110kDa und im Zellextrakt bei etwa 170 kDa. Auch bei ca. 14 kDa sah man im SDS-Gel eine gefärbte Bande (Kulturüberstand), wobei es sich aber wahrscheinlich um ein durch Melanin verursachtes Artefakt handelte. Um anfärbbare Banden zu erhalten, mussten die eingesetzten Laccaseaktivitäten für die Kontrolllaccase aus *Coriolus versicolor* mindestens 60 mU/ml im Standardtest mit ABTS als Substrat betragen. Die Laccaseproben aus *H. acidophila* wurden mit ca. 200 mU/ml (ABTS) eingesetzt, da niedrigere Aktivitäten nicht zu einer Aktivitätsfärbung führten. Von der zellassoziierten Laccase standen keine Proben mit ausreichender Aktivität zur Verfügung, so dass der Test für dieses Enzym nicht durchgeführt werden konnte.

Um signifikantere und distinktere Ergebnisse zu erhalten, wurden verschiedene Versuche zur Optimierung des Aktivitätstests im Gel durchgeführt. Zunächst wurde nach der SDS-PAGE ein Renaturierungsschritt eingeführt, da es sowohl bei den Laccasen aus dem Kulturüberstand als auch bei den Laccasen aus dem Zellextrakt zu einer Hemmung der Laccaseaktivität durch SDS gekommen war (s. 3.5.3.1). Hierbei wurden die SDS-Gele in Triton-X-Lösung gewaschen, um möglicherweise noch an die Enzyme gebundenes SDS zu entfernen. Durch diesen Schritt konnte jedoch keine schnellere, distinktere oder stärkere Färbung der Banden mit aktivem Enzym erreicht werden. Eine Herabsetzung des Test-pH-Wertes von pH 5 auf pH 2 resultierte jedoch in eine deutlichere Färbung. Die folgenden Tests wurden folglich bei pH 2 durchgeführt.

Um weitere Informationen über die Molekulargewichte der von *H. acidophila* synthetisierten Laccasen zu erhalten, wurden gegen Laccasen aus anderen Pilzen abgeleitete Antikörper genutzt, um eine Immunhybridisierung durchzuführen. Dazu wurden neben den für die Aktivitätstests verwendeten nativen auch gefällte Proteine verwendet. Durch die Fällung konnten in diesen Versuch höhere Protein- und Laccasekonzentrationen eingesetzt werden. Die Proteine aus Zellextrakt bzw. Kulturüberstand wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und danach auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dann erfolgte der immunhistologische Nachweis mit polyklonalen Primärantikörpern aus Kaninchen, die gegen die Laccasen aus dem Basidiomyceten *Ceriporiopsis subvermispora* (Ruel *et al.*, 1998) bzw.

dem Ascomyceten *Melanocarpus albomyces* (Kiiskinen *et al.*, 2004) abgeleitet worden waren. Als Negativkontrolle wurde ein Zellaufschluss von *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, der analog zum Aufschluss von *H. acidophila* durchgeführt wurde. In *S. cerevisiae* wurde bislang keine Laccase beschrieben, so dass hier keine gefärbten Banden zu erwarten waren. Beide Negativkontrollen zeigten keine Bande mit einem der Antikörper. Da bei der Färbung mit dem aus *M. albomyces* gewonnenen Antikörper häufig viel Hintergrund und unspezifische Banden angefärbt wurden, wurde in der Regel der Antikörper aus *C. subvermispota* verwendet.



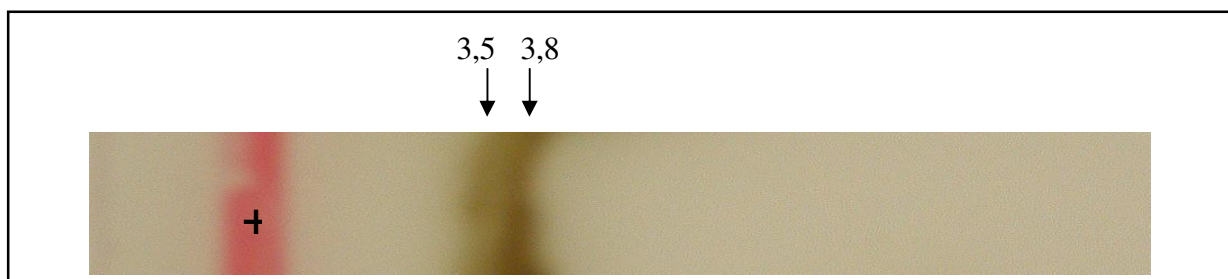
**Abb. 3.15: Immunhistologischer Nachweis der Laccasen aus *H. acidophila* Zellextrakt bzw. konzentriertem Kulturüberstand nach Auftragen der ungefällten, nicht reduzierten Proben im Vergleich zu gefällten Proben unter reduzierenden Bedingungen.** Die nicht reduzierten Proben wurden wie bei der Durchführung der Aktivitätstests nach der SDS-PAGE mit Probenpuffer versetzt, der keine reduzierenden Agenzien enthielt. Die Proben wurden weder gekocht noch einer Fällung unterzogen. Die reduzierten Proben wurden einer Methanol-Chloroform-Fällung unterzogen, in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C solubilisiert. Es wurde eine SDS-PAGE mit einem 10%igen SDS-Gel durchgeführt und die Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Es folgte die Immunhybridisierung mit Primärantikörper (*C. subvermispota*) und Sekundärantikörper und die anschließende Visualisierung mittels BCIP/NBT-Färbung. Die Färbung ließ sich bei den gering konzentrierteren nicht reduzierten Proben über Scanner nicht dokumentieren, weshalb dieser Blot mit Digitalkamera aufgenommen wurde. M=Marker; 1 = Kulturüberstand unter nicht reduzierenden Bedingungen; 2 = Zellextrakt unter nicht reduzierenden Bedingungen; 3 = Kulturüberstand nach Fällung unter reduzierenden Bedingungen; 4 = Zellextrakt nach Fällung unter reduzierenden Bedingungen

Ob die Proben unter reduzierenden oder nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen wurde, machte einen großen Unterschied (Abb. 3.15). Bei nicht reduzierender Auftragung ergaben sich jeweils große Proteinbanden wie auch im Aktivitätstest im SDS-Gel. Im konzentrierten Kulturüberstand waren zwei Banden bei 130 und bei 140 kDa zu erkennen. Wurde die gleiche Probe gefällt und einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen unterzogen, wurde

danach nur noch eine Bande bei ca. 70 kDa angefärbt. Im Zellextrakt konnte eine solche Aussage aufgrund des Vorliegens einer Vielzahl von Banden nicht getroffen werden.

### 3.5.5 Isoelektrische Punkte, Isoenzyme

Die Isoelektrischen Punkte (pIs) der Laccasen aus dem Kulturüberstand wurden mittels IEF-Gele mit einem pH-Gradienten von 3-10 bestimmt. Nach der Endpunktfokussierung wurden die Gele einer Aktivitätsfärbung mit 1,8-DAN unterzogen und die pIs anhand des Standards ermittelt. Im Kulturüberstand zeigten sich im Laccase-Aktivitätstest zwei Banden bei pI 3,5 und 3,8 (Abb. 3.16). Mit Zellextrakt wurde mit dieser Methode keine Bande mit aktivem Enzym angefärbt.

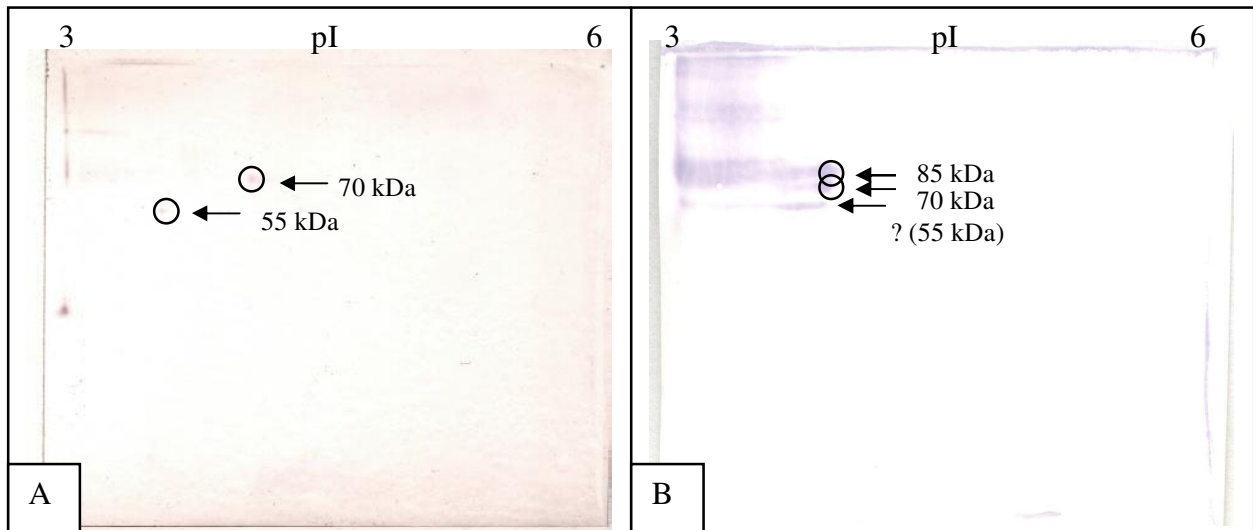


**Abb.3.16 Isoelektrische Punkte der Laccasen aus dem *H. acidophila* Kulturüberstand.** Die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde mittels horizontaler IEF-Gele mit einem Spektrum von pH 3-10 bei 4 °C durchgeführt. Es folgte ein Aktivitätstest mit DAN als Substrat, um die Laccasebanden sichtbar zu machen und die isoelektrischen Punkte zu bestimmen.

Um weitere Informationen über den pI und das Molekulargewicht der Laccasen aus dem Zellextrakt zu erhalten, wurde eine Zweidimensionale Gelelektrophorese durchgeführt und die Laccasebanden mittels Immunhybridisierung und folgender Färbereaktion auf einem Western-Blot sichtbar gemacht (Abb. 3.17). Aufgrund der Ergebnisse aus dem Versuch zur Isoelektrischen Fokussierung wurde ein niedriger pI erwartet und deshalb für die zweidimensionale Gelelektrophorese ein pH-Gradient von pH 3-6 gewählt. Dadurch sollte eine deutlichere Auftrennung der Banden/ Punkte erreicht werden. Nach Hybridisierung mit dem Antikörper aus *C. subvermispora* ergaben sich beim Zellextrakt 2 distinkte Punkte (Abb. 3.17) bei 70 und bei 85 kDa. Der pI lag jeweils bei 3,8. Bei der Probe aus dem Kulturüberstand wurden auch zwei distinkte Punkte angefärbt: bei 70 kDa und bei 55 kDa. Weiterhin ergab sich bei der Auftragung der Proben aus dem Zellextrakt ein möglicherweise unspezifischer Hintergrund. Das Vorhandensein einer weiteren Laccase bei 55 kDa kann nicht ausgeschlossen werden, obwohl sich diese Bande sehr wenig distinkt zeigt (Abb. 3.17). Der pI der 70 kDa großen Laccase lag bei 3,8, der pI der 55 kDa großen Bande bei 3,5. Die Ergebnisse mit dem Antikörper aus *M. albomyces* waren vergleichbar, die Anfärbung aber



weniger deutlich. Nach der Zweidimensionalen Elektrophorese war ein Aktivitätstest im SDS-Gel nicht möglich, da die Enzymaktivität durch die Hitzeentwicklung während der Isoelektrischen Fokussierung verloren gegangen war.



**Abb. 3.17:** Isoelektrische Punkte und Molekulargewichte der Laccasen aus dem *H. acidophila* Kulturüberstand (A) und dem Zellextrakt (B) nach Zweidimensionaler Gelelektrophorese. Je 200 µg Protein aus Kulturüberstand bzw. Zellextrakt wurden einer Methanol-Chloroform-Fällung und einer IEF mit anschließender SDS-PAGE (10 %) unterzogen. Darauf folgte ein immunhistologischer Nachweis der Laccasen auf dem Western-Blot mit dem Antikörper, der von der Laccase aus *C. subvermispora* abgeleitet war. Im Kulturüberstand ergaben sich distinkte Punkte bei 70 kDa (pI ca. 3,8) und bei 55 kDa (pI 3,5) und im Zellextrakt bei 85 kDa (pI 3,8) und 70 kDa (pI 3,8). Im Zellextrakt trat darüber hinaus etwas unspezifischer Hintergrund auf. Eine weniger distinkte Bande könnte sich bei 55 kDa befinden.

### 3.5.6 Glykosylierung

Extrazelluläre Enzyme sind häufig glykosyliert. Ausgehend von den vorangegangenen Versuchen konnte davon ausgegangen werden, dass *H. acidophila* mindestens zwei, möglicherweise drei extrazelluläre Laccasen bildet. Um den Zuckergehalt der Laccasen aus dem *H. acidophila* Kulturüberstand zu bestimmen, wurden verschiedene Versuche zur Deglykosylierung durchgeführt. Zunächst wurden die Laccasen einer chemischen Deglykosylierung unterzogen. Bei keinem der Versuche zur chemischen Deglykosylierung konnte ausreichend Protein wieder gewonnen werden, so dass man die Banden im SDS-Gel sichtbar machen konnte. Deshalb wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine enzymatische Deglykosylierung mit Endoglykosidase H durchgeführt. Hier erfolgt im Gegensatz zu den chemischen Deglykosylierungsmethoden ausschließlich eine Abspaltung der N-gebundenen Zuckerketten. Die Proben vor und nach dieser Behandlung wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und

einer Immunhybridisierung mit den laccasespezifischen Antikörpern unterzogen, um den Unterschied im Molekulargewicht zu dokumentieren. Es ergaben sich jeweils schwache nicht darstellbare Banden. Bei den Proben aus dem Kulturüberstand fand sich nach Endoglykosidase H-Behandlung eine Bande bei ca. 65 kDa. Zuvor war in konzentriertem Kulturüberstand eine Bande bei 70 kDa zu sehen. Dies würde einem Glykosylierungsgrad von etwa 7 % entsprechen. Im Zellextrakt lagen vor Deglykosylierung mehrere Laccasebanden vor. Nach Behandlung der Zellextraktproteine mit Endoglykosidase H kam es nach Immunhybridisierung mit laccasespezifischem Antikörper zu einer schwachen Anfärbung zweier Banden bei 85 und bei 50 kDa.

### **3.5.7 Benennung der Laccasen aus den verschiedenen Extrakten von *H. acidophila* und Zusammenfassung der Charakteristika**

In *H. acidophila* konnten mindestens drei Laccasen nachgewiesen werden. In Tab. 3.11 ist eine Übersicht über die Benennung der Laccasen, die im Folgenden verwendet wird, dargestellt. Da Laccasen in der Regel zwischen 60 und 85 kDa groß sind und oft als Dimere vorliegen, war auch hier das Vorliegen von Dimeren wahrscheinlich. Aus den Versuchen mit laccasespezifischen Antikörpern ergaben sich bei nicht reduzierender Auftragung unter anderem die großen Banden, die auch im Aktivitätstest nachgewiesen worden waren. Nach Fällung und unter reduzierenden Bedingungen wurden dann Laccasebanden angefärbt, die jeweils nur halb so groß waren wie die zuvor nachgewiesenen und die aktiven Banden. Diese Ergebnisse bestätigen den Hinweis auf das Vorliegen von Laccasedimeren.

Aktive Laccasebanden konnten im Kulturüberstand bei 140 und bei 110 kDa nachgewiesen werden. Im Zellextrakt wurde eine Aktivitätsbande bei 170 kDa nachgewiesen. Die Probe der von den lyophilisierten Zellen abgewaschenen Laccase enthielt zwei dominierende Banden bei 55 und bei 110 kDa. Eine dieser Banden ist mit Wahrscheinlichkeit die aktive Laccase, durch die die Aktivität der Probe hervorgerufen wurde. Möglicherweise handelt es sich bei der Bande bei 55 kDa um ein Monomer, während die Bande bei 110 kDa ein Dimer der Laccase darstellt.

Mit großer Wahrscheinlichkeit sind einige der nachgewiesenen Laccasen identisch (Tab. 3.11). Im Zellextrakt liegen wahrscheinlich alle von *H. acidophila* gebildeten Laccasen vor. Aktiv scheint aber nur die Laccase bei 170 kDa zu sein, da sie als einzige Bande im Aktivitätstest nachgewiesen wurde. Eine Bande bei 55 bzw. 110 kDa findet sich weiterhin in

allen Extrakten. Wahrscheinlich handelt es sich jeweils um die zellassozierte Laccase (Abb. 3.3). Die Laccase aus dem Kulturüberstand, die eine Aktivitätsfärbung bei 140 kDa im SDS-Gel erzeugt hatte, ist wahrscheinlich ein Dimer der 70 kDa großen Laccase, die sich nach Fällung und Reduktion ergab. Möglicherweise gibt es außerdem noch eine 130 kDa große Laccase, da eine entsprechende Bande in einigen Versuchen (Immunhybridisierung) nachgewiesen werden konnte.

**Tab. 3.11: Molekulargewichte [kDa] der verschiedenen Laccasebanden in *H. acidophila* und deren potenzielle Verknüpfung untereinander;** die Laccasen, die möglicherweise identisch sind bzw. zum gleichen Komplex gehören, wurden farblich einheitlich markiert. Alle Laccasen sind im Zellextrakt vorhanden, da sie dort gebildet werden. Die zellassozierte Laccase ist auch im Kulturüberstand zu finden, da sie extrazellulär ist und von den Zellen abgewaschen werden kann. Aufgrund zu geringer Aktivität war mit dieser von den Zellen abgewaschenen L (55) keine Aktivitätsfärbung in der SDS-PAGE durchführbar. Die beide Banden (55 und 110 kDa) enthaltene Probe zeigte jedoch eine signifikante Laccaseaktivität.

	Kulturüberstand	Zellextrakt	Zellassoziert	Benennung
<b>Aktive Laccasen</b>	140 110	170	110 und/oder 55	L (85) L (70) L (55)
<b>Potenzielle Dimere</b>	140 130 110	170 140 130 110	110	L (85) L (70) L (65) L (55)
<b>Potenzielle Monomere</b>	70 55	85 70 55	55	L (85) L (70) L (55)

In einem weiteren Schritt wurde der Versuch unternommen, die gemessenen Laccase-Charakteristika den einzelnen Laccasen zuzuordnen. Aufgrund der im Aktivitätstest in der SDS-PAGE ermittelten Ergebnisse (Abb. 3.12) ist es wahrscheinlich, dass L (85) die dominierende und möglicherweise einzige aktive Laccase im Zellextrakt ist. Deshalb wurden die mit dem Zellextrakt ermittelten Eigenschaften zunächst L (85) zugeordnet. Ob diese Eigenschaften tatsächlich mit denen von L (85) übereinstimmen, könnte jedoch nur durch Tests mit dem aufgereinigten Enzym festgestellt werden, was aufgrund fehlenden Enzymmaterials innerhalb dieser Arbeit jedoch nicht möglich war. Abgeleitet von der genannten These handelt es sich bei L (85) wahrscheinlich um eine intrazelluläre Laccase, die ein extrem niedriges pH-Optimum (1,5 mit DMOP als Substrat) aufweist. Das Enzym liegt wahrscheinlich nicht glykosyliert vor und ist etwas temperaturempfindlicher als die sezernierten Laccasen. Ansonsten unterscheidet sich L (85) kaum von den zellassozierten Laccasen bzw. den Laccasen aus dem Kulturüberstand. Da im Kulturüberstand mehrere aktive Banden im Aktivitätstest angefärbt wurden, ist hier eine eindeutige Zuordnung nicht möglich. Bei der Messung der Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand kam es also zur Überlagerung der

Enzymaktivitäten von L (70) und L (55), so dass hier keine eindeutige Zuordnung der Eigenschaften erfolgen kann. Leider konnten die Versuche nicht mit der von den Zellen abgewaschenen Laccase L (55) wiederholt werden, da hier zu wenig Material zur Verfügung stand. Da jedoch nicht mehrere pH-Optima auftauchen, ist anzunehmen, dass sich L (70) und L (55) entweder sehr ähnlich verhalten, oder dass eine der Enzymaktivitäten, möglicherweise L (70), dominiert.

Der Glykosylierungsgrad der Laccasen aus dem Zellextrakt ist nicht eindeutig zuzuordnen, da hier mehrere Laccasebanden nachgewiesen wurden. Die Bande bei 85 kDa (vor und nach Deglykosylierung) deutet allerdings auf die 85 / 170 kDa große Laccase hin, die dann nicht deglykosyliert wurde bzw. keine Glykosylierung aufweist. Die weiterhin bei 50 kDa nachgewiesene Laccase ist wahrscheinlich L (55) zuzuordnen.

**Tab. 3.12: Zusammenfassung der ermittelten Eigenschaften und abgeleitete Zuordnung zu den einzelnen Laccasen.** Da L (85) nach Aktivitätstest im Gel die einzige aktive Laccase im Zellextrakt ist, wurden die Eigenschaften, die mit Zellextrakt ermittelt wurden, L (85) zugeordnet. Die Eigenschaften, die mit Kulturüberstand ermittelt wurden, konnten nicht weiter aufgeschlüsselt werden, da sich im Aktivitätstest in diesen Proben sowohl L (70) als auch L (55) aktiv gezeigt hatten. In diesen Tests kam es also zur Überlagerung mehrerer Laccaseaktivitäten. L A (55) bezeichnet die zellassoziierte Laccase.

	L (85)	L (70)	L (55)	L A (55)
<b>pH-Optimum</b> (DMOP)	pH 1,5-2	pH 6,5		n.b.
<b>pH-Optimum</b> (ABTS)	pH 2	pH 2		n.b.
<b>pH-Optimum</b> (Guajacol)	pH 4	pH 3,5-4		n.b.
<b>pI</b>	3,8	3,8	3,5	n.b.
<b>Genutzte Substrate</b>	ABTS, DAN, DHN, Ascorbinsäure, DMOP, Guajacol	ABTS, DAN, DHN, Ascorbinsäure, DMOP, Guajacol		ABTS, DAN
<b>Nicht genutzte Substrate</b>	Syringaldazin, L-Dopa, Tyrosin	Syringaldazin, L-Dopa, Tyrosin		n.b.
<b>pH-Stabilität</b> (> 80 %)	pH 3-7	pH 3-5		pH 2-7
<b>Temperaturstabilität</b> (> 60 %)	maximal 30 min bei 50 °C	maximal 60 min bei 60 °C		n.b.
<b>Glykosylierung</b>	0 %	7 %	9 %	n.b.

### **3.6 Aufreinigung der Laccasen**

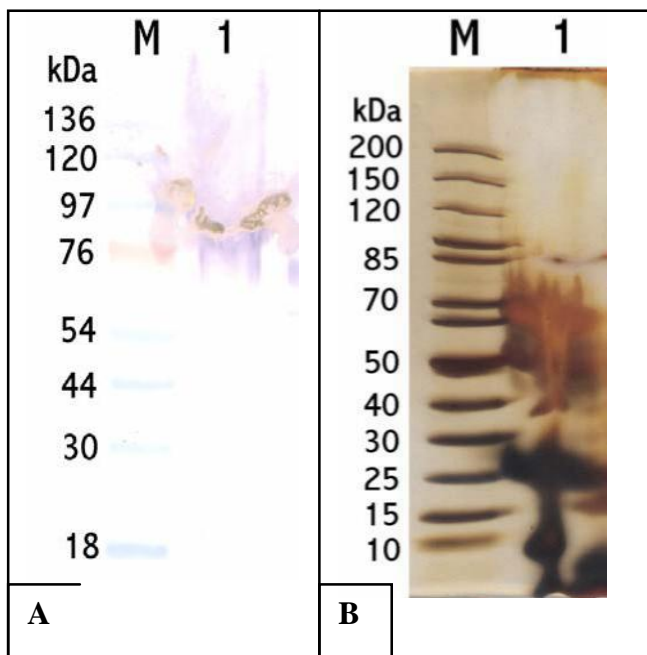
Für die Aufreinigung der Laccasen mussten die Enzyme zunächst von den Zellen isoliert werden bzw. es musste ausreichend Material an Laccasen aus dem Kulturüberstand gewonnen werden (s.3.3). Ein weiteres wichtiges Ziel war die Abtrennung der störenden Melaninfraction. Danach wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden auf ihre Eignung getestet und optimiert. Primäres Ziel war es, zumindest eine der Laccasen so weit aufzureinigen, dass eine N-terminale Sequenzierung möglich wurde.

#### **3.6.1 Abtrennung der Melaninfraction**

Das Melanin, das in *H. acidophila* Kulturen während des Wachstums im Medium nachgewiesen wurde (Abb. Biomasse und melaningehalt), sollte aus der Probe entfernt werden, da dieses Pigment mit verschiedenen Methoden (SDS-PAGE, Optische Dichte, Proteingehalt) interferierte. Auch die Reinigung über Ionenaustauschersäulen konnte möglicherweise durch Melanin gestört werden, da es sich bei Melanin um einen natürlichen Kationenaustauscher handelt. Mittels Gelfiltration konnte jedoch ein Großteil des Melanins aus den Proben entfernt werden. Neben den Versuchen, das bereits gebildete Melanin von der laccasehaltigen Fraktion abzutrennen, wurde außerdem eine Anzuchtmethode unter Zusatz von Ascorbinsäure weiterentwickelt, bei der während des Hefewachstums kein Melanin gebildet wurde.

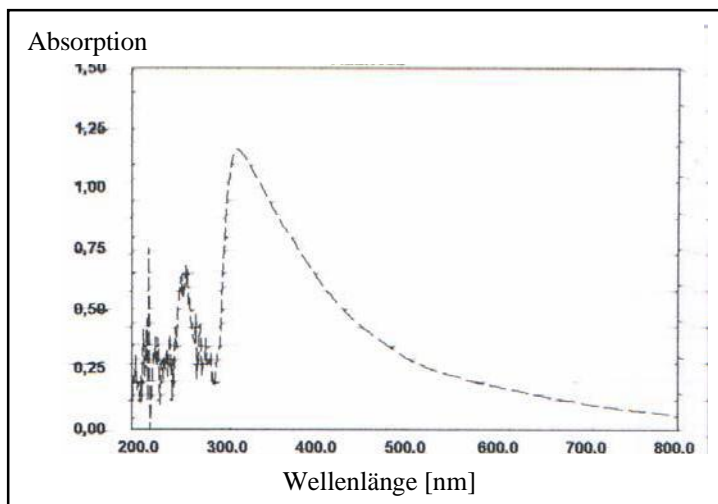
##### **3.6.1.1 Störfaktor Melanin**

Melanin führte, wie gesagt, bei verschiedenen der verwendeten Methoden zu Fehlern. In der SDS-PAGE und bei Western-Blots kam es zur Überlagerung der Proteinbanden durch eine indifferente Melaninschicht, so dass bei diesen Proben auch die Laufhöhe und das zugeordnete Molekulargewicht nicht verlässlich bestimmt werden konnten (Abb. 3.18). Bei Western-Blot und SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassiefärbung konnte das Problem durch intensives Waschen der Gele nach der Gelelektrophorese teilweise behoben werden. Bei SDS-Gelele, die mit Silbernitrat gefärbt wurden, kam es aber bei hohen Melaninkonzentrationen auch weiterhin zu Interaktionen (Abb. 3.18 B). Bei der Ionenaustauschchromatographie banden die Proteine teilweise nicht an die Säule, was möglicherweise auch auf den Melaningehalt der Probe zurückgeführt werden könnte.



**Abb.3.18:**Interaktionen des Melanins aus dem *H. acidophila*-Kulturüberstand auf einem Western-Blot (A) und in einem silbernitratgefärbten 10%igen SDS-Gel (B). Beim Western-Blot konnte die Melanin-Überlagerung der Proteinbanden durch Waschen des SDS-Geles vor dem Blotten vermindert werden. M = Marker (Größenstandard), 1= konzentrierter Kulturüberstand.

Weiterhin war die Melaninkontamination der Proben vor allem bei der Anwendung spektrophotometrischer Methoden ein Problem. In Abb. 3.19 ist das Absorptionsspektrum eines Kulturüberstandes einer *H. acidophila* Kultur aus der stationären Phase dargestellt. Es wurde eine alte Kultur verwendet, da die Melaninkonzentration im Kulturüberstand in der stationären Phase am höchsten ist (Abb. Melanin und Biomasse). Es kam zu einer Absorption über einen weiten Wellenlängenbereich. Das Maximum lag zwar zwischen 300 und 350 nm, aber auch bei 600 nm war noch eine Absorption von etwa 0,2 messbar. Dass es also zu Verfälschungen bei Messung von  $OD_{600}$  und Proteingehalt (Bradford-Reagenz, 595 nm) kam, war nach diesen Ergebnissen höchst wahrscheinlich. Es wurden deshalb verschiedene Versuche unternommen, das Melanin aus den Proben abzutrennen.



**Abb. 3.19:** Absorptionsverhalten des *H. acidophila* Kulturüberstandes zwischen 200 und 800 nm. 1 ml zellfreier Kulturüberstand aus einer 35 Tage alten *H. acidophila*- Kultur (stationäre Phase) wurde im Spektrophotometer einer Absorptionsbestimmung unterzogen. Die Kultur wurde unter den üblichen Standardbedingungen bei 20 °C angezogen. Es war eine deutliche Melaninausscheidung ins Medium festzustellen. Bei 280 nm trat ein typisches Proteinmaximum auf, das durch die extrazellulären Proteine verursacht worden sein dürfte.

### 3.6.1.2 Saure Melaninfällung

Melanin ist im stark sauren Milieu nicht gut löslich. Deshalb wurde angenommen, dass eine Absenkung des pH-Wertes zu einer Ausfällung des Melanins führen könnte. *H. acidophila* – Kulturen alkalisierten das Medium während ihres Wachstums unter Standardbedingungen auf pH 6. Für die potenzielle Fällung des Melanins aus dem Kulturüberstand einer *H. acidophila* Kultur aus der stationären Wachstumsphase wurde der pH-Wert auf pH 3 herunter titriert. Nach Einstellen des pH-Wertes und nachfolgender Zentrifugation wurde ein dunkles Sediment sichtbar. Allerdings war der Kulturüberstand auch nach der Fällung immer noch stark gefärbt. Außerdem wurden die Überstände einem ABTS-Test unterzogen. Vor der Fällung lag die Aktivität bei 8,4 mU/ml, nachher bei 6,2 mU/ml. Durch die Fällung gingen also etwa 25 % der Aktivität verloren ohne dabei die Entfernung einer größeren Menge an Melanin zu erreichen.

### 3.6.1.3 Gelfiltrationschromatographie

Durch eine Gelfiltrationschromatographie von melaninhaltigen Kulturüberständen konnten zwischen 40 und 65 % des Melanins entfernt werden. (s. 3.6.2).

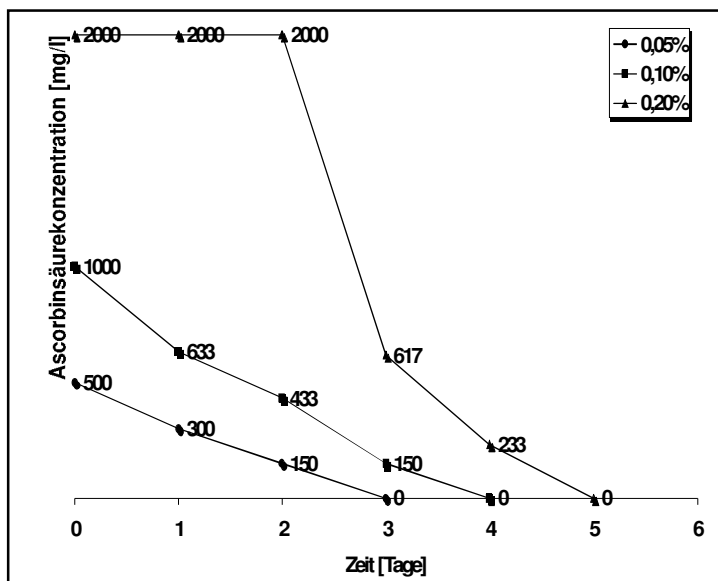
### 3.6.1.4 Anzucht unter Zusatz von Ascorbinsäure

Durch Zusatz von Ascorbinsäure zum üblichen Anzuchtmedium wurde die Melaninbildung in den *H. acidophila*-Kulturen unterbunden (Abb. 3.20). Die Kulturen erreichten aber nur sehr geringe Zelldichten und verfärbten sich nach wenigen Tagen schwarz.



**Abb. 3.20:** *H. acidophila* Kulturen nach Anzucht ohne Ascorbinsäure (links) und mit 0,2% Ascorbinsäure bei 0,04  $\mu$ M Kupfersulfat. Die Anzucht erfolgte unter Standardbedingungen für 3 Tage. Der Zusatz von Ascorbinsäure zum Medium verhinderte eine melaninbedingte Schwarzfärbung der Kulturen. Sobald die Ascorbinsäure im Medium verbraucht war, färbten sich die Kulturen jedoch schwarz. Wurde ein Medium mit hoher Kupfersulfatkonzentration verwendet, kam es nicht zu einem Wachstum der Kulturen.

Um bei gleichzeitiger Unterbindung der Melaninproduktion höhere Laccaseausbeuten im Kulturüberstand zu erzielen, wurde der Versuch optimiert. Dazu wurden den Kulturen zunächst verschiedene Mengen an Ascorbinsäure zugesetzt und die Änderung der Ascorbinsäurekonzentration über die Zeit verfolgt, um besser vorhersagen zu können, wann und bei welchen Ascorbinsäurekonzentrationen in den Kulturen die Melaninbildung wieder einsetzte (Abb. 3.21). Es zeigte sich, dass mit einsetzendem Wachstum der Hefen die Ascorbinsäure innerhalb von 2-3 Tagen verbraucht war. Zu dem Zeitpunkt, an dem keine Ascorbinsäure mehr gemessen wurde, konnte eine Schwarzfärbung der Kulturen festgestellt werden. Dies war bei den Kulturen mit 0,05 % Ascorbinsäure- Anfangskonzentration nach 3 Tagen, bei den Kulturen mit 0,1 % Ascorbinsäure nach 4 Tagen und bei den Kulturen mit 0,2% Ascorbinsäure nach 5 Tagen der Fall. Die Zelldichten der Kulturen waren umso geringer je mehr Ascorbinsäure dem Medium zugegeben worden war.



**Abb. 3.21: Abnahme der Ascorbinsäurekonzentration in *H. acidophila* Kulturen mit Ascorbinsäurezusatz über die Wachstumszeit.** *H. acidophila* wurde im üblichen Standardmedium bei 25°C, Glukose als Kohlenstoffquelle und 0,04µM Kupfersulfat über 5 Tage angezogen. Zusätzlich wurde den Kulturen 0,2 %, 0,1 % und 0,05 % Ascorbinsäure zur Hemmung der Melaninsynthese zugesetzt. In der Kultur mit dem Zusatz von 0,2 % Ascorbinsäure kam es zu einer zweitägigen lag-Phase. Die Kulturen mit Zusatz von 0,05 % Ascorbinsäure waren ungefärbt bis Tag 2, die Kulturen mit Zusatz von 0,1 % bis Tag 3 und die Kulturen mit 0,2% Ascorbinsäure bis Tag 4. Die Zelldichten waren umso geringer je höher die Anfangs-Ascorbinsäurekonzentration war.

Um die Zelldichten und damit möglicherweise die Laccaseausbeute zu erhöhen, wurden im Folgenden Vorkulturen unter Zusatz von Ascorbinsäure (0,1 %) angezogen, die nach zweitägigem Wachstum noch einmal mit 0,1 % Ascorbinsäure versetzt wurden. Nach insgesamt 4 Tagen Wachstum wurden die Vorkulturen vollständig als Inokulum für die eigentlichen Anzuchtkulturen eingesetzt. Diesen Kulturen wurden wegen der größeren Zellmasse bei Inkubationsbeginn 0,3 %; 0,5 % bzw. 1 % Ascorbinsäure zugesetzt. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C waren die 0,3 und 0,5%igen Kulturen im Gegensatz zur



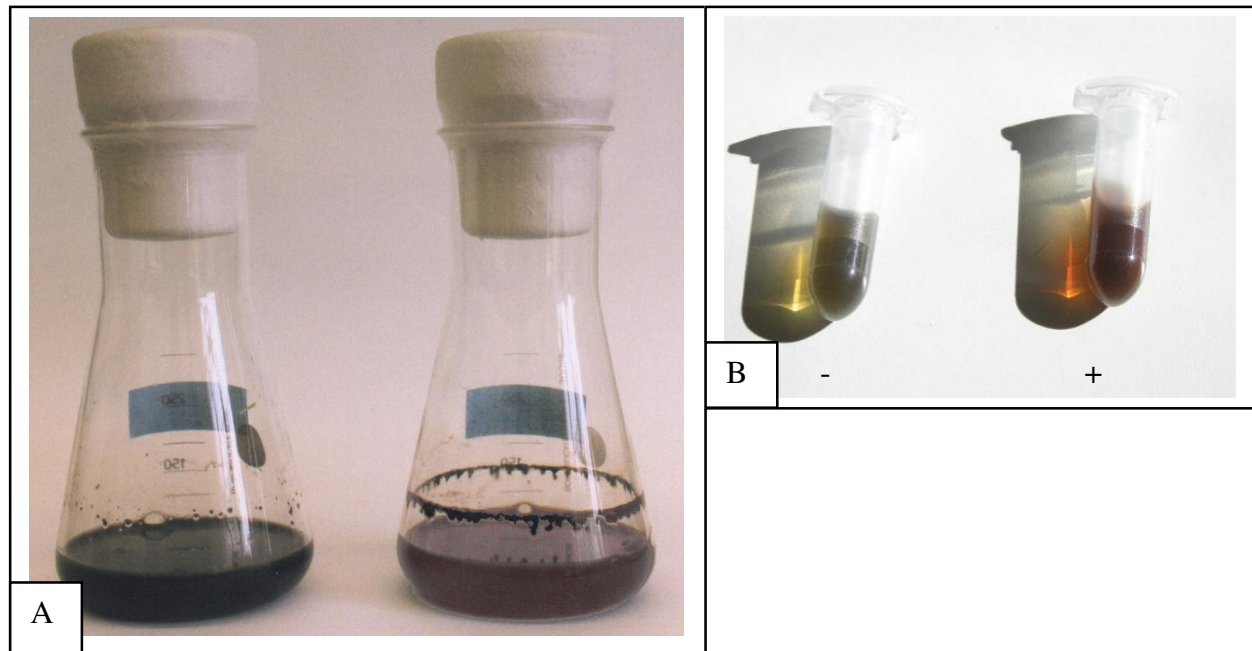
Kultur mit 1 % Zusatz angewachsen und noch ungefärbt. Das Zellwachstum war im Vergleich zu einer gleich lang gewachsenen Kontrollkultur ohne Ascorbinsäurezusatz jedoch gering (ca. 20%). Auch in diesem Versuch zeigte sich eine eindeutige Korrelation zwischen anfänglicher Ascorbinsäurekonzentration und Biomasseproduktion. Je höher die Ascorbinsäurekonzentration beim Inkubationsstart war, desto geringer war das Wachstum der Kulturen.

Die Laccaseaktivität im Kulturüberstand und an den Zellen der ascorbinsäurehaltigen Kulturen war sehr gering, wie dies auch bei Kulturen ohne Zusatz von Ascorbinsäure mit geringer Kupferkonzentration der Fall war. Erst nach Umpuffern des Kulturüberstands und Entfernen der Ascorbinsäure war es möglich, Laccaseaktivitäten um 0,04 mU/ml Kultur zu bestimmen. Die geringen Aktivitäten waren auf die fehlende Induktion durch Kupfer zurückzuführen. Für die Anzucht von *H. acidophila* unter Zusatz von Ascorbinsäure wurde nämlich das übliche Anzuchtsmedium mit niedriger Kupferkonzentration (0,04  $\mu\text{M}$ ) verwendet, da es bei hoher (250  $\mu\text{M}$ ) Kupferkonzentration nicht zu einem Wachstum kam, wenn Ascorbinsäure zugesetzt wurde. Auch bei mittleren Kupfersulfatkonzentrationen (10 bzw. 100  $\mu\text{M}$ ) erfolgte kein Wachstum.

Durch die Anzucht von *H. acidophila* mit Ascorbinsäurezusatz gelang es, die Melaninproduktion zu unterbinden. Allerdings waren die erzielten Laccaseaktivitäten sehr gering, da eine Induktion der Laccasen durch Kupfersulfat zu einer Stagnation im Zellwachstum führte und deshalb nicht durchgeführt werden konnte. Außerdem ergab sich das Problem, dass die in den Proben enthaltenen Melaninmonomere spontan polymerisierten sobald die Ascorbinsäure aus den Proben entfernt wurde, was zwangsläufig während der Ultrafiltration der Fall war.

### **3.6.1.5 Hemmung der DHN-Melaninsynthese**

Tricyclazol ist ein typischer Inhibitor der DHN-Melaninsynthese. Bei Anzucht von *H. acidophila* unter Zusatz von Tricyclazol kam es statt der normalen grün-schwarzen Färbung zu einer rötlichen Verfärbung der Kulturen (Abb. 3.22). Diese Reaktion ist zwar typisch für eine Inhibition der DHN-Melaninsynthese durch Tricyclazol, führte aber nicht zur Lösung des Problems der Melaninkontamination, da es anscheinend zur Bildung eines melaninähnlichen Polymers aus den angereicherten Zwischenstufen des DHN-Melaninsyntheseweges gekommen war.



**Abb. 3.22:** A: *H. acidophila* Kulturen ohne (links) und mit (rechts) Zusatz von Tricyclazol. B: Kulturüberstände der Kulturen. - = ohne Zusatz von Tricyclazol, + = mit Zusatz von Tricyclazol. Die Kulturen waren für 10 Tage unter Standardbedingungen angezogen worden. Bei den Kulturen mit Tricyclazolzusatz kam es zu einer rötlichen Verfärbung.

### 3.6.2 Gelfiltrationschromatographie

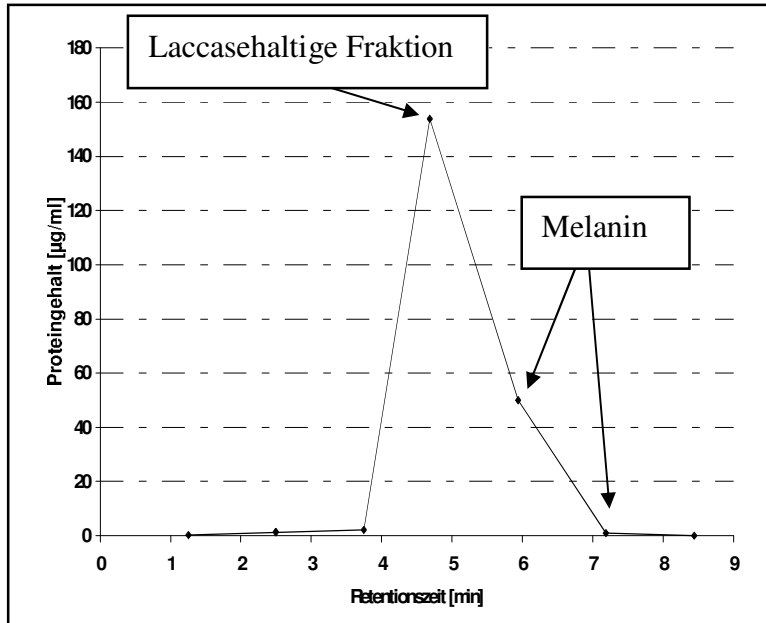
Bei der Gelfiltration erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße. Es wurden verschiedene Materialien für die Gelfiltration getestet:

- EconoPac 10 DG (Ausschlussvolumen 6 kDa)
- Superdex 75 (Ausschlussvolumen 70 kDa)

**EconoPac 10 DG:** Als erster Aufreinigungsschritt wurde eine Gelfiltration mittels EconoPac 10 DG für die Aufreinigung der Rohextrakte gewählt, um störende Substanzen wie z.B. das Melanin und Salze zu entfernen. Es wurde deshalb Säulenmaterial mit einem Ausschlussvolumen von 6 kDa verwendet. Die Gelfiltrationssäulen wurden für den ersten Aufreinigungsschritt der Laccasen aus dem Kulturüberstand, der von den Zellen isolierten Laccasen und der Laccasen aus dem Zellextrakt verwendet.

Bei den Laccasen aus dem Kulturüberstand wurden Reinigungsfaktoren von 2,6, eine Ausbeute von 99 % und eine Reduktion des Melaningehaltes um ca. 2 Drittel erreicht (Tab. 3.13). Bei 100fach konzentriertem Kulturüberstand führte die Gelfiltration zu schlechteren Ergebnissen: Es ergaben sich Reinigungsfaktoren um 1 (keine Reinigung) und eine Ausbeute um 75 % (Tab. 3.13). Ein Großteil des Melanins konnte aber auch hier aus der Probe entfernt

werden. In Abb. 3.23 ist zu sehen, dass die meisten Proteine, u.a. die Laccasen, in einem Gipfel von der Säule gespült werden. Das Melanin wurde als Letztes von der Säule herunter gewaschen und so vom Großteil der laccasehaltigen Fraktion getrennt.



**Abb. 3.23: Gelfiltration des konzentrierten Kulturüberstandes von *H. acidophila*.** Es wurde 100fach konzentrierter Kulturüberstand verwendet. Dabei wurden 0,5 ml über eine EconoPac 10 DG-Gelfiltrationssäule gegeben, die Proteine mit 0,75 ml Puffer von der Säule gespült und der Proteingehalt in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Die laccasehaltige Fraktion konnte in nach einer Retentionszeit von 5 Minuten von der Säule zurück gewonnen werden. Mindestens 50 % des Melanins wurde erst danach von der Säule gespült.

Bei Gelfiltration der durch Waschen von lyophilisierten Zellen isolierten Laccaseaktivität wurde fast das gesamte Protein in einem Gipfel von der Säule zurück gewonnen. Die Ausbeute lag jedoch nur bei 15 % und der Reinigungsfaktor war kleiner als 1 (Tab. 3.13). Die Gelfiltration dieser Laccase-Fraktion brachte also nicht den gewünschten Reinigungserfolg. Bei der Gelfiltration des Zellextraktes konnte eine Ausbeute von 73 % und ein Reinigungsfaktor von bis zu 1,5 erreicht werden. Bei der Gelfiltration der Proben aus dem Zellaufschluss stand die Entsalzung aufgrund des hochkonzentrierten Aufschlusspuffers im Vordergrund. Die Gelfiltration stellte für diese Proben eine gute Vorbereitung für die Ionenaustauschchromatographie dar.

**Maßstabsvergrößerung:** Die zur Gelfiltration genutzten EconoPac 10 DG Säulchen konnten mit maximal 3,3 ml Probe beladen werden. Um den Maßstab zu vergrößern, wurde das gleiche Säulenmaterial in eine Glassäule (Volumen 150 ml) gepackt und der Versuch analog durchgeführt. Das Herunterwaschen der Proteine von der Säule folgte hier prinzipiell dem gleichen Muster wie bei den kleinen Säulen, erfolgte aber weniger distinkt. Die Laccase wurde über die verschiedenen Fraktionen dadurch stark verdünnt.

**Tab.3.13: Partielle Reinigung der *H. acidophila* Laccasen durch Gelfiltrationschromatographie mit EconoPac 10 DG.** Spez. = spezifische; rE = relative Einheiten; n.b. = nicht bestimmt: der Melaningehalt ( $OD_{350}$ ) wurde bei den Proben aus dem Zellextrakt und bei den zellassozierten Laccasen nicht ermittelt, da die Proben optisch keine Melaninkontamination aufwiesen. Die Werte repräsentieren beispielhaft je eine typische Gelfiltrationschromatographie. Die Reinigungsfaktoren waren für die Laccasen aus dem Zellextrakt 1,5, für die Laccasen aus dem Kulturüberstand 2,6 und für die zellassozierten Laccasen kleiner als 1.

	Spez. Laccaseaktivität		Gesamtaktivität		Melaningehalt	
	Vorher [mU/mg]	Nachher [mU/mg]	Vorher [mU]	Nachher [mU]	Vorher [rE]	Nachher [rE]
<b>Laccasen aus Zellextrakt</b>	277	422	498	365	n.b.	n.b.
<b>Laccasen aus Kulturüberstand</b>	508	1314	25	24,9	0,52	0,18
<b>Laccasen aus ca. 100fach konzentrierte m Kulturüberstand</b>	582	559	568	430	78,10	47,01
<b>Zellassozierte Laccasen</b>	214	64	6	0,9	n.b.	n.b.

**Superdex 75:** Um auch eine Gelfiltration mit einem größeren Ausschlussvolumen (70 kDa) zu testen, wurde das Säulenmaterial Superdex 75 verwendet. Konzentrierter Kulturüberstand wurde auf diese Säule aufgetragen und der Verlauf der Filtration am Computer verfolgt. Es ergaben sich drei Proteinfractionen. Sowohl das Melanin als auch ein Großteil der Laccaseaktivität waren in der ersten Proteinfraction zu finden. Es wurde zwar eine Ausbeute von 85 %, aber nur ein Reinigungsfaktor von 1,5 für die laccasehaltige Fraction erreicht. Außerdem wurde die Probe um den Faktor 7 verdünnt, so dass die verbliebenen Laccaseaktivitäten nur noch bei 15 mU/ml (205 mU/mg) lagen. Die Gelfiltration mit Superdex 75 führte also nicht zu einer nennenswerten Reinigung der Laccasen oder zur Abtrennung des Melanins.

### **3.6.3 Anionenaustauschchromatographie**

Da die Laccasen aus *H. acidophila* über einen weiten pH-Bereich stabil sind (s. 3.5.3.3), kamen sowohl Anionen- als auch Kationenaustauscher für die Aufreinigung in Frage. Als Anionenaustauscher wurde DEAE Sepharose Fast Flow verwendet. Die Bedingungen (Puffer, Start pH-Wert, Elution) wurden ausgehend von dem im Material und Methoden Teil beschriebenen Grundprotokoll variiert. Die Proben des Zellextraktes wurden über eine Gelfiltration (s. 3.6.2) auf den Startpuffer umgepuffert. Die Kulturüberstandsproben lagen in lyophilisierter Form vor und wurden im Startpuffer aufgenommen. Am Computer wurden die durch den UV-Detektor aufgezeichneten Absorptionen der eluierenden Proben bei 280 nm verfolgt. Anschließend wurde eine Auswertung vorgenommen, bei der den einzelnen Gipfeln die Fraktionen, Proteingehalte und Laccaseaktivitäten zugeordnet wurden, so dass Ausbeute und Reinigungsfaktoren bestimmt werden konnten.

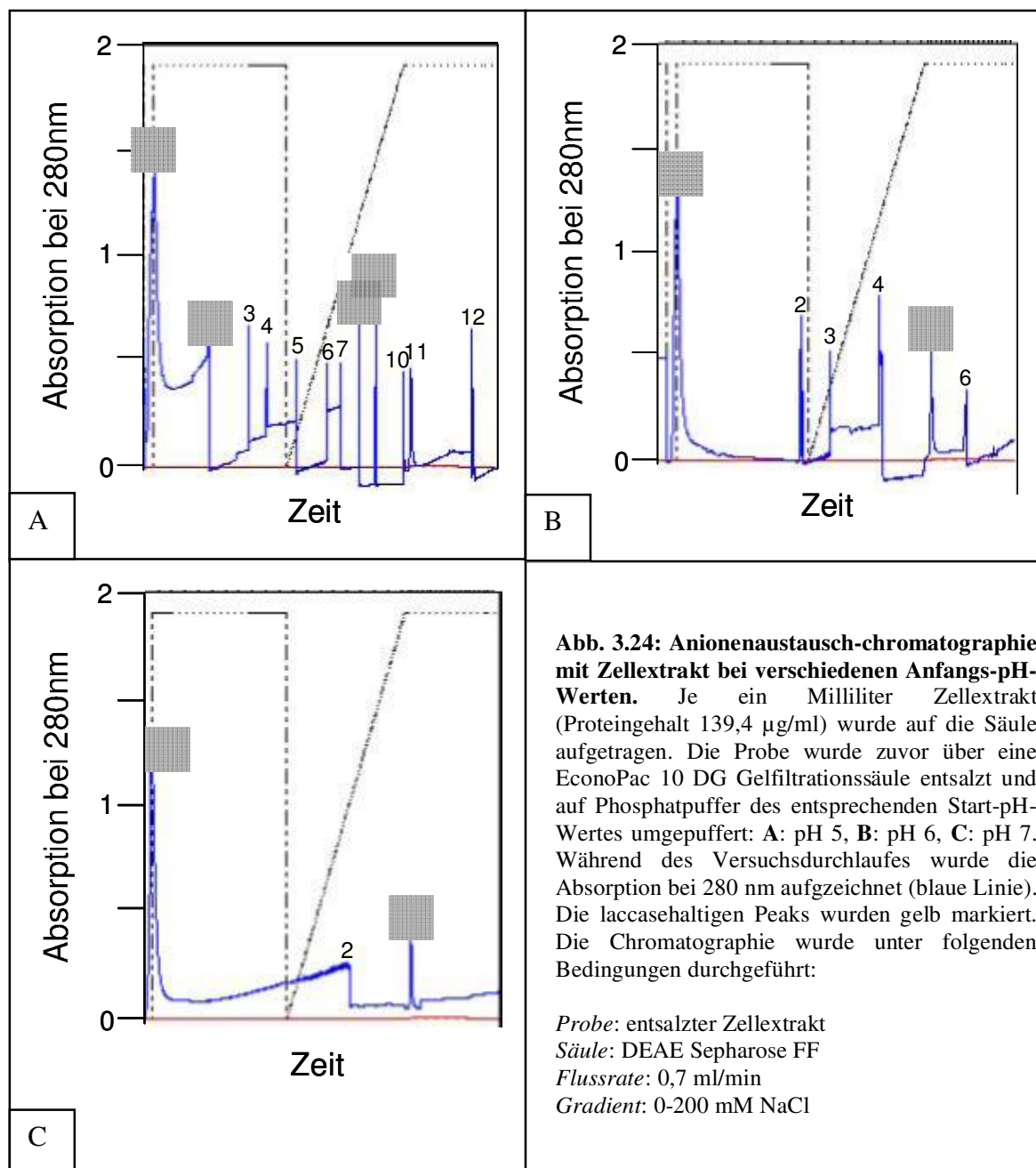
#### **Anionenaustauschchromatographie mit Kulturüberstand und Methylpiperazinpuffer:**

Im ersten Versuchsdurchlauf wurde lyophilisierter Kulturüberstand über die DEAE Sepharose FF-Säule aufgetrennt. Als Startpuffer wurde 20 mM Methylpiperazin, pH 4,8 verwendet, da dieser vom Hersteller der Säule für den gewünschten pH-Bereich empfohlen worden war. Der Start-pH-Wert wurde mit ungefähr einer Einheit über dem isoelektrischen Punkt der Laccase angesetzt. Zur Elution wurde ein Kochsalzgradient (0-250 mM) verwendet. Es ergaben sich neben dem ersten Maximum der Proteine, die nicht an die Säule gebunden hatten, weitere acht Proteingipfel. Durch den Laccasetest mit den einzelnen Fraktionen wurde ermittelt, dass sich fast die gesamte Laccaseaktivität im ersten Gipfel befand, der überwiegende Teil der Laccasen also nicht an die Säule gebunden hatten. Im letzten gemessenen Maximum zeigte sich ebenfalls eine, wenn auch sehr geringe, Laccaseaktivität. Die Ausbeute an Laccase in diesem kleinen Gipfel lag bei nur 0,3 %, der Reinigungsfaktor war wegen des hohen Melaningehaltes der Probe vor Auftragen auf die Säule nicht bestimmbar. Die Laccaseaktivität der eingesetzten Probe (1 ml) lag bei 500 mU/ml. Wegen der hohen Verlustrate wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

#### **Anionenaustauschchromatographie mit Zellextrakt bei verschiedenen Start-pH-Werten:**

Da sowohl bei den Kationenaustauscherversuchen (s. 3.6.4) als auch im vorhergehenden Anionenaustauscherversuchslauf generell das Problem bestand, dass die Laccasen nicht an den Ionenaustauscher banden, obwohl die Proben durch die vorhergehende Gelfiltration entsalzt worden waren und auch die Pufferkonzentration bewusst niedrig (20 mM) gewählt worden war, sollte eine stärkere Bindung der Proben durch Erhöhung des Start pH-Wertes

erreicht werden. Die isoelektrischen Punkte der Laccasen waren mit 3,5-3,8 bestimmt worden (Abb. 3.16, Abb. 3.17), deshalb wurden die zu variierenden pH-Werte auf 5, 6 und 7 festgelegt. Der Versuch wurde nur mit Zellextrakt durchgeführt, da Konzentrat des Kulturüberstandes nur begrenzt zur Verfügung stand. Die Proben wurden vor der Anionenaustauschchromatographie mittels Gelfiltration entsalzt. Der Vergleich der verschiedenen Chromatogramme zeigt, dass mit steigendem Start-pH-Wert immer weniger Protein im ersten Maximum zu finden ist und dementsprechend immer mehr Proteine aus dem Zellextrakt an die Säule banden.



Bei der Anionenaustauschchromatographie mit höheren Start-pH-Werten kam es zur partiellen Bindung der Laccasen an die Säule. Die erzielten Ausbeuten bei den eluierten Laccasen waren jedoch in allen Fällen gering. Die beste Ausbeute wurde bei pH 6 in Gipfel 5 erreicht. Hier betrug die Ausbeute fast 20 %, aber der Reinigungsfaktor lag bei nur 1,2. Dass die Reinigung nicht effektiv war, wurde auch durch die nachfolgende Auftrennung des Proteingemisches in einer SDS-PAGE bestätigt (Abb. 3.25).

**Tab. 3.14: Auswertung der Aufreinigung der laccasehaltigen Zellextrakt-Fractionen nach Anionenaustauschchromatographie bei verschiedenen Start-pH-Werten (Abb. 3.24).** Die Laccaseaktivitäten wurden unter Standardbedingungen mit ABTS als Substrat gemessen. Die Proteingehalte wurden aus der Absorption bei 280nm abgeschätzt. Die Nummern bezeichnen die einzelnen Maxima (Abb. 3.24). Es wurden Fractionen mit einem Volumen von je 2 ml gesammelt.

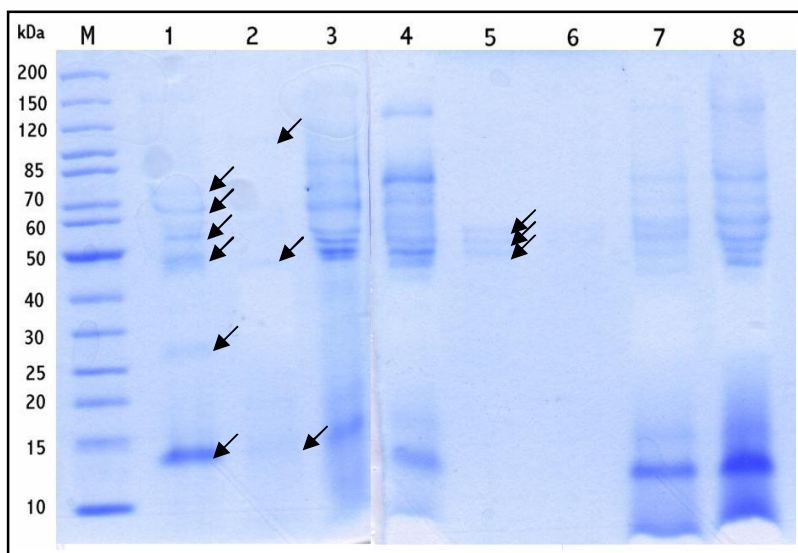
		Spezifische Laccase-aktivität [mU/mg]	Gesamtaktivität [mU]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
<b>pH 5</b>	vorher	79	22	-	-
	1	16	2	9	< 1
	2	12	0,6	3	< 1
	8	13	0,8	4	< 1
	9	12	0,8	4	< 1
<b>pH 6</b>	vorher	83	23	-	-
	1	11	1,4	6	< 1
	5	96	4,4	19	1,2
<b>pH 7</b>	vorher	89	24	-	-
	1	13	1,4	6	< 1
	3	78	2,8	10	ca.1

#### **Optimierung der Elution der Proteine von der Anionenaustauschersäule:**

Aufgrund der hohen Verluste bei den vorhergegangenen Versuchen, erschien der durchgeführte Elutionsschritt mit 0-200 mM NaCl suboptimal, da möglicherweise ein Großteil der Proteine an der Säule verblieben. Deshalb wurde eine Ablösung der Proteine mittels pH-Gradient bzw. mittels isokratischem NaCl-Gradient mit erhöhter Salzkonzentration (0-1 M) getestet. Der pH-Gradient war viel versprechend, da die Laccaseaktivitäten sich über einen weiten Bereich im Sauren stabil gezeigt hatten, es nach Salzbehandlung jedoch zu Verlusten der Enzymaktivität gekommen war (s. 3.3.2). Da sich in den vorhergehenden Versuchen gezeigt hatte, dass ein Start-pH-Wert von 6 die geringsten Verluste gebracht hatte,

wurde dieser pH-Wert auch für die weiteren Versuche verwendet. Für den pH-Gradienten wurde der pH-Wert bis auf 2 gesenkt. Schon bei pH 4 war es zuvor nicht mehr zur Bindung der Proteine an das Säulenmaterial gekommen. Für den Versuch wurde McIlvaine Puffer verwendet, da dieser Puffer über den gesamten genutzten pH-Bereich Pufferwirkung besitzt. Weder durch den pH-Gradienten noch durch den veränderten Salzgradienten konnte jedoch eine Steigerung der Ausbeute oder des Reinigungsfaktors erreicht werden. Bei Elution mittels pH-Gradienten wurde ein laccasehaltiges Maximum detektiert, das jedoch erst beim letzten Spülschritt mit 1 M NaCl eluierte. Die Laccase-Gesamtausbeute lag bei diesem Versuch nur bei maximal 8 %. Bei Elution mit dem Salzgradienten konnten zwei Proteinmaxima gemessen werden, das erste bei 400 mM NaCl, das zweite bei 600 mM. Reinigungsfaktoren und Ausbeute lagen im gleichen Bereich wie die vorangegangenen Versuche, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Die Fraktionen aus der Anionenchromatographie mit verschiedenen Start-pH-Werten wurden gefällt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurde jeweils 1 ml Probe gefällt. Das entsprach der Menge, die nach Durchführung der Tests noch vorhanden war. Das Ergebnis ist in Abb. 3.25 dargestellt. Außer den jeweils ersten Maxima waren die Proben alle sehr gering konzentriert. In diesen ersten Maxima, in denen sich die Proteine befanden, die nicht an die Anionenaustauschersäule gebunden haben, war im SDS-Gel eine Vielzahl an Proteinbanden zu erkennen. In Fraktion 5 vom Versuchsdurchlauf mit Start pH-Wert 6 (Abb. 3.25, 1) konnten ebenfalls mehrere Proteinbanden identifiziert werden: unter anderem bei 55 kDa, 65kDa, 75 kDa und etwas weniger distinkt bei ca. 50 kDa, bei 27 kDa und 14 kDa. Die Banden bei ca. 50 kDa und bei 14 kDa wurden auch in Fraktion 3 vom Versuchsdurchlauf mit Start-pH 7 angefärbt. Bei den Fraktionen 2 und 3 vom Versuchsdurchlauf mit Start pH 5 zeigten sich mehrere Banden zwischen 50 und 60 kDa.



**Abb. 3.25. Auftrennung der Proben aus der Anionenaustauschchromatographie mit unterschiedlichen Start-pH-Werten.** Alle aufgetragenen Fraktionen zeigten eine mehr oder weniger starke Laccaseaktivität mit ABTS. Je ein Milliliter Probe wurde einer TCA-Fällung unterzogen und auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Serva Blue gefärbt. M = Marker, 1 = Fraktion 5 (Start-pH 6), 2 = Fraktion 3 (Start pH 7), 3 = Zellextrakt, 4-6 = Fraktionen 1-3 (Start-pH 5), 7 = Fraktion 2 (Start-pH 6), 8 = Fraktion 2 (Start pH 7).

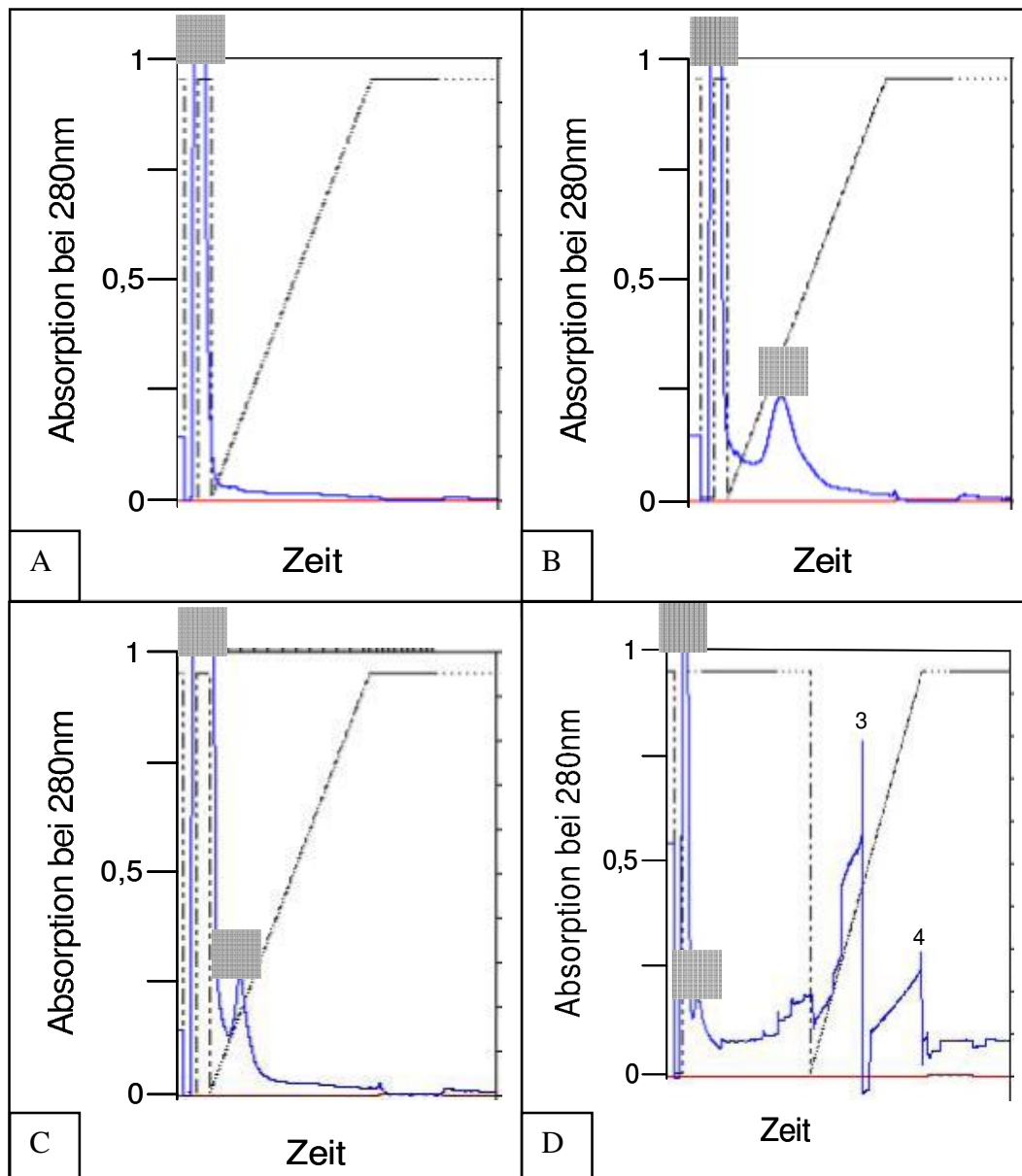


### 3.6.4 Kationenaustauschchromatographie

Nachdem sich gezeigt hatte, dass die Aufreinigung der Laccasen mittels Anionenaustauscher mit sehr hohen Verlusten verknüpft war, sollte die Verwendung einer Kationenaustauschchromatographie untersucht werden. Für diese Methode wurden Puffer mit niedrigen pH-Werten verwendet, was für die Laccasen aus *H. acidophila* aufgrund ihrer hohen Stabilität im Sauren optimal sein sollte (s. 3.5.3.3). Es wurde ein starker Kationenaustauscher (EconoPac High S) verwendet und die Start- und Elutionsbedingungen optimiert.

**Zellextrakt:** Für die Aufreinigung der Laccasen aus dem Zellextrakt von *H. acidophila* wurden der Start-pH-Wert, die Flussgeschwindigkeit bei Probenapplikation und Elution sowie die Probenkonzentration der applizierten Probe variiert.

**Kationenaustauschchromatographie des *H. acidophila* Zellextraktes mit Optimierung des Start-pH-Wertes:** Bei der Optimierung des Start-pH-Wertes wurden pH-Werte zwischen 5 und 1,5 auf Eignung getestet (Abb. 3.26). Bei pH 5 band praktisch kein Protein an die Säule, bei pH 3 und 2 wurde eine Proteinfraction von der Säule eluiert, die auch Laccaseaktivität zeigte (Tab. 3.15). Bei pH 1,5 zeigte sich dieser laccasehaltige Gipfel auch; zusätzlich wurden hier mehrere Proteine durch den Salzgradienten eluiert. Der laccasehaltige Gipfel war beim Start-pH von 1,5 kleiner, da für diesen Versuchsdurchlauf nur eine geringere konzentrierte Probe zur Verfügung stand. Betrachtet man die Ausbeuten und Reinigungsfaktoren (Tab. 3.15), stellt man fest, dass die Kationenaustauschchromatographie bei pH 2 die beste Aufreinigung ergeben hat.



**Abb. 3.26: Variation des Start-pH-Wertes bei Kationenaustauschchromatographie mit Zellextrakt.** A: pH 5, B: pH 3, C: pH 2, D: pH 1,5. Je 500  $\mu$ l Zellextrakt (280  $\mu$ g Protein bei A-D bzw. 220  $\mu$ g Protein bei E) wurden über EconoPac 10DG Gelfiltrationssäulen entsalzt und auf 1,2 ml des Puffers mit dem entsprechenden Start-pH-Wert umgepuffert. 1ml dieser Probe wurde dann auf den Kationenaustauscher appliziert. Während des Versuchsdurchlaufes wurde die Absorption bei 280nm aufgezeichnet (blaue Linie). Die laccasehaltigen Maxima wurden gelb markiert. Im Anschluss an den Versuch wurden die resultierenden Maxima auf Laccaseaktivität untersucht. Die Säulenbedingungen waren wie folgt:

*Probe:* zellfreier Zellextrakt

*Säule:* EconoPac High S

*Flussrate:* 0,7 ml/min

*Gradient:* 100-200 mM NaCl

**Tab. 3.15: Auswertung der laccasehaltigen Fraktionen nach Kationenaustausch-chromatographie zur Aufreinigung der Laccasen aus dem *H. acidophila* Zellextrakt bei verschiedenen Start-pH-Werten: pH 5 (A), pH 3 (B), pH 2 (C), pH 1,5 (D).** Die Laccaseaktivitäten wurden unter Standardbedingungen mit ABTS als Substrat gemessen. Es wurden jeweils Fraktionen von einem Milliliter Volumen gesammelt. Die Proteingehalte wurden aus der Absorption bei 280nm abgeschätzt. Die Nummern in der 2. Spalte bezeichnen die einzelnen Maxima (Abb. 3.26). Als Proben wurden über EconoPac 10 DG entsalzte und umgepufferte Zellextrakte verwendet. Die für A eingesetzte Probe hatte eine Laccaseaktivität von 37 mU/ml, die für B eingesetzte Probe eine Laccaseaktivität von 69 mU/ml und die für C eingesetzte Probe eine Laccaseaktivität von 72 mU/ml. Die Proteingehalte der Proben A-C lagen jeweils bei 280 µg/ml. Die für D eingesetzte Probe hatte einen Proteingehalt von 220 µg/ml und zeigte eine Laccaseaktivität von 46 mU/ml.

		<b>Spez. Laccaseaktivität [mU/mg]</b>	<b>Gesamtaktivität [mU]</b>	<b>Ausbeute [%]</b>	<b>Reinigungs- faktor</b>
<b>A: pH 5</b>	vorher	132	37	-	-
	1	323	26	70	2,4
<b>B: pH 3</b>	vorher	246	69		
	1	274	25	36	1,1
	2	600	7	10	2,4
<b>C: pH 2</b>	vorher	257	72	-	-
	1	163	15	20	<1
	2	1100	13	18	4,3
<b>D: pH 1,5</b>	vorher	209	46	-	-
	1	138	8	17	<1
	2	363	3	6	1,7

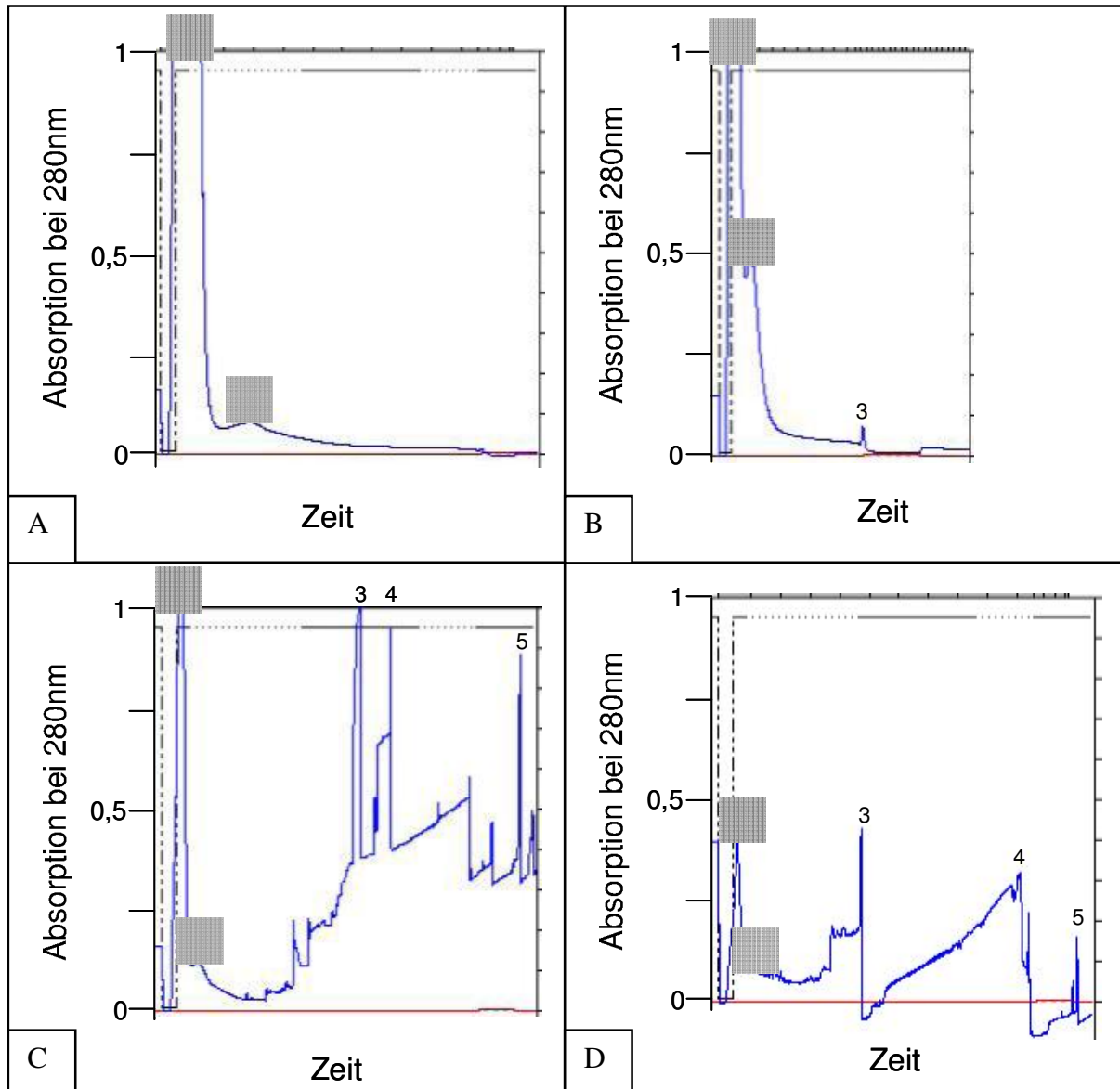
**Kationenaustauschchromatographie des *H. acidophila* Zellextraktes zur Optimierung der Flussgeschwindigkeit:** Die Flussgeschwindigkeit der Puffer bei Elution wurde zwischen 2 und 0,5 ml/min variiert, um möglicherweise ein distinkteres Laccasemaximum zu erhalten und so den Reinigungsfaktor zu verbessern. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 2ml/min banden die Proteine nicht an die Säule, bei den anderen Flussgeschwindigkeiten (1, 0,5 und 0,7 ml/min) ergab sich neben dem Maximum der nicht an die Säule gebundenen Proteine jeweils ein zweiter laccasehaltiger Gipfel. Die Laccaseaktivitäten und die Proteingehalte bei diesen Versuchsdurchläufen unterschieden sich aber nicht signifikant. Für die folgenden Versuche wurde eine Flussgeschwindigkeit von 0,7 ml/min gewählt.

**Kationenaustauschchromatographie des *H. acidophila* Zellextraktes unter Applikation verschiedener Probenkonzentrationen:** Neben pH-Wert und Flussgeschwindigkeit wurde die Konzentration der applizierten Probe variiert, um eine Überladung der Säule auszuschließen bzw. durch das Auftragen einer größeren Menge möglicherweise die

Ausbeuten zu verbessern. Es stellte sich heraus, dass tatsächlich mit höheren Konzentrationen höhere Ausbeuten und Reinigungsfaktoren erreicht werden konnten (Tab. 3.16). Die Proben aus dem Zellextrakt wurden nach den errechneten Werten bis zu 10fach aufgereinigt. Wenn weniger konzentrierte Proben aufgetragen wurden, banden viele Proteine an die Säule und wurden mit dem Salzgradienten wieder eluiert (Abb. 3.27). Diese Proteine zeigten aber keine signifikanten Laccaseaktivitäten, so dass durch eine geringere Probenkonzentration keine bessere Aufreinigung in der laccasehaltigen Proteinfraction erreicht werden konnte. Für die weiteren Versuche wurde daraufhin Proben mit einem Proteingehalt von jeweils etwa 600 µg/ml Protein eingesetzt.

**Tab. 3.16: Auswertung der laccasehaltigen Proteinfractionen nach Kationenaustauschchromatographie zur Aufreinigung der Laccasen aus dem *H. acidophila* Zellextrakt bei Applikation verschieden konzentrierter Proben. A: 582 µg/ml, B: 450 µg/ml, C: 291 µg/ml, D: 145 µg/ml.** Die Laccaseaktivitäten wurden unter Standardbedingungen mit ABTS als Substrat gemessen. Die Proteingehalte wurden aus der Absorption bei 280nm abgeschätzt. Die Nummern in der 2. Spalte bezeichnen die einzelnen Maxima (Abb. 3.27). Als Proben wurden über EconoPac 10 DG entsalzte und umgepufferte Zellextrakte verwendet. Die Laccaseaktivitäten der einzelnen Proben lagen bei 75 mU/ml (A), 58 mU/ml (B), 38 mU/ml (C) und 19 mU/ml (D). Es wurden jeweils Fraktionen von einem Milliliter Volumen gesammelt.

		Spez. Laccaseaktivität [mU/mg]	Gesamtaktivität [mU]	Ausbeute [%]	Reinigungs- faktor
<b>A</b>	vorher	129	75	-	-
	1	224	17	23	2
	2	1250	5	7	10
<b>B</b>	vorher	129	58	-	-
	1	131	11	19	1
	2	91	2	3	<1
<b>C</b>	vorher	131	38	-	-
	1	92	6	16	<1
	2	140	0,7	2	1,1
<b>D</b>	vorher	131	19	-	-
	1	235	4	21	2
	2	173	0,7	4	1,3



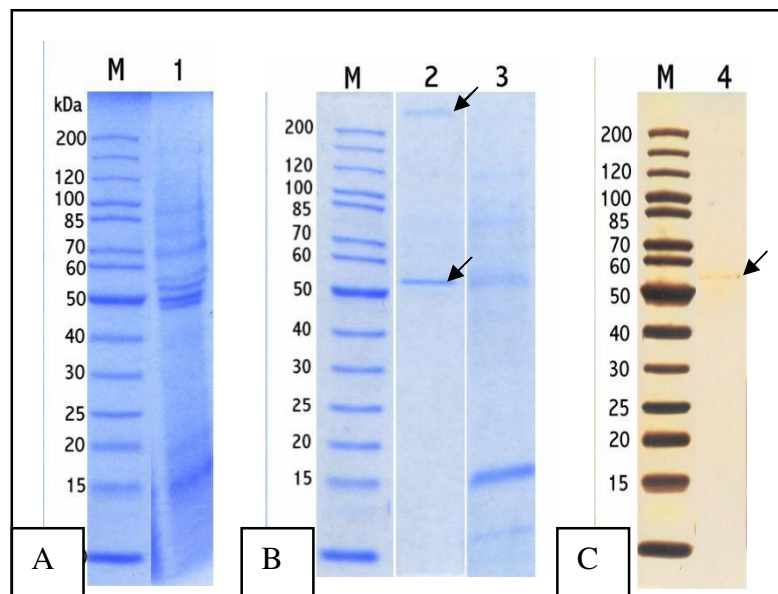
**Abb. 3.27: Aufreinigung der Laccasen aus dem Zellextrakt unter Optimierung der Konzentration der applizierten Probe. A: 582 µg/ml Protein, B: 450 µg/ml, C: 291 µg/ml, 146 µg/ml.** Der Zellextrakt wurde über EconoPac 10 DG Gelfiltrationssäulen entsalzt und umgepuffert. Je 1 ml (A), 0,8 ml (B), 0,5 ml (C) und 0,25 ml (D) dieser Probe wurden auf je 1 ml mit Startpuffer aufgefüllt und dann auf den Kationenaustauscher appliziert. Während des Versuchsdurchlaufes wurde die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet (blaue Linie). Die laccasehaltigen Peaks wurden gelb markiert. Im Anschluss an den Versuch wurden die resultierenden Maxima auf Laccaseaktivität untersucht. Die Säulenbedingungen waren wie folgt:

*Probe:* zellfreier Zellextrakt  
*Säule:* EconoPac High S  
*Flussrate:* 0,7 ml/min  
*Gradient:* 100-200 mM NaCl

Die optimalen Bedingungen für die Aufreinigung der Laccase aus dem *H. acidophila* Zellextrakt mittels Kationenaustauschchromatographie wurden wie folgt festgelegt:

- Start-pH-Wert: pH 2
- Proteinkonzentration des eingesetzten Zellextraktes: mindestens 600µg/ml
- Flussgeschwindigkeit: 0,7 ml/min
- Elutionsgradient: 0-200 mM NaCl

Um den Aufreinigungserfolg zu analysieren, wurden die laccasehaltigen Fraktionen jeweils in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Es ergab sich jeweils eine Bande bei 55 kDa. In Abb. 3.28 ist eine solche SDS-PAGE der laccasehaltigen Fraktion, die unter optimierten Bedingungen (s.o.) gewonnen wurde, dargestellt. Neben der Bande bei 55 kDa ergab sich teilweise auch eine Bande bei über 200 kDa. Wurde die Probe nach der Proteinfällung nicht wie üblich für fünf Minuten gekocht, sondern zum Lösen des Proteinsedimentes im Probenpuffer nur moderat erhitzt, fand sich keine solche Bande (Abb. 3.28 C). In Abb. 3.28 sind die Proben zwischen den einzelnen Aufreinigungsschritten dargestellt. Zellextrakt war aufgrund des hohen Salzgehaltes der Proben zunächst schwer in einer SDS-PAGE aufzutrennen. Diese Probe wurde schließlich einer TCA-Fällung unterzogen, wohingegen die anderen Proben mit einer Methanol-Chloroform-Fällung auf die SDS-PAGE vorbereitet wurden. Nach Aufreinigung unter optimalen Bedingungen ergab sich eine distinkte, wenn auch schwache Bande in der SDS-PAGE. Da diese Fraktionen Laccaseaktivität gezeigt hatten, ist davon auszugehen, dass es sich bei der 55 kDa großen Bande um L (55) aus dem Zellextrakt von *H. acidophila* handelt, die augenscheinlich homogen aufgereinigt wurde.



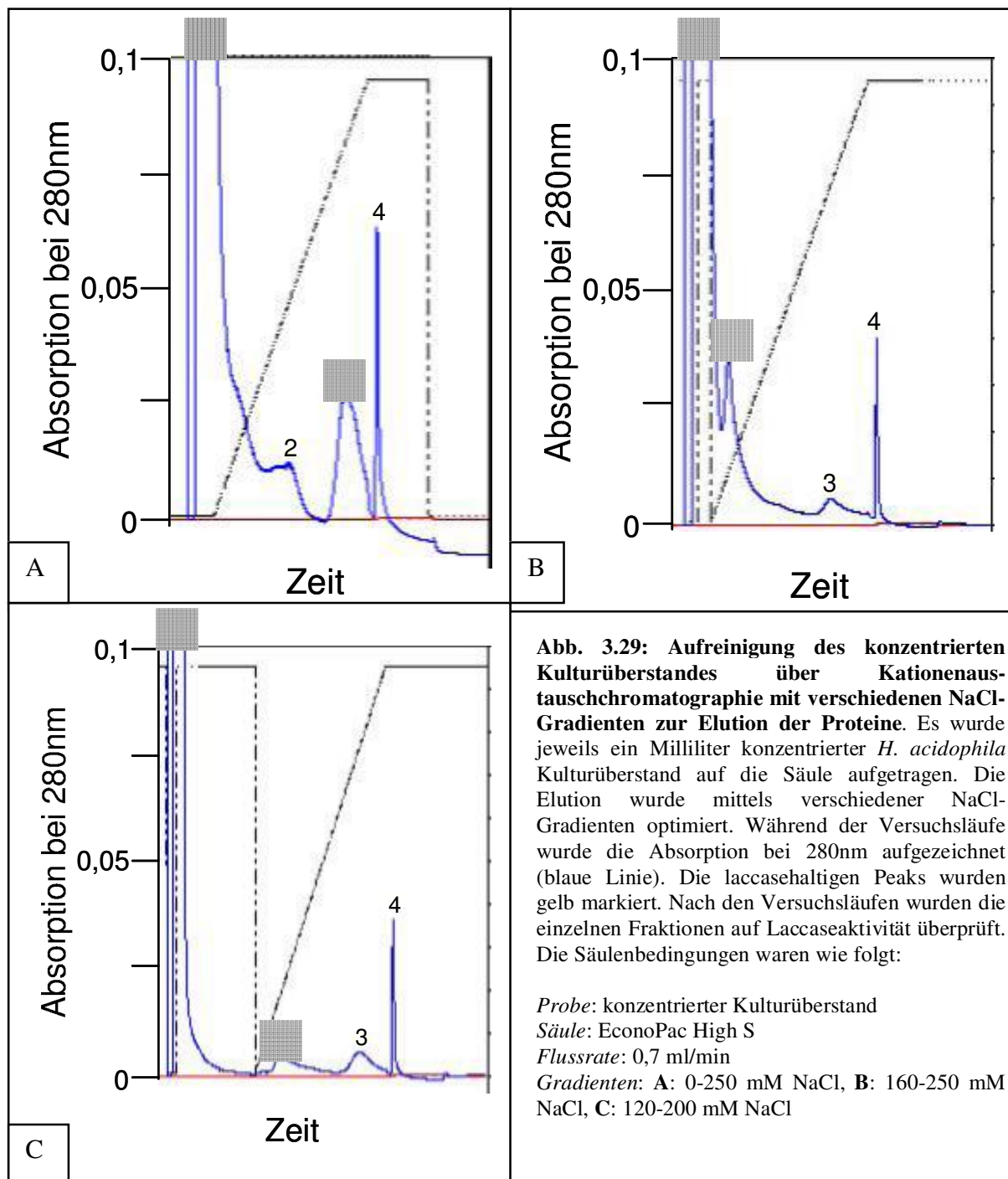
**Abb. 3.28: Analyse der Aufreinigung einer Laccase aus dem Zellextrakt von *H. acidophila* unter optimierten Bedingungen.** Die Proben zwischen den einzelnen Aufreinigungsschritten wurden einer TCA-(Zellextrakt) bzw. Methanol-Chloroform-Fällung unterzogen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt (10 %) und mit Serva Blue Färbung (A und B) bzw. Silbernitrat (C) sichtbar gemacht. M = Marker, 1 = Zellextrakt, 3 = Zellextrakt nach Gelfiltration, 2 = laccasehaltige Fraktion nach Kationenaustausch-chromatographie, 4 = ohne Kochen vorbehandelte Probe 2. Die aufgereinigte Laccase aus dem Zellextrakt lag bei etwa 55 kDa und wurde zur Verdeutlichung mit einem Pfeil gekennzeichnet. Wurde die Probe bei der Probenaufbereitung gekocht, ergab sich die ebenfalls mit einem Pfeil gekennzeichnete große Bande (2), bei der es sich möglicherweise um ein Aggregat verschiedener Untereinheiten handelt.

**Kationenaustauschchromatographie des *H. acidophila* Kulturüberstandes (Abb. 3.29):**

Für die Aufreinigung der Laccasen aus dem Kulturüberstand wurde der Kulturüberstand mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Anschließend wurde die Probe mittels VivaSpin-Röhrchen und 20 mM Citrat/HCl-Puffer, pH 3, umgepuffert. Wurde ein Milliliter einer so behandelten Probe in eine Kationenaustauschchromatographie eingesetzt, konnte eine aktive Fraktion von der Säule eluiert werden. Allerdings kam es beim Großteil der Proteine aus der Probe nicht zur Bindung an die Säule, weshalb diese Proteine jeweils im ersten Maximum zu finden waren. Die Verluste waren dementsprechend hoch. Die Ausbeuten für die aktiven Fraktionen der drei dargestellten Versuchsläufe lagen zwischen 1 und 9 %, die Reinigungsfaktoren zwischen 8 und 49 (Tab. 3.17).

**Tab 3.17: Auswertung der Aufreinigung der laccasehaltigen Kulturüberstands-Fractionen aus der Kationenaustauschchromatographie.** Die Laccaseaktivitäten wurden unter Standardbedingungen mit ABTS als Substrat gemessen. Die Proteingehalte wurden aus der Absorption bei 280 nm abgeschätzt. Die Nummern in der 2. Spalte bezeichnen die einzelnen Maxima (Abb. 3.29). Es wurden verschiedene NaCl-Gradienten zur Elution genutzt: 0-250 mM (A), 160-250 mM (B) und 120-200 mM (C). Das für A eingesetzte Konzentrat hatte eine Laccaseaktivität von 687 mU/ml und einen Proteingehalt von 1070 µg/ml, das für B eingesetzte Konzentrat eine Laccaseaktivität von 312 mU/ml und einen Proteingehalt von 511 µg/ml und das für C eingesetzte Konzentrat eine Laccaseaktivität von 657 mU/ml und einen Proteingehalt von 1077 µg/ml. Zum Teil lagen die Absorptionen bei 280 nm bedingt durch das in den Proben enthaltene Melanin über der Nachweismöglichkeit. Die aus diesen unsicheren Werten berechneten Parameter wurden in Klammern gesetzt.

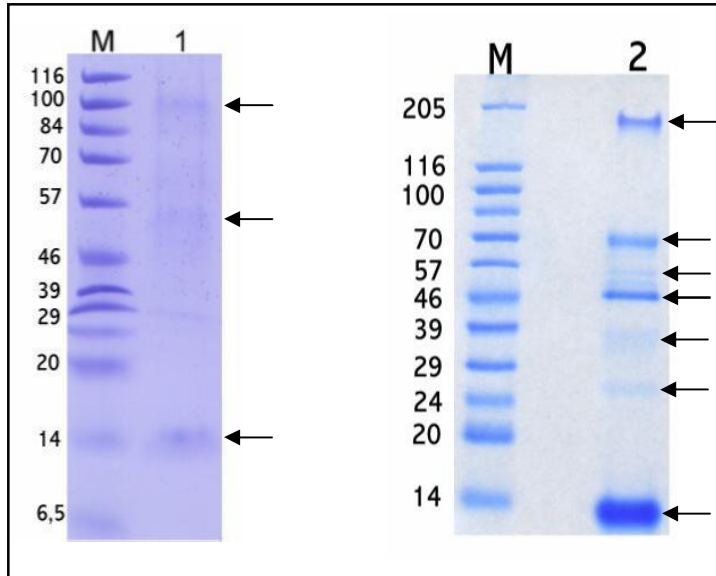
		Spezifische Laccaseaktivität [mU/mg]	Gesamtaktivität [mU]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
<b>A</b>	Vorher	642	687	-	-
	1	(1096)	247	36	(2)
	2	2000	1	0,2	3
	3	9000	11	2	14
	4	407	1	0,2	<1
<b>B</b>	Vorher	611	312	-	-
	2	(1750)	3	0,5	(3)
	3	4667	1	1	8
	4	308	0,4	0,1	<1
<b>C</b>	Vorher	610	657	-	-
	1	(1049)	236	36	(2)
	2	30.000	60	9	49



Obwohl die Verlustraten hoch waren (90 %), wurden die laccasehaltigen Fraktionen aus der Kationenaustauschchromatographie mittels Auftrennung in einer SDS-PAGE ausgewertet. Dazu wurden die aktiven Fraktionen (Fraktion 2) von drei identischen Säulenläufen (Abb. 3.29 C) zusammengefasst, einer Methanol-Chloroform-Fällung unterzogen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.30). Es ergaben sich in der laccasehaltigen Fraktion (1) drei Banden: bei 55 kDa, bei etwas über 100 und bei 14 kDa. Durch



Kationenaustauschchromatographie mit durch Ultrafiltration aufkonzentriertem Kulturüberstand gelang es, eine praktisch melaninfreie, laccasehaltige Probe aus dem Kulturüberstand von *H. acidophila* zu gewinnen, bei der L (55) um den Faktor 49 aufgereinigt wurde.



**Abb. 3.30: Proteine aus dem *H. acidophila* Kulturüberstand nach Kationenaustauschchromatographie.** Die Fraktionen 2 bzw. 4 von drei identischen Versuchsdurchläufen (Abb. 3.29 C) wurden gepoolt, gefällt und in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Serva Blue Färbung sichtbar gemacht. In der laccasehaltigen Fraktion 2 sind mehrere Banden zu erkennen: bei 14, 55 und 100 kDa. Ebenso in der nicht laccasehaltigen Fraktion 4: 200, 70, 55, 47, 38, 25, 12 kDa. Die stark melaninhaltigen Proben des Konzentrates und der nicht an die Säule gebundenen Proteine waren aufgrund der Überlagerung durch das Melanin nicht auswertbar. M= Marker, 1 = laccasehaltige Fraktion nach Kationenaustauschchromatographie, 2 = Fraktion 4 ohne Laccaseaktivität. Zur Verdeutlichung sind die Proteinbanden mit Pfeilen gekennzeichnet.

### 3.6.5 Präparative SDS-PAGE

Über Ionenaustauschchromatographie konnte nur L (55), nicht jedoch L (70) oder L (85), aufgereinigt werden, da keine Bindung an die Säule erfolgte. Um wenigstens eine kleine Menge reine L (70) für eine mögliche N-terminale Aminosäuresequenzierung zu erhalten, wurde eine präparative SDS-PAGE mit einer teilgereinigten Probe durchgeführt. Dazu wurde L (70) nach Ultrafiltration und Gelfiltration in eine SDS-PAGE eingesetzt, aus dem Gel ausgeschnitten und einer Elektroelution unterzogen. Die nichtfixierende Färbung des Gels zur Identifizierung der richtigen Proteinbande stellte sich dabei als Problem heraus, denn durch diesen Schritt ging viel Protein durch Diffusion verloren wie man am vorgefärbten Marker, der auch aufgetragen war, verfolgen konnte. Da bei diesem Verfahren die Verluste so groß waren, dass nicht einmal genug Laccase für eine Silberfärbung nach der SDS-PAGE übrig blieben, wurde L (70) für die Aminosäuresequenzierung auf PVDF-Membran geblottet und direkt aus dem Ponceau-Rot gefärbten Blot ausgeschnitten (s. 3.7).

### 3.6.6 Zusammenfassung des Aufreinigungserfolges

Die 55 kDa große Laccase aus dem Zellextrakt (L Z (55)) wurde durch Gelfiltration und Kationenaustauschchromatographie aufgereinigt, wie durch Auftrennung in einer SDS-PAGE dokumentiert wurde. Eine partielle Aufreinigung gelang für die zellassozierte Laccase L (55), L (55) und L (70) aus dem Kulturüberstand. Die intrazelluläre Laccase L (85) konnte nach der Gelfiltration nicht weiter aufgereinigt werden, da keine Bindung an eine der Ionenaustauschersäulen erfolgte und sich eine präparative SDS-PAGE aus einem Zellextrakt aufgrund der Vielzahl der enthaltenen Proteine nicht anbietet. Dass sich L (55) aus Kulturüberstand und aus Zellextrakt gleichermaßen über Kationenaustauschchromatographie reinigen ließen, ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich jeweils um das gleiche Enzym handelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.18 noch einmal zusammen gefasst.

**Tab. 3.18: Überblick über den Aufreinigungserfolg für die einzelnen Laccasen aus *H. acidophila*.** L Z (55) = 55 kDa große Laccase aus dem Zellextrakt; L Ü (55) = 55 kDa große Laccase aus dem Kulturüberstand; L A (55) = 55 kDa große von den Zellen abgelöste Laccase; L Ü (70) = 70 kDa große Laccase aus dem Kulturüberstand; L Z (85) = 85 kDa große Laccase aus dem Zellextrakt; L Ü (65) = 65 kDa große Laccase aus dem Kulturüberstand.

Laccase	Aufreinigungsstatus	Reinigungsmethoden
L Z (55)	Homogen aufgereinigt	Zellaufschluss; Gelfiltration; Kationenaustauschchromatographie
L Ü (55)	Partiell aufgereinigt	Ultrafiltration, Kationenaustauschchromatographie
L A (55)	Von den Zellen isoliert	Waschen lyophilisierter Hefen;
L Ü (70)	Partiell aufgereinigt	Ultrafiltration; Gelfiltration; Präparative SDS-PAGE/ Ausschneiden aus dem Western-Blot
L Z (85)	Keine Reinigung aus dem Zellextrakt	Zellaufschluss

### 3.7 Aminosäuresequenzen

In einer zu der vorliegenden Dissertation parallel angefertigten Arbeit waren zwei der wahrscheinlich vier Laccasegene aus *H. acidophila* vollständig beschrieben worden. Um zu klären, welche Laccasen den Genen zugeordnet werden können, wurde eine Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen mittels Edman Abbau durchgeführt. Dazu wurden die 70 kDa große Laccase aus dem Kulturüberstand und die 55 kDa große Laccase aus dem

Zellextrakt verwendet. Für die 55 kDa große Bande wurde die aufgereinigte Fraktion aus der Kationenaustauschchromatographie (Abb. 3.28) geblottet, die Bande ausgeschnitten und eingesandt. Für L (70) stand nur die partiell aufgereinigte Probe aus dem Kulturüberstand (Abb. 3.23) zur Verfügung. Da die präparative Elektrophorese häufig für die Reinigung von Laccasen genutzt wird und das Prinzip beim Ausschneiden nach Molekulargewicht aus dem Blot das gleiche ist, war eine erfolgreiche Ansequenzierung auch für die partiell aufgereinigte Probe nicht unwahrscheinlich. Die beiden Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und mit Ponceau-Färbelösung angefärbt. Dadurch waren die Banden deutlich zu erkennen und konnten ausgeschnitten werden. Diese Proben wurden zur Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuresequenz eingesandt. Die resultierenden Sequenzen sind in Abb. 3.31 dargestellt. In beiden Proben kam es zu einer Überlagerung von Proteinsignalen. Die ausgeschnittenen Proteine zeigten also eine Kontamination mindestens eines weiteren Proteins. Bei L (55) war die Kontamination nicht stark, so dass die wahrscheinliche Sequenz aus den jeweils deutlicheren Signalen abgeleitet werden konnte. Die wahrscheinlichen Sequenzen von L (70) wurden analog abgeleitet, obwohl die Proteinkonzentrationen hier sehr gering waren und die resultierende wahrscheinliche Sequenz deshalb nicht so eindeutig ist wie bei L (55). Die abgeleitete Sequenz für L (70) war ELGSALAI SY und für L (55) KKKPSTSSYP. In der Auswertung wurden die ermittelten N-terminalen Aminosäuresequenzen mit den aus den Gensequenzen annotierten Aminosäuresequenzen (Tetsch, 2005) verglichen (s. 4.6).

L (70): [EA] [LTGIFKAV] [GSAYDN] [STDNQGY] [ANYVLS] [LIVS] [AMSP] [IFLRS] [SI] [YS]

L (55): [KV] [KV] [KF] P S T S [SKL] Y P

**Abb. 3.31: Aminosäuresequenzen von L (55) aus dem Zellextrakt und L (70) aus dem Kulturüberstand.** Es wurden jeweils die ersten 10 N-terminalen Aminosäuren bestimmt. Die in Klammern stehenden Aminosäuren stehen für sich überlagernde Signale. Für die Sequenzvergleiche wurde jeweils das deutlichste Signal als wahrscheinlichste Sequenz angenommen. Bei L (70) war die Konzentration der einzelnen Signale relativ gering, was die Auswertung erschwerte. Als wahrscheinliche Aminosäuresequenzen wurden für **L (70) ELGSALAI SY** abgeleitet und für **L (55) KKKPSTSSYP**.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte die Existenz von mindestens drei extra- und intrazellulären Laccasen in *Hortaea acidophila* nachgewiesen werden. Damit ist dies der erste Nachweis einer intrazellulären Laccase in einem Ascomyceten. Für alle Laccasen konnten mit 3,5 bzw. 3,8 niedrige isoelektrische Punkte nachgewiesen werden. Die untersuchten Laccasen waren über einen breiten pH-Bereich (pH 2-7) stabil. Außerdem konnten niedrige pH-Optima mit ABTS als Substrat und mit phenolischen Substraten wie DMOP und Guajacol nachgewiesen werden. Besonders die intrazelluläre Laccase erwies sich mit einem pH-Optimum von 1,5 (DMOP) als außergewöhnlich. Diese Ergebnisse bestätigten den aufgrund der Acidophilie von *H. acidophila* angenommenen sauren Charakter der Enzyme, was die Möglichkeit einer biotechnologischen Nutzbarkeit unterstreicht. Eine der Laccasen wurde homogen, eine weitere partiell aufgereinigt. Dadurch wurde die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen ermöglicht, was einen Vergleich mit den in einer parallel erstellten Dissertation identifizierten Laccasegenen erlaubte, was unter anderem die Grundlage für eine Überexpression und damit ausreichende Produktion der Laccasen darstellt.

### 4.1 Nachweis und Lokalisation der *H. acidophila* Laccasen

Die grundlegende Hypothese zu der vorliegenden Arbeit war die Annahme, dass *H. acidophila* mindestens eine Laccase bildet. Dies war aufgrund der nachgewiesenen Oxidaseaktivität und der starken Pigmentierung der Zellen wahrscheinlich. Denn um den letzten Schritt der Melaninsynthese, die Polymerisation der DHN-Monomere, zu katalysieren, wird ein oxidatives Enzym benötigt (Butler & Day, 1998). Für diese Katalyse kommen neben Laccasen auch Tyrosinasen, Peroxidasen und Katalasen in Frage. In Vorversuchen wurde deshalb zunächst die Frage geklärt, ob es sich bei dem in *H. acidophila* nachgewiesenen oxidativen Enzym um eine Laccase handelte. Des Weiteren wurde mit Hilfe von Aktivitätstests in der SDS-PAGE und Immunhybridisierung die Anzahl und Lokalisation der Laccasen aus *H. acidophila* untersucht.

#### 4.1.1 Einordnung des oxidativen Enzyms und Nachweis einer Laccaseaktivität

Durch Versuche zum Substratspektrum, zum terminalen Elektronenakzeptor und zur Kupferabhängigkeit des Enzyms konnte gezeigt werden, dass es sich bei den oxidativen

Enzymen aus dem *H. acidophila* Kulturüberstand bzw. Zellextrakt mit großer Wahrscheinlichkeit um Laccasen handelt (s. 3.1).

Bei Versuchen zum Substratspektrum wurde festgestellt, dass die Substrate ABTS, DMOP, Ascorbinsäure, DHN und DAN umgesetzt wurden, wenn konzentrierter Kulturüberstand bzw. Zellextrakt als Probe eingesetzt wurde. Eine Oxidation von Tyrosin, L-Dopa und Syringaldazin konnte dagegen für keins der oxidativen Enzyme nachgewiesen werden (Tab. 3.7). Die Möglichkeit des Vorliegens einer Tyrosinase konnte hiernach ausgeschlossen werden. Da in den Versuchsansätzen zur Bestimmung des Substratumsatzes mit der Sauerstoffelektrode kein  $\text{H}_2\text{O}_2$  zugesetzt worden war und die Hefe sehr wahrscheinlich nicht selbst zur Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  befähigt ist, kann die Möglichkeit des Vorhandenseins einer Peroxidase weitgehend ausgeschlossen werden. Peroxidasen benötigen Wasserstoffperoxid als terminalen Elektronenakzeptor und sind in Ascomyceten nur selten beschrieben. Weiterhin ist in ascomycetischen Pilzen im Gegensatz zu Basidiomyceten in der Regel kein wasserstoffperoxidbildendes System wie z.B. eine Glukoseoxidase vorhanden (Bell & Wheeler, 1986). Auch wenn *H. acidophila* Wasserstoffperoxid gebildet hätte, wäre dieses bei der Aufbereitung der Proben durch Ultrafiltration entfernt worden. Außerdem wurde bei den verwerteten Substraten durch die Tests an der Sauerstoffelektrode ein Sauerstoffverbrauch nachgewiesen (Tab. 3.7). Sauerstoff kann von Peroxidasen aber nicht als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden. Die Nutzung von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor durch das Enzym ist ein eindeutiger Hinweis auf das Vorliegen einer Laccase.

Da es durch eine Steigerung der Kupferkonzentration im Medium auf 250  $\mu\text{M}$  Kupfersulfat zu einem deutlichen Anstieg der Oxidaseaktivität kam, ohne dass vermehrt Zellmasse gebildet wurde (Abb. 3.9), konnte eine Kupferabhängigkeit des Enzyms gefolgert werden. Die These, dass es sich bei der Oxidase um eine Laccase handelte, konnte durch die Kupferabhängigkeit weiter gestärkt werden. Nur bei einer Tyrosinase hätte man auch eine Kupferabhängigkeit erwartet. Dieses Substrat wurde aber wie gezeigt nicht von den oxidativen Enzymen umgesetzt.

#### **4.1.2 Lokalisation der Laccasen**

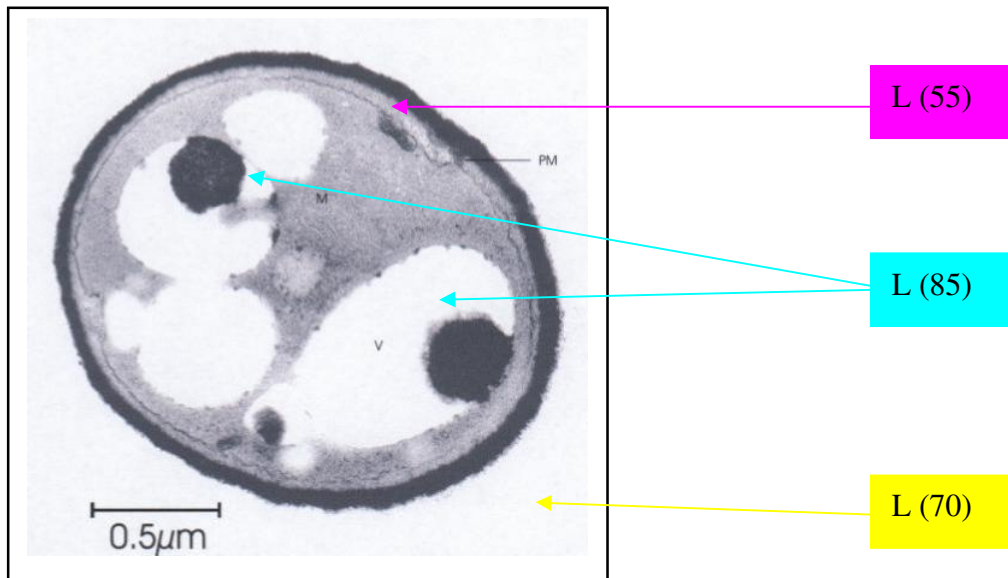
Da sich neben Laccaseaktivitäten im Kulturüberstand auch eine zellassoziierte Laccaseaktivität und später auch eine Aktivität im Zellextrakt zeigten, wurde die Lokalisation

der Laccasen von *H. acidophila* genauer untersucht. Die Tatsache, dass auch im Zellextrakt eine Laccaseaktivität nachweisbar war, war insofern interessant, da Laccasen in der Regel extrazelluläre Enzyme sind, die meistens ins umgebende Medium abgeschieden werden (Thurston, 1994). Nur wenige intrazelluläre Laccasen wurden bislang beschrieben (Leitner *et al.* 2002, Schlosser *et al.*, 1997, Nagai *et al.*, 2003) und auch hier ist über die subzelluläre Lokalisation der Laccasen noch wenig bekannt (Mayer & Staples, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Aktivitätstest im SDS-Gel und Immunhybridisierung mit laccasespezifischen Antikörpern mehrere Laccasen aus *H. acidophila* nachgewiesen (Abb. 3.14; Abb. 3.17). Insgesamt kann auf Grundlage dieser Ergebnisse das Vorliegen von mindestens drei Laccasen postuliert werden (s. 4.4.1). In Abb. 4.1 wird die wahrscheinliche Lokalisation dieser Laccasen verdeutlicht.

- **L (85)** ist eine intrazelluläre Laccase, die im Zellextrakt in aktiver Form bei 170 kDa nachgewiesen wurde (Abb. 3.14) und wahrscheinlich als Dimer vorliegt, da unter reduzierenden Bedingungen eine 85 kDa große Laccasebande gefunden wurde (Abb. 3.17).
- **L (70)** ist eine extrazelluläre Laccase, die sowohl in Zellextrakt als auch im Kulturüberstand von *H. acidophila* nachgewiesen wurde (Abb. 3.17), aber nur im Kulturüberstand Laccaseaktivität zeigte (Abb. 3.14). L (70) liegt aktiv wahrscheinlich als Dimer vor (140 kDa). Eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen lieferte eine 70 kDa große Laccasebande, möglicherweise das Monomer.
- **L (55)** ist eine Laccase, die sowohl in Kulturüberstand als auch im Zellextrakt gering konzentriert in aktiver Form vorgefunden wurde. Darüber hinaus konnte L (55) von lyophilisierten *H. acidophila* -Zellen abgewaschen werden (Abb. 3.3), weshalb es sich bei L (55) wahrscheinlich um die zellassoziierte Laccaseaktivität handelt, die auch im Laccasetest mit ganzen Zellen nachgewiesen wird. Im Kulturüberstand zeigte sich eine 110kDa große Lacasebande im Aktivitätstest, bei der es sich möglicherweise um ein Dimer von L (55) handelt. Unter reduzierenden Bedingungen wurden jeweils 55 kDa große Proteinbanden, möglicherweise die Monomere, nachgewiesen.

Außerdem wurde in Western-Blots nach Immunhybridisierung unter nicht reduzierenden Bedingungen in einigen Proben aus dem Kulturüberstand von *H. acidophila* eine Bande bei 130 kDa angefärbt. Dabei könnte es sich um eine vierte Laccase handeln.



**Abb: 4.1: Übersicht über die hypothetische Lokalisation der Laccasen aus *H. acidophila*.** Dargestellt ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnittes einer *H. acidophila* Zelle. V = Vesikel mit osmiophilem Material (wahrscheinlich Melanin); PM = Plasmamembran mit aufgelagerter osmiophiler Schicht (wahrscheinlich Melanin). L (55) ist höchst wahrscheinlich zellwandassoziiert und könnte sich zwischen Plasmamembran und Melaninschicht befinden; L (70) wird ins Medium sezerniert und L (85) liegt möglicherweise in melanosomen-ähnlichen Vesikeln, dem Ort der Melaninsynthese in *H. acidophila*, vor. Die osmiophilen Bereiche werden bei nah verwandten Gattungen wie *Cladosporium* oder *Aureobasidium* als Melanin interpretiert. Der Zellaufbau ist in diesen Organismen ähnlich (Sanchez-Mirt *et al.*, 1997; San-Blas, 1996).

### Mögliche Lokalisation von L (85)

L (85) wurde im Zellextrakt nachgewiesen und liegt demnach intrazellulär vor. Für die *H. acidophila* Laccasen wurde eine Beteiligung an der Melaninsynthese gezeigt (Abb 3.20), da bei unterdrückter Oxidation keine Melaninbildung stattfand. Wie die Melaninsynthese in *H. acidophila* genau abläuft und wo die einzelnen Stufen lokalisiert sind, ist jedoch noch nicht bekannt. In *H. werneckii*, *A. pullulans* und *C. carrionii*, die wie *H. acidophila* zur Ordnung der Dothideales gehören, wurde die Melaninsynthese genauer untersucht. So wurden in den Pilzen 180-450 nm große Zellkompartimente entdeckt, die osmiophiles Material enthielten. Das osmiophile Material wurde als Melanin identifiziert und die Zellkompartimente im Folgenden als melanosomen-ähnliche Vesikel bezeichnet. Es wurde weiterhin postuliert, dass das Melanin als Granula in diesen melanosomen-ähnlichen Vesikeln synthetisiert und anschließend zur Zellwand weitertransportiert wird (Sanchez-Mirt *et al.*, 1997; San-Blas, 1996; Butler & Day, 1998; Mittag, 1993). Auch in *H. acidophila* wurden Zellkompartimente mit osmiophilen Partikeln beschrieben (Abb. 4.1), bei denen es sich um melanosomen-ähnliche Vesikel handeln könnte (Hölker *et al.*, 2004). Unter der Voraussetzung dass in diesen Zellkompartimenten die Melaninsynthese stattfindet, muss dort auch eine Laccase

lokalisiert sein. Demnach kann als wahrscheinlicher Wirkort der intrazellulären Laccase L (85) von *H. acidophila* das melanosomen-ähnliche Vesikel postuliert werden. Diese These wird durch das niedrige pH-Optimum der Laccase L (85) gestützt. Denn in den melanosomen-ähnlichen Vesikeln kann im Gegensatz zum Cytosol der pH-Wert auf einem niedrigen Niveau gehalten werden, so dass die Laccase an ihrem pH-Optimum arbeiten könnte. Das Vorliegen eines aciden Milieus begünstigt darüber hinaus die Melaninsynthese (Butler & Day, 1998; Sharma *et al.*, 2002). Deshalb ist es sehr wahrscheinlich, dass in den melanosomen-ähnlichen Vesikeln ein saurer pH-Wert vorherrscht. So könnte dann auch die Anpassung der intrazellulären Laccase von *H. acidophila* an saure Bedingungen erklärt werden. Einen weiteren Hinweis gibt die für den Zellaufschluss verwendete Methode: Durch den Einsatz von detergenzienhaltigem Puffer (TSN) wurde im Vergleich zu einfachem McIlvaine Puffer eine deutlich höhere Laccaseausbeute erzielt (Tab. 3.6). Die Detergenzien aus dem Aufschlusspuffer könnten die Lyse der melanosomen-ähnlichen Vesikel verstärkt haben. Innerhalb dieser Arbeit gab es leider keine Möglichkeit die These über die Lokalisation der intrazellulären Laccase in den melanosomen-ähnlichen Vesikeln weiter zu verifizieren. Beim Zellaufschluss, der nur unter sehr extremem mechanischem Stress möglich war, wurden Zellkompartimente wie auch die melanosomen-ähnlichen Vesikel zerstört, so dass eine Isolierung dieser Kompartimente mit nachfolgendem Laccasenachweis nicht möglich war. Für die Zukunft bietet es sich an, den Nachweis der Lokalisation über ein GFP-Fusionsprotein zu führen. Die Grundlage dafür wurde in der vorliegenden Arbeit geschaffen, da L (85) einer seit kurzem bekannten Gensequenz (Tetsch, 2005) zugeordnet werden konnte (s. 4.6).

Über intrazelluläre Laccasen und deren Lokalisation in der Zelle wurde bislang sehr wenig veröffentlicht, so dass aus den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen hierzu nichts abgeleitet werden kann. In verschiedenen Basidiomyceten, z.B. in *Trametes versicolor* (Schlosser *et al.*, 1997) und *Lentinula edodes* (Nagai *et al.*, 2003) wurden bisher intrazelluläre Laccasen beschrieben. Zur Lokalisation in der Zelle wurde aber wenig ausgesagt. Bei *Lentinula* und *Cochliobolus* wurde der Wirkort im Cytosol vermutet; ein aktives Enzym konnte aber nicht nachgewiesen werden (Nagai *et al.*, 2003). Generell ist das Vorhandensein einer aktiven Laccase im Cytosol eher unwahrscheinlich, da ein effektiver Schutz der Zelle vor der relativ unspezifischen Fähigkeit der Laccasen zur Oxidation gegeben sein müsste. Für *H. acidophila* kann das Cytosol als Wirkort der Laccase ausgeschlossen werden, da die Laccasen aus dem Zellextrakt sowohl einen niedrigen pI als auch ein sehr niedriges pH-Optimum aufweisen. Im Cytosol sind die Bedingungen, an die diese Enzyme offenbar angepasst sind, nicht gegeben.



Die Lokalisation von intrazellulären Laccasen in melanosomen-ähnlichen Vesikeln ist möglicherweise auf die Ordnung Dothideales beschränkt und kann nicht ohne weiteres auf andere Ordnungen übertragen werden. In dem Ascomyceten *G. graminis* wurde beispielsweise gezeigt, dass keine melanin- und laccasehaltigen Vesikel in der Nähe der Zellmembran vorlagen, weshalb eine in Vesikeln lokalisierte Melaninsynthese für diesen Pilz ausgeschlossen wurde (Edens *et al.*, 1999; Caesar-Tonthat, 1995). Außerdem sind melanosomen-ähnliche Vesikel wie erwähnt ein typisches Kennzeichen für Mitglieder der Dothideales (Hölker *et al.*, 2004). In Ascomyceten wurde bislang noch keine intrazelluläre Laccase beschrieben. Nur in einem Review war ein Hinweis auf die mögliche Existenz einer intrazellulären Laccase in *Botrytis cinerea* enthalten (Mayer & Staples, 2002); Daten hierzu wurden aber nicht veröffentlicht.

### **Mögliche Lokalisation von L (70)**

Die Laccase L (70) wurde im Aktivitätstest im Kulturüberstand nachgewiesen. Die extrazelluläre Lokalisation frei im Medium ist typisch für Laccasen (Thurston, 1994). Im Zellextrakt wurde eine inaktive Form von L (70) gefunden (Abb. 3.17), was darauf hindeutet, dass die Laccase erst, wenn sie an ihrem Wirkort außerhalb der Zelle angekommen ist, aktiviert wird.

### **Mögliche Lokalisation von L (55)**

Bei L (55) handelt es sich wahrscheinlich um eine zellwandassoziierte Laccase. L (55) konnte von lyophilisierten Zellen abgewaschen werden und wurde sowohl im Kulturüberstand als auch im Zellextrakt nachgewiesen. Außerdem ist die zellassoziierte Laccaseaktivität, die im Laccasetest mit ganzen Zellen gemessen wurde, wahrscheinlich darauf zurückzuführen. Die Laccaseaktivität, die mit den Zellen im Test gemessen wurde, entspricht aber nicht der Laccaseaktivität im Zellextrakt. Denn auch bei Zellen ohne zellassoziierte Laccaseaktivität (nach Lagerung in lyophilisierter Form) ergab sich nach Zellaufschluss im Zellextrakt die typische Laccaseaktivität. Sinnvoll wäre eine Lokalisation von L (55) zwischen Zellwand und Melaninauflagerung von *H. acidophila*. Da die Laccaseaktivität nach dem Waschen der lyophilisierten Zellen sehr gering, die mit den Zellen gemessene Laccaseaktivität aber sehr hoch war, verblieb wahrscheinlich ein Großteil der Laccase auch nach dem Waschen an den Zellen. Da verschiedene Versuche zum Ablösen der Laccasen nicht erfolgreich waren (s. 3.3), ist es wahrscheinlich, dass die Laccase fest mit der Melaninschicht der Zellwand assoziiert ist. Für Melanin oder Lignin ist bekannt, dass Proteine in die Polymergerüste eingelagert werden

(Butler & Day, 1998). Und auch melaninhaltige Enzyme, die sogar ihre Aktivität verloren, wenn man den Melaninanteil entfernte, wurden beschrieben (Sharma *et al.*, 2002). Eine feste Assoziation von Proteinen mit Melanin ist also nicht ungewöhnlich. Da der letzte Schritt der Melaninsynthese eine radikalische Reaktion und damit nicht zielgerichtet ist, ist ein zufälliger Einbau von L (55) ebenfalls denkbar. Eine solche Assoziation der Laccasen mit dem Melanin würde ein nachträgliches Ablösen der Enzyme praktisch unmöglich machen, es sei denn, man würde das Melanin aufschließen. Da dies aber nur unter sehr harschen Bedingungen wie Kochen in alkalischen Lösungen möglich ist, wäre diese Methode kaum geeignet, um aktive Enzyme zu regenerieren. Die Laccase, die durch das Waschen abgelöst werden konnte bzw. die im Zellextrakt vorliegende Aktivität, könnte eine kleine Menge freien Enzyms darstellen. Die Funktion einer Laccase, die sich zwischen Plasmamembran und Melaninauflagerung befindet, könnte darin bestehen, die Melaningranula, die über die melanosomen-ähnlichen Vesikel ausgeschleust wurden, zu einer planen Melaninschicht zu verbinden. Ob die Laccasen bei 55/ 110 kDa aus Kulturüberstand, Zellextrakt und Waschrückstand der lyophilisierten Zellen wirklich identisch sind, könnte nur ein Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen zeigen. Leider stand nur von der aufgereinigten Laccase aus dem Zellextrakt ausreichend Material für eine Sequenzierung zur Verfügung.

## **4.2 Optimierung der Kulturbedingungen**

Da die ursprünglich genutzten Wachstumsbedingungen eine zweiwöchige Inkubationszeit (Abb. 3.11 A) und vor allem suboptimale Laccaseausbeuten bedingten, wurde zunächst Wert auf eine Optimierung der Wachstumsbedingungen im Hinblick auf die optimalen Laccaseaktivitäten gelegt. Dazu wurden verschiedene Wachstumsparameter (Kohlenstoff-, Stickstoff-Quelle, Schüttelfrequenz, pH-Wert, Wachstumstemperatur, Induktion) variiert und in Bezug zur Laccaseaktivität gesetzt. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war, dass es verschiedene Laccasen in *H. acidophila* gibt, wurden die Kulturbedingungen in Bezug auf die extrazelluläre Laccaseaktivität im Kulturüberstand optimiert.

### **Verkürzung der Fermentationszeit**

Durch Änderung der Wachstumsbedingungen von 20 auf 25 °C (Abb. 3.6), 120 auf 150 rpm Schüttelfrequenz (Abb. 3.7), Austausch von Glukose durch Sorbitol (Abb. 3.8) und unter Beibehaltung eines pH-Wertes von 3,5 und der komplexen Stickstoffquelle Trypton konnte die Generationszeit deutlich reduziert werden. Statt der 12-14 Tage unter nicht optimierten

Bedingungen benötigte *H. acidophila* unter den beschriebenen Optimalbedingungen nur 5 Tage bis zur stationären Phase (Abb. 3.11 B). Die Wachstumsrate wurde also verdoppelt. Die Ernte konnte nun nach 4-5 Tagen erfolgen. Insbesondere wurde die Lag-Phase deutlich verkürzt, was wahrscheinlich auf den Einsatz der für alle Optimierungsversuche eingeführten Vorkulturen zurückzuführen ist. Die Temperaturerhöhung dürfte ebenfalls eine sehr wichtige Rolle für die Verbesserung des Wachstums gespielt haben.

### **Steigerung der Laccaseausbeute**

Vor allem durch Kupferinduktion konnten die Laccaseaktivitäten deutlich gesteigert werden (s. 4.2.5). Die mit den Zellen assoziierten extrazellulären Laccaseaktivitäten wurden um den Faktor 70, die Laccaseaktivität im Kulturüberstand wurde um den Faktor 6 gesteigert. Auch durch Sorbitol als C-Quelle und durch Erhöhung der Schüttelfrequenz auf 150 rpm und Erhöhung der Inkubationstemperatur von 20 auf 25 °C kam es jeweils zu einer Steigerung um fast das Doppelte der Enzymausbeuten, wobei die Steigerung in diesen Fällen wahrscheinlich auf verbessertes Wachstum zurückzuführen ist, da auch die Biomasseproduktion angekurbelt wurde.

#### **4.2.1 pH-Wert**

Die Untersuchungen zum optimalen pH-Wert der *H. acidophila*-Kulturen bestätigten den pH-Wert, der bereits zur Anzucht verwendet wurde. Zwischen pH 3 und 4 war die extrazelluläre Laccaseaktivität am höchsten. Der Melaningehalt des Kulturmediums war bei höheren pH-Werten ebenfalls erhöht. Letzteres ist erklärbar durch die schlechte Löslichkeit des Melanins bei niedrigen pH-Werten (Butler & Day, 1998). Im Kulturüberstand oxidierte Melaninbausteine könnten im Sauren als Melanin ausgefallen und durch die den Enzymtests vorangegangenen Zentrifugation mit den Zellen aus den Proben entfernt worden sein. Da es sich bei *H. acidophila* um einen acidophilen Mikroorganismus handelt, entsprach das Versuchsergebnis den Erwartungen.

#### **4.2.2 Stickstoffquelle**

Wurde *H. acidophila* in definiertem Medium kultiviert, kam es in keinem der Fälle zu einem ausreichenden Wachstum. Auch die Laccaseaktivitäten waren entsprechend gering (s. 3.4.4). Weiterhin war die aus dem Kulturüberstand gewonnene Laccase weit weniger stabil als die aus der Standardanzucht stammende. Beim Lyophilisat des Kulturüberstandes kam es schon nach wenigen Tagen zum vollständigen Aktivitätsverlust (s. 3.5.3). Allerdings konnte gezeigt

werden, dass deutlich weniger Melanin ins Medium abgegeben wurde, was typisch für definierte Medien ist (Butler & Day, 1998). Das Fehlen extrazellulären Melanins kann ein Grund für das schlechte Wachstum von *H. acidophila* auf definierten Medien sein, denn es erfolgt keine Bindung des Kupfers aus dem Medium, was einerseits zu einem Toxizitätsproblem oder andererseits zu einem Mangel an Mikronährstoffen führen kann. Eine den Siderophoren ähnliche Funktion wurde für extrazelluläres Melanin diskutiert (Gadd & de Rome, 1988). Die fehlende Enzymstabilität bei gleichzeitig fehlendem Melaninanteil könnte auf eine das Enzym stabilisierende Wirkung des Melanins hindeuten. Die Schutzfunktion für Zellen ist ja hinreichend bekannt: Melanin bindet verschiedene Schadstoffe und Ionen und wirkt schützend gegenüber lytischen Enzymen (Butler & Day, 1998). Auch für die Enzyme könnte sich daraus ein Schutz ergeben. Für den praktischen Einsatz in Labor oder Industrie (als Proteinschutz) dürfte Melanin aber ungeeignet sein, da sich gezeigt hatte, dass Melanin schlecht zu handhaben ist und verschiedene Methoden stört (s. 3.6.1.1). Aufgrund der geringen Laccaseausbeute und der noch geringeren Stabilität der gewonnenen Laccasen, wurde die Anzucht von *H. acidophila* in definiertem Medium nicht weiter verfolgt.

#### **4.2.3 Kohlenstoffquelle**

Die Bildung von Laccasen bei Pilzen ist abhängig von der Art und Konzentration der eingesetzten Kohlenstoffquelle. Bei der Variation der Kohlenstoffquelle im Anzuchtsmedium von *H. acidophila* stellte sich heraus, dass sich die Laccaseaktivität im Kulturüberstand durch den Austausch von Glukose durch den Zuckeralkohol Sorbitol fast um das doppelte steigern ließ (Abb. 3.9). Diese Tatsache erscheint auf den ersten Blick ungewöhnlich. Aber auch Galhaup & Haltrich (2001) berichten von einer Steigerung der extrazellulären Laccaseaktivität (bei *Trametes pubescens*) erst nachdem die Glukose aus dem Medium vollständig verbraucht war. In einem Medium mit Fruktose als Kohlenstoffquelle hingegen wurde die Laccasesekretion wesentlich früher detektiert. Dies könnte für eine indirekte Reprimierung der Laccasesynthese oder des Laccasetransports durch Glukose sprechen. In diesem Fall könnte der biologische Sinn der Laccase die Erschließung weiterer Kohlenstoffquellen sein, wenn das bevorzugte Substrat Glukose nicht vorhanden ist (s. 4.8). Es gibt weitere Veröffentlichungen, z.B. eine Untersuchung der Laccase aus *Botryosphaeria* sp., in denen mit Glukose eindeutig die höchsten Laccaseaktivitäten erreicht wurden (da Cunha *et al.*, 2003). Allerdings wurde Sorbitol in dieser Versuchsreihe nicht als Kohlenstoffquelle getestet.

#### 4.2.4 Schüttelfrequenz

Auch die Erhöhung der Schüttelfrequenz hatte einen deutlichen Einfluss auf Wachstum und Laccaseaktivität. Es ist davon auszugehen, dass die Erhöhung der Schüttelfrequenz einen verstärkten Sauerstoffeintrag ins Medium zur Folge hatte, was das bessere Wachstum von *H. acidophila* bedingte. Dies macht außerdem deutlich, dass es sich bei *H. acidophila* um einen obligat aeroben Mikroorganismus handelt. In ungeschüttelten Kulturen wuchs die Hefe generell nicht oder nur sehr langsam (nicht gezeigt). Der Abfall des Wachstums bei höheren Schüttelfrequenzen kann durch verstärkte Scherkräfte erklärt werden. Die optimale Schüttelfrequenz war also mit 150 rpm die, bei der die maximale Menge Sauerstoff im Medium gelöst war und die Scherkräfte das Zellwachstum noch nicht beeinträchtigten.

#### 4.2.5 Kupferinduktion

Die zellassoziierte Laccaseaktivität konnte durch Erhöhen der Kupferkonzentration auf 100µM um den Faktor 70 gesteigert werden, die Laccaseaktivität im Kulturüberstand immerhin um den Faktor 6. Das ist nicht ungewöhnlich, denn Kupfer ist als Laccaseinduktor bei verschiedenen Pilzen bekannt (Collins & Dobson, 1997; Chen *et al.*, 2003; Galhaup & Haltrich, 2001; Litvintseva & Henson, 2002). Die Induktion wurde hier auf Ebene der Transkription nachgewiesen. Bei *H. acidophila* ergaben sich zwischen 100 und 500 µM Kupfer keine signifikanten Unterschiede in den Laccaseaktivitäten. Deshalb wurde später standardmäßig mit 250 µM Kupfer gearbeitet. In der Literatur finden sich ähnliche Konzentrationen: Chen *et al.* (2003) verwendeten 200 µM Kupfersulfat, Litvintseva & Henson (2002) 400 µM Kupfersulfat zur Laccaseinduktion.

Kupfer ist außerdem essentiell für die katalytische Aktivität von Laccasen, da das Kupfer im aktiven Zentrum des Enzyms maßgeblich für die Weiterleitung der Elektronen aus der Oxidationsreaktion sorgt. Ohne das Vorhandensein von Kupfer im Medium dürfte also keine aktive Laccase gebildet werden und *H. acidophila* könnte nicht wachsen. Nach Galhaup & Haltrich (2001) werden im Allgemeinen 1-10 µM hohe Kupferkonzentrationen für das Pilzwachstum benötigt. In den Versuchen ohne Zusatz von Kupfer kam es jedoch bei *H. acidophila* auch zu einem Wachstum, wenngleich die gemessenen Laccaseaktivitäten sehr gering waren (Abb. 3.9). Dass *H. acidophila* auch ohne den Zusatz von Kupfer zum Anzuchtsmedium wachsen konnte, erklärt sich durch einen Eintrag von Kupfer durch den komplexen Medienbestandteil Trypton. Durch Atomabsorptionsspektroskopie wurde nachgewiesen, dass Trypton und demzufolge auch das Anzuchtsmedium einen geringen Anteil an Kupfer (8 µM) enthielt, der für das Wachstum ausreichte.

Wachstum von *H. acidophila* erfolgte auch noch bei Kupfersulfat-Konzentrationen bis zu 5mM. Wurde einer dicht angewachsenen Kultur 10 mM Kupfersulfat zugefügt, erfolgte sogar noch weiteres Wachstum. Dieses Phänomen ist einerseits zu erklären durch die geringere Toxizität von Kupfer bei niedrigen pH-Werten, was nach Gadd (1993) durch eine Konkurrenz der Protonen mit den Kupferionen bedingt ist. Andererseits stellt die melaninhaltige Zellwand von Pilzen durch Adsorption von Schwermetallionen einen Schutz dar. Dies wurde u.a. für die Pilze *A. pullulans* und *C. carrionii*, die wie *H. acidophila* zur Ordnung der Dothideales zählen, gezeigt (Gadd & de Rome, 1988). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Atomabsorptionsspektroskopie nachgewiesen werden, dass ein Drittel des im Medium zur Verfügung gestellten Kupfergehaltes nach der Inkubation aus dem Medium entfernt war und in den Zelltrümmern vorlag (s. 3.4.7).

Bei welchen der untersuchten Laccasen es sich um konstitutiv gebildete oder induzierbare Laccasen handelt, kann nicht mit Sicherheit ausgesagt werden. Es gibt aber Hinweise darauf, dass zumindest ein Teil der intrazellulären Laccase (L 85) konstitutiv gebildet wird, denn auch nach Anzucht ohne Zusatz von Kupfer konnte eine geringe Laccaseaktivität im Zellextrakt nachgewiesen werden (s. 3.3.3.4). Außerdem kam es auch bei geringen Kupferkonzentrationen im Medium immer zur Melaninbildung. Da es sich bei der Melaninsynthese um eine radikalische Reaktion handelt, dürften schon geringe Mengen an Laccase reichen, um die Melanisierung hervorzurufen. Im Kulturüberstand konnte ohne Zusatz von Kupfer eine Laccaseaktivität nicht reproduzierbar nachgewiesen werden (Pracht, 2002). Durch Zusatz von Kupfersulfat zum Medium konnte aber in jedem Fall eine deutliche Steigerung der extrazellulären Laccaseaktivitäten erreicht werden. Deshalb kann man davon ausgehen, dass es sich bei den extrazellulären Laccasen um induzierbare Enzyme handelt. Es ist aber genauso gut möglich, dass alle Laccasen aus *H. acidophila* in geringen Mengen konstitutiv gebildet werden und zusätzlich durch Kupfer induziert werden können (Mayer, 1987). Insbesondere intrazelluläre Laccasen wurden als im Allgemeinen konstitutiv beschrieben (Mayer & Staples, 2002). Um die Induzierbarkeit der Laccasen zu bestätigen, müssten Untersuchungen auf RNA-Ebene durchgeführt werden, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht möglich war.

#### **4.2.6 Anzucht unter Zusatz von Ascorbinsäure**

*H. acidophila* Kulturen, die unter Zusatz von Ascorbinsäure zum Medium angezogen wurden, blieben im Gegensatz zur normal angezogenen Kultur bis zum Verbrauch der Ascorbinsäure ungefärbt (Abb. 3.20). Es war weder in den Zellen noch im Kulturüberstand Melanin

nachweisbar. Deshalb wurde dieser Ansatz zunächst als Erfolg versprechend für eine Trennung von Laccase(n) und Melanin angesehen. Allerdings stellte sich heraus, dass eine Induktion durch höhere Kupferkonzentrationen unter gleichzeitigem Zusatz von Ascorbinsäure nicht möglich war, da unter diesen Bedingungen kein Wachstum erfolgte. Dies bestätigte einerseits die Schutzwirkung des Melanins insbesondere auch als Schwermetallfänger, andererseits führte die Anzucht von *H. acidophila* mit Ascorbinsäure nicht zu einer effektiven Trennung von Melanin und Laccase(n), weil ohne die Kupferinduktion zu geringe Laccaseaktivitäten gebildet wurden. Dies konnte auch durch eine Optimierung der Anzucht und den daraus resultierenden Biomassezuwachs nicht maßgeblich verbessert werden. Auch eine Aufkonzentrierung des Mediums durch Ultrafiltration führte nicht zum Erfolg, da sofort eine Melaninbildung einsetzte, sobald die Ascorbinsäure aus der Probe entfernt wurde.

#### **4.2.7 Anzucht im Rieselfilmverfahren**

Da Pilze auf festen Oberflächen in der Regel besser wachsen als in Flüssigkultur und *H. acidophila* nah verwandte Arten wie *H. werneckii* für Wachstum bei geringen Wasseraktivitäten bekannt sind (Petrovic *et al.*, 2002), lag die Anzucht der Hefe auf einem festen Substrat nahe. Die so genannte Solid State Fermentation kann, zumindest bei Durchführung im Labormaßstab, den Vorteil höherer Produktionsraten und einer höheren Proteinendkonzentration bieten (Hölker *et al.* 2004). In diesem Versuch wurde *H. acidophila* auf einem inerten Träger (Polyurethan-Schaum) kultiviert. Die Erwartung war, dass *H. acidophila* sich auf diesem Träger vermehren und extrazelluläre Laccase bilden würde, die dann durch regelmäßige Waschungen in relativ konzentrierter Form gewonnen werden könnte. Das Trägermaterial erwies sich jedoch als ungeeignet, denn die Zellen wurden bei den Waschvorgängen sofort mit dem Waschmedium weggespült. Faktisch lag hier also wieder eine Submerskultur vor. Die Proteinkonzentrationen im Rieselmedium waren gegenüber vergleichbaren submers angezogenen Kulturen um den Faktor 4 erhöht und es wurden etwa doppelt so hohe Laccaseaktivitäten erreicht, was ggf. eine weitere Optimierung der Fermentation rechtfertigen würde. Da weitere Versuche aber sehr zeitaufwändig gewesen wären und dadurch auch nur die extrazellulären Laccasen von *H. acidophila* hätte gewonnen werden können, wurde der Versuchsansatz zur Anzucht in Solid State Fermentation innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

#### **4.2.8 Laccaseausbeute in vivo**

Obwohl die Laccaseaktivitäten von *H. acidophila* durch die Optimierung der Kulturbedingungen um das 70fache gesteigert werden konnten, waren die Aktivitäten mit maximal 70mU/ml unter optimierten Kulturbedingungen im Vergleich zu denen in anderen Pilzen gering. So bilden z.B. *Gaeumannomyces graminis* 100.000 mU/ml (Edens *et al.*, 1999) und *Agaricus bisporus* 5000 mU/ml (Ullrich *et al.*, 2005) im natürlichen System. Deshalb war es sinnvoll, für die Zukunft die Überexpression der Laccase(n) von *H. acidophila* anzustreben, da die unter natürlichen Bedingungen gebildeten Aktivitäten sowohl für die industrielle Anwendung als auch für eine weiter gehende Charakterisierung zu gering waren. Auch für Laccasen aus anderen Pilzen wurde diese Strategie bereits gewählt (z.B. *Myceliophthora*: Berka *et al.*, 1997, *Melanocarpus*: Kiiskinen *et al.* 2004). Berka *et al.*, (1997) postulierten, dass dieser Weg für die meisten pilzlichen Laccasen sinnvoll sei, da die unter natürlichen Bedingungen erzielten Laccaseaktivitäten für eine kommerzielle Nutzung nicht ausreichten. Eine Überexpression der Laccase(n) aus *H. acidophila* war im Rahmen dieser Arbeit unrealistisch, da noch zu wenige Informationen über die Hefe und die Laccasen zur Verfügung standen und der Mikroorganismus methodisch zunächst erschlossen werden musste. Deshalb wurde die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz(en) der Laccase als eines der Ziele angestrebt, wodurch die Zuordnung zu den in einer parallel durchgeführten Arbeit bestimmten Laccasegenen (Tetsch, 2005) möglich gemacht werden sollte. Die Ergebnisse aus beiden Arbeiten zusammengenommen sollten dann die Grundlage für eine Überexpression der Laccase(n) aus *H. acidophila* schaffen.

#### **4.3 Begleitaktivitäten im Kulturüberstand**

Um festzustellen, ob neben den Laccasen auch noch andere Enzyme in den *H. acidophila* Kulturüberstand sezerniert werden, wurde das Vorliegen einiger häufiger Enzymaktivitäten überprüft. Während unter den getesteten Bedingungen weder eine Protease noch eine Amylase nachgewiesen werden konnte, wurde eine geringe hydrolytische Aktivität im *H. acidophila* Kulturüberstand detektiert (s. 3.1). Das Vorhandensein von extrazellulären Hydrolasen ist nicht ungewöhnlich in Ascomyceten und ist schon mehrfach beschrieben worden (Hölker *et al.*, 2002, Kundu *et al.*, 1987). Nichtsdestotrotz kann nicht mit Bestimmtheit ausgeschlossen werden, dass es sich um eine aus den Zellen stammende Aktivität handelt, die aufgrund von Zellyse in den Kulturüberstand gelangte und es sich deshalb nicht um ein echtes extrazelluläres Enzym handelt.



#### 4.4 Charakterisierung der Laccasen

Die Versuche zur Charakterisierung der Laccasen wurden aufgrund nicht ausreichender Mengen an aufgereinigtem Enzym mit den Rohextrakten aus Kulturüberstand und Zellextrakt durchgeführt. L (85) wurde zuvor als Leitaktivität im Zellextrakt identifiziert und deshalb die mit Zellextrakt ermittelten Parameter L (85) zugeordnet. L (55) wurde als das Enzym identifiziert, das wahrscheinlich die zellassozierte Laccaseaktivität verkörpert. Die Charakteristika, die mit Kulturüberstand ermittelt wurden, sind allerdings durch Überlagerung von Laccaseaktivitäten entstanden und können den einzelnen extrazellulären Laccasen nicht eindeutig zugeordnet werden. Allerdings zeigten die Grafiken (pH-Optimum) keinen auffälligen Verlauf (Doppelgipfel o.ä.), so dass man mit Vorsicht auf ähnliche Eigenschaften der extrazellulären Enzyme schließen könnte. Aufgrund des gleichen Wirkortes ist ein hoher Grad an Ähnlichkeit wahrscheinlich.

##### 4.4.1 Molekulargewichte und Aufbau der Isoenzyme

In *H. acidophila* wurden insgesamt mindestens drei verschiedene Laccasen nachgewiesen (Tab. 3.11, Tab. 3.12). Die Existenz einer vierten Laccase ist möglich. Laccaseaktivitäten wurden im Kulturüberstand, zellassoziert und im Zellextrakt nachgewiesen (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Übersicht über die verschiedenen Extrakte aus *H. acidophila* mit Laccasenachweis

	L (85)	L (70)	L (55)
<b>Nachweis über Immunhybridisierung</b>	Zellextrakt	Zellextrakt und Kulturüberstand	Zellextrakt, Kulturüberstand, Zellassoziert
<b>Nachweis einer aktiven Laccase</b>	Zellextrakt	Kulturüberstand	Zellassoziert, Zellextrakt, Kulturüberstand

Die Ergebnisse wurden maßgeblich über Laccaseaktivitätstests in den verschiedenen Extrakten, über Laccaseaktivitätstest nach SDS-PAGE und durch Immunhybridisierung mit laccasespezifischen Antikörpern ermittelt. Die beiden verwendeten Antikörper ergaben in der Regel vergleichbare Ergebnisse, auch wenn die Banden manchmal unterschiedlich stark angefärbt wurden. Die Laccasen, von denen die Antikörper abgeleitet wurden, sind denen von *H. acidophila* wahrscheinlich nicht ähnlich. Bei *C. subvermispora* handelt es sich um einen Basidiomyceten und *M. albomyces* ist zwar ein Ascomycet, die von diesem Mikroorganismus

gebildete Laccase ist aber neutrophil bis alkaliphil, was signifikante Unterschiede zu den sauren *H. acidophila* Laccasen bedingen sollte. Trotzdem kam es mit beiden Antikörpern zu einer eindeutigen Hybridisierung. Im Zellextrakt war z.T. eine Hintergrundfärbung festzustellen. Da die Negativkontrolle mit Hefeextrakt von *S. cerevisiae* keine Anfärbung ergeben hatte, ist dieser Hintergrund möglicherweise auf die Hybridisierung der Antikörper mit Bruchstücken bzw. unfertigen Laccasen zurückzuführen und weniger auf unspezifische Interaktionen. So könnten neben reifen Laccasen u.U. auch Laccasen von den Antikörpern erkannt werden, die noch die Signalsequenz für ihren Transport tragen oder Laccasen in unterschiedlichen Stadien der Proteinbiosynthese und posttranslationalen Modifikation. So würden die verschiedensten Proteingrößen entstehen, was den Hintergrund erklären könnte. Die Proteine, die in größeren Mengen vorkommen und distinkte Banden formieren, sind mit großer Wahrscheinlichkeit die fertigen Laccasen, da sie statistisch häufiger vorkommen müssten als die verschiedenen Vorstufen.

Die ermittelten Molekulargewichte für die einzelnen Laccasen unterschieden sich bei Weiderholungsversuchen geringfügig, was wohl auf die Nutzung verschiedener Marker und Methoden zur Probenaufbereitung zurückgeführt werden kann. Nur Methanol-Chloroform-Fällungen mit moderatem Erhitzen auf 30 °C zum Solubilisieren der ausgefällten Proteine ergaben reproduzierbare Ergebnisse auch für gering konzentrierte Proben (s. auch 4.5.7).

#### **4.4.1.1 Molekulargewichte**

Wurden gewaschene Zellen einem Zellaufschluss unterzogen, wurde in dem resultierenden zellfreien Extrakt eine Laccaseaktivität und im Aktivitätstest im SDS-Gel eine Laccasebande bei 170 kDa gemessen. Die überwiegend im Zellextrakt vorliegende aktive Laccase schien also L (85) zu sein. Unter reduzierenden Bedingungen ergaben sich über Immunhybridisierung ermittelte Laccasebanden bei 85, 70 und 55 kDa. Im Zellextrakt lagen L (70) und L (55) als aktive Laccasen vor, wie über einen Aktivitätstest im SDS-Gel ermittelt wurde. Demnach liegt der Schluss nahe, dass es sich bei den 70 und 55 kDa großen Banden im Zellextrakt um inaktive Vorstufen der extrazellulären Laccasen handelt, die erst an ihrem Wirkort aktiviert werden. Dass auch die isoelektrischen Punkte mit 3,5 für L (55) und 3,8 für L (70) mit den Banden aus dem Kulturüberstand übereinstimmen, ist ein weiterer Hinweis auf die Identität der Laccasen aus Zellextrakt und Kulturüberstand. L (85) bzw. die aktive Form bei 170 kDa wurde nur im Zellextrakt und nicht in einem der extrazellulären Extrakte nachgewiesen. Bei L (85) handelt es sich also wahrscheinlich um eine echte intrazelluläre

Laccase. Bei der Reinigungsprozedur der Laccase aus dem Zellextrakt wurde im weiteren Verlauf der Arbeit eine Aktivität von L (55) in den Zellextrakten nachgewiesen. Diese waren allerdings verhältnismäßig gering. Da es sich bei L (55) wahrscheinlich um eine zellassozierte Laccase handelt, die möglicherweise zwischen Plasmamembran und Melaninauflagerung lokalisiert ist (Abb. 4.1), kann es beim Zellaufschluss zu einer Kontamination durch dieses zellassozierte Enzym gekommen sein. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass geringen Mengen an aktiver L (55) auch intrazellulär vorkommen. Im zellfreien Kulturüberstand konnten zwei Laccasebanden in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die Bande bei 110 kDa, also L (55) wurde nicht immer im Kulturüberstand gefunden, was für eine Kontamination durch die zellassozierte Laccase spricht. Da ein Teil von L (55) durch Waschen der Zellen abgelöst werden konnte (s. 3.3), kann dieser Teil wohl auch in den Kulturüberstand gelangen. Eine Übersicht über die Molekulargewichte der *H. acidophila* Laccasen und ein Vergleich mit anderen Laccasen ist in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

#### **4.4.1.2 Aufbau**

Die Laccasen aus *H. acidophila* scheinen überwiegend als Dimere vorzuliegen. Im Aktivitätstest ergaben sich Laccasebanden bei 170 (Zellextrakt), 140 und 110 kDa (Kulturüberstand), die Proteinbanden, die sich unter reduzierenden Bedingungen ergaben, lagen bei 85, 70 und 55 kDa (Abb. 3.14, Abb. 3.17). Da es sich bei L (85) wahrscheinlich um das Genprodukt von *lacc2* (Tetsch, 2005) handelt (s. 4.6), wäre auch das Vorliegen eines 170kDa großen Tetramers möglich. Anzahl, Molekulargewichte und möglicher Aufbau der *H. acidophila* Laccasen sind in Tab. 4.2 noch einmal zusammengefasst.

**Tab. 4.2 Übersicht über Anzahl, Aufbau und Molekulargewichte von Laccasen verschiedener Pilze.** Bei den Molekulargewichten wurden vorne die Gesamtgröße und danach das Molekulargewicht der Monomere angegeben. Bei *G. graminis* ist das Monomer deglykosyliert. Die anderen Molekulargewichte sind inklusive Zuckerreste angegeben.

Enzymquelle	Anzahl der im Organismus vorliegenden Laccasen	Molekulargewichte der Laccasen	Aufbau der Laccasen	Referenz
<i>H. acidophila</i>	3-4	110/55 kDa 140/ 70 kDa 170/ 85 oder 170/ 43 kDa (130 kDa)	Homodi-bzw. Tetramere	Diese Arbeit
<i>G. lucidum</i>	3	65-68 kDa	Monomere	Ko <i>et al.</i> , 2001
<i>T. gallica</i>	2	60 kDa	-	Dong & Zhang, 2004
<i>G. graminis</i>	1	190/ 60 kDa	Homodimer	Edens <i>et al.</i> , 1999
<i>P. anserina</i>	3	70; 80 kDa 390 kDa	Homodi- bzw. Tetramere	Minuth <i>et al.</i> , 1978; Fernandez- Larrea <i>et al.</i> , 1996
<i>C. cinerea</i>	8	-	-	Hoegger <i>et al.</i> , 2004
<i>M. albomyces</i>	1	80 kDa	Monomer	Kiiskinen <i>et al.</i> , 2002

#### 4.4.2 Stabilität

##### Lagerungsstabilität

Bei Laccasen handelt es sich in der Regel um sehr stabile Enzyme (Thurston, 1994; Gianfreda *et al.*, 1999). Auch die Laccasen aus *H. acidophila* zeigten bemerkenswerte Eigenschaften in Bezug auf ihre Stabilität. Die Laccaseaktivität aus dem Kulturüberstand blieb für 1 Tag bei Raumtemperatur, für eine Woche bei 4 °C und über ein Jahr bei -20 °C erhalten. Auch nach Lyophilisation der laccasehaltigen Proben war noch ein Großteil der Aktivität vorhanden,

auch, wenn die Laccasen hier nicht so stabil waren wie in den genannten Rohextrakten. Damit unterscheiden sich die Laccaseaktivitäten aus *H. acidophila* nicht grundlegend von anderen Laccasen. Die hohe Stabilität ist aber auch eine Anforderung für die industrielle Nutzung.

### Temperaturstabilität

Bei 45 °C waren die Laccasen aus Kulturüberstand und Zellextrakt über mehrere Stunden stabil, bei höheren Temperaturen nahm die Aktivität z.T. schnell ab (s. 3.5.3.2). Damit zeigen die Laccasen aus *H. acidophila* ein ähnliches Verhalten wie andere Laccasen, die meist zwischen 40 und 50 °C stabil sind (Tab. 4.3). Es gibt jedoch auch einige Laccasen aus thermophilen Pilzen wie z.B. PM1 oder *Chaetomium thermophilium*, die auch bei höheren Temperaturen noch über längere Zeit aktiv sind.

Tab. 4.3: Vergleich verschiedener Laccasen in Bezug auf ihre Temperaturstabilität

Enzymquelle	Stabil über mehrere Stunden bei	Referenz
<i>H. acidophila</i>	45 °C	Diese Arbeit
<i>T. gallica</i>	40 °C	Dong & Zhang, 2004
<i>G. lucidum</i>	40 °C	Ko <i>et al.</i> , 2001
PM1	60 °C	Coll <i>et al.</i> , 1993
<i>M. albomyces</i>	40 °C	Kiiskinen <i>et al.</i> , 2002
<i>C. thermophilium</i>	70 °C	Chefetz <i>et al.</i> , 1998

### pH-Stabilität

Generell sind Laccasen im Neutralen und Alkalischen stabiler als im Sauren (Gianfreda *et al.*, 1999). Damit unterscheiden sich die Laccasen von *H. acidophila* deutlich vom Durchschnitt (Abb. 3.13; Tab. 4.4), denn hier lag die Stabilität der verschiedenen untersuchten Laccasen aus Zellextrakt, Kulturüberstand und assoziiert mit den Zellen ganz eindeutig im Sauren, auch wenn die Laccasen über einen relativ breiten pH-Bereich stabil waren (Abb. 3.13). Keine andere Laccase wurde bislang beschrieben, die wie die Laccasen aus *H. acidophila* sogar bei pH 2 noch eine derart hohe Stabilität zeigt. Die pH-Stabilität bei niedrigen pH-Werten ist ein weiterer Beleg für den sauren Charakter der *H. acidophila* Laccasen und eine wichtige Voraussetzung für den biotechnologischen Einsatz.

**Tab. 4.4: Vergleich der pH-Stabilität bei Laccasen aus verschiedenen Pilzen.** Als stabil wurden die Enzyme definiert, wenn nach der Inkubation bei dem entsprechenden pH-Wert noch >60% der Aktivität vorhanden war.

Enzymquelle	pH-Stabilität	Referenz
<i>Hortaea acidophila</i> L (85)	pH 2-7	Diese Arbeit
<i>Hortaea acidophila</i> L (55), zellassoziert	pH 2-8	Diese Arbeit
<i>Hortaea acidophila</i> , L (70/65/55)	pH 2-7	Diese Arbeit
<i>Trametes gallica</i> Lac I	pH 6-9	Dong & Zhang, 2004
<i>Trametes gallica</i> Lac II	pH 4-9	Dong & Zhang, 2004
<i>Ganoderma lucidum</i>	pH 4-10	Ko <i>et al.</i> , 2001
PM1	pH 3-9	Coll <i>et al.</i> , 1993

#### 4.4.3 pH-Optima

Die pH-Optima-Bestimmungen wurden mit konzentriertem Kulturüberstand und mit Zellextrakt durchgeführt, da von den (teil-) gereinigten Proben nicht genug Material zur Verfügung stand. Generell lagen die ermittelten Optima im sauren Bereich. Für Laccasen werden in der Regel abhängig vom Substrat pH-Optima zwischen 3 und 7 gemessen (Gianfreda *et al.*, 1999).

Die Laccaseaktivität für ABTS lag sowohl bei den Laccasen aus dem Kulturüberstand als auch im Zellextrakt bei pH 2. Dass pH-Optima mit ABTS als Substrat im Sauren liegen, ist indes nicht ungewöhnlich. In mehreren Publikationen werden niedrige pH-Optima mit ABTS als Substrat genannt. In *Trametes gallica* wurden zwei Laccasen beschrieben, die mit ABTS jeweils ein pH-Optimum von pH 2,2 zeigten (Dong & Zhang 2004). Es wurde außerdem postuliert, dass Oxidationsreaktionen, die nicht den Übergang eines Protons erfordern, eher pH-Optima zeigen, bei denen die Laccaseaktivität mit sinkendem pH-Wert ansteigt (Gianfreda *et al.*, 1999). Für die Laccasen aus den Basidiomyceten *Trametes multicolor* (Leitner *et al.*, 2002) und *Agaricus blazei* (Ullrich *et al.*, 2005) wurde dieser Anstieg bestätigt. Generell ist die oxidierte Form des ABTS in stark gepufferten Lösungen und bei höheren pH-Werten (> pH 5-6) nicht stabil (McCoy-Messer *et al.*, 1993), weshalb in dieser Arbeit beim pH-Optimum auch nur bis zu einem pH-Wert von 4,5 gemessen wurde. Diese Instabilität des ABTS-Kationradikals erklärt aber auch die starke Abhängigkeit der Laccaseaktivität vom Puffer. Mit Citrat/ HCl-Puffer waren die Aktivitäten im Vergleich zu den Messungen in

McIlvaine Puffer um etwa den Faktor 2 geringer. Das pH-Optimum konnte aber wegen der verschiedenen Pufferkapazität der Puffer nur in Citrat/ HCl-Puffer bestimmt werden. Im Gegensatz zur Ermittlung der pH-Stabilität konnte für das pH-Optimum nicht der über den ganzen pH-Bereich puffernde Britton & Robinson Puffer verwendet werden, da die aus diesem Versuchsansatz resultierenden Aktivitäten zu gering waren, um eine Tendenz für das pH-Optimum erkennen zu können.

Im Gegensatz zu ABTS ist bei der Oxidation phenolischer Substrate (Guajacol, DMOP) ein Protonenübergang erforderlich. In diesen Fällen erhält man meist pH-Optimumskurven in Glockenform (Gianfreda *et al.*, 1999). Mit **Guajacol** als Substrat wurde sowohl im Kulturüberstand als auch im Zellextrakt von *H. acidophila* ein pH-Optimum von pH 4 gemessen. Dies ist ein typisches Optimum für Guajacol. Auch die Laccase von *Trametes gallica* zeigt ein pH-Optimum von 4 mit Guajacol (Dong & Zhang, 2004) und die Laccase von *Trametes multicolor* eines von 4,5 (Leitner *et al.*, 2002). Obwohl die Laccaseaktivität mit ABTS in diesen Proben eine wesentlich höhere Aktivität für die intrazellulären Laccasen ergeben hatte, waren die Aktivitäten mit Guajacol deutlich stärker mit der Laccase aus dem Kulturüberstand. Allerdings waren die Gesamtaktivitäten sehr gering. Da in diesem Versuch Punktmessungen über mehrere Stunden erfolgt waren, ist außerdem ein Ausfallen des oxidierten Substrates durch Polymerisierung möglich. Dieses ausgefallene Substrat würde zum Küvettenboden absinken und könnte im Aktivitätstest nicht mehr detektiert werden. Es kann also in diesem Fall keine Aussage zum absoluten Wert der Laccaseaktivität gemacht werden.

Mit dem Substrat **DMOP** ergaben sich sehr unterschiedliche Ergebnisse für die verschiedenen Laccasen. Die Laccasen aus dem Kulturüberstand (L 70/55) zeigten ein pH-Optimum von 6,5, wohingegen bei der intrazellulären Laccase L (85) ein Maximum bei pH 1,5 auftrat. Bei den Laccasen aus *Trametes gallica* wurde für DMOP ein pH-Optimum von 3, bei *Trametes multicolor* ein Plateau zwischen pH 3 und 4,5 gemessen. Beim ascomycetische Erreger der Traubenfäule *Botrytis cinerea* wurde das pH-Optimum der Laccase mit 3,5 angegeben (Gianfreda *et al.*, 1999). Für die Laccase aus *Rhizoctonia praticola* wiederum ergab sich ein pH-Optimum von 6,8 (Bollag, 1979; Gianfreda *et al.*, 1999). Die ermittelten Werte für L (70/55) weichen also nicht übermäßig von den für andere Laccasen bekannten Optima ab. Allerdings liegt das pH-Optimum der intrazellulären Laccase L (85) mit pH 1,5 deutlich niedriger als üblich. Bei der Ermittlung der pH-Optima der *H. acidophila* Laccasen (DMOP)

wurde jeweils über einen pH-Bereich von 0,5-7,5 gemessen. Im Kulturüberstand gab es kein weiteres Maximum, beim Zellextrakt kann man bei pH 6,5 eine Schulter vermuten. Dies ist erklärbar durch das Vorhandensein von geringen Mengen an L (55), die im Zellextrakt nachgewiesen worden war. Die angedeutete Aktivitätserhöhung im pH-Bereich um 6 könnte aber auch durch Messschwankungen entstanden sein, denn der Fehler war in diesem Bereich recht hoch (Abb. 3.12).

**Tab. 4.5: pH-Optima verschiedener Laccasen im Vergleich mit denen in dieser Arbeit ermittelten Werten.** Es wurden die pH-Optima mit den Substraten ABTS, DMOP und Guajacol gegenübergestellt.

Enzymquelle	ABTS	DMOP	Guajacol	Referenz
<i>H. acidophila</i> , L (85)	1,5-2	1,5	4	Diese Arbeit
<i>H. acidophila</i> L (70/55)	2	6,5	3,5-4	Diese Arbeit
<i>T. multicolor</i>	< 2,5	3-4	4,5	Leitner <i>et al.</i> , 2002
<i>T. gallica</i>	2,2	3	4	Dong & Zhang, 2004
<i>P. ostreatus</i>	3	6,5	6,0	Palmieri <i>et al.</i> , 2001
<i>R. praticola</i>	-	6,8	-	Bollag <i>et al.</i> , 1979
<i>G. graminis</i>	-	4,5	-	Edens <i>et al.</i> 1999
<i>M albomyces</i>	3,5	-	5-7,5	Kiiskinen <i>et al.</i> , 2002

Insgesamt kann man folgern, dass die pH-Optima der Laccasen von *H. acidophila* eher im sauren Bereich liegen. Das pH-Optimum der intrazellulären Laccase L (85) mit DMOP liegt mit pH 1,5 deutlich niedriger als bisher veröffentlichte Werte. Bislang wurden keine pH-Optima mit phenolischen Substraten veröffentlicht, die unter pH 3 lagen. Aufgrund der starken Abhängigkeit vom Substrat wird sich aber noch erweisen müssen, ob dieses niedrige pH-Optimum mit DMOP auch auf andere, biotechnologisch interessantere, Umsetzungen übertragbar ist.

#### 4.4.4 Isoelektrischer Punkt

Die isoelektrischen Punkte der Laccasen aus *H. acidophila* wurden in einer Isoelektrischen Fokussierung mit nachfolgendem Aktivitätstest bzw. einer Zweidimensionalen Elektrophorese ermittelt. Im *H. acidophila* Kulturüberstand wurde eine Doppelbande bei pH 3,5 und 3,8 angefärbt (Abb. 3.16). Im Zellextrakt wurden zwei Laccasen mit einem pI von 3,8 ermittelt. Es handelte sich um die 70 und die 85 kDa große Laccase. Insgesamt kann man



annehmen, dass L (70) und L(85) einen pI von 3,8 und dass L (55) einen pI von 3,5 aufweisen.

Der Isoelektrische Punkt, also der pH-Wert bei dem die Nettoladung eines Proteins Null ist, spielt für die Einordnung der Laccasen eine große Rolle. Der pI der *H. acidophila* Laccasen war mit 3,8 bzw. 3,5 relativ sauer, was für das Vorliegen von sauren Proteinen spricht. Auch die Laccasen aus *Trametes gallica* sind saure Enzyme, da sowohl der pI als auch ihre pH-Optima im ungewöhnlich sauren pH-Bereich liegen (Tab. 4.6). Meistens liegen die isoelektrischen Punkte von Laccasen aber zwischen 4 und 6.

**Tab. 4.6: Isoelektrische Punkte im Vergleich verschiedener Laccasen aus unterschiedlichen Pilzen.**

Enzymquelle	Isoelektrischer Punkt	Referenz
<i>H. acidophila</i>	3,5; 3,8	Diese Arbeit
<i>Trametes gallica</i>	3,0 bzw. 3,1	Dong & Zhang, 2004
<i>Trametes multicolor</i>	6,2; 5,8; 5,3; 5,0; 3,0	Leitner <i>et al.</i> , 2002
PM1	3,6	Coll <i>et al.</i> , 1993
<i>Pleurotus ostreatus</i>	4	Palmieri <i>et al.</i> , 2001
<i>Gaeumannomyces graminis</i>	5,6	Edens <i>et al.</i> , 1999
<i>Melanocarpus albomyces</i>	4	Kiiskinen <i>et al.</i> , 2002

#### 4.4.5 Glykosylierungsgrad

Die Bestimmung des Zuckergehaltes wurde aufgrund nicht ausreichender Mengen an aufgereinigten Enzymen durch Endoglykosidase H (Endo H) -Behandlung der Rohextrakten mit anschließender Detektion über die laccasespezifischen Antikörper durchgeführt. Der wahrscheinliche Zuckergehalt von L (70) liegt demnach bei 7%, der von L (55) bei 9 % (Tab. 3.12). Nach Deglykosylierung mit Zellextrakt zeigte sich eine Bande in Höhe von etwa 85 kDa und von 50 kDa, was dafür spricht, dass L (85) nicht N-glykosyliert ist. Ob die Zuordnung der nach der Deglykosylierung erhaltenen Banden aus dem Zellextrakt zu den Laccasen richtig ist, können aber nur weitere Versuche mit den aufgereinigten Enzymen zeigen, da der Zellextrakt mehrere Laccasen enthält. Auch die Zuordnung von L (55) zu der deglykosylierten Bande aus dem Zellextrakt bei 50 kDa ist daher nicht eindeutig. Versuche mit L (55) nach Aufreinigung aus dem Zellextrakt zeigten keine Bande nach Behandlung mit Endo H, was wohl auf die zu geringe Probenkonzentration zurückzuführen ist. Dass L (85) keine Glykosylierung zeigt, ist nicht ungewöhnlich, da intrazelluläre Enzyme in der Regel

nicht oder nur sehr geringfügig glykosyliert sind (Alberts, 1995). Eine fehlende Glykosylierung würde dann aber eher für ein Vorliegen im Cytosol sprechen als in melanosomen-ähnlichen Partikeln. Da das Milieu, in diesen Partikeln potenziell sauer ist, wäre auch hier eine Glykosylierung zum Schutz des Enzyms sinnvoll. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass eine O-Glykosylierung erfolgte oder der Glykosylierungsgrad sehr gering ist, so dass er im Fehler der Molekulargewichtsbestimmung lag und deshalb nicht messbar war. Bevor der Versuch nicht mit aufgereinigtem Enzym durchgeführt werden kann, kann hierzu keine genauere Aussage getroffen werden. Das Laccasegen *lacc2* zeigte eindeutig Eigenschaften einer intrazellulären Laccase (Tetsch, 2005). Nach der Sequenz zu urteilen wäre eine Glykosylierung unwahrscheinlich, da nur 2 potenzielle Glykosylierungsstellen im Gen aufgefunden werden konnten. Dies spricht dafür, dass Lacc2 und L (85) möglicherweise identisch sind (s. 4.6).

**Tab. 4.7: N-Glykosylierung von Laccasen aus verschiedenen Pilzen im Vergleich mit den für die Laccasen aus *H. acidophila* ermittelten Werten.** Die Werte für die Glykosylierung der *H. acidophila* Laccasen liegen zwar im unteren Bereich, sind aber durchaus typisch.

Enzymquelle	Glykosylierungsgrad	Referenz
PM1 (CECT 2971)	6,5 %	Coll <i>et al.</i> , 1993
<i>Ganoderma lucidum</i>	7-10 %	Ko <i>et al.</i> , 2001
<i>Trametes sp.</i> AH28-2	11-12 %	Xiao <i>et al.</i> , 2003
<i>Lentinula edodes</i>	8,6 %	Nagai <i>et al.</i> , 2003
<i>Trametes gallica</i>	3,6-4 %	Dong & Zhang, 2004
<i>Hortaea acidophila</i>	7-9 %	Diese Arbeit

Glykosylierungsgrade von Laccasen aus anderen Pilzen liegen zwischen 3,6 und 12 %. Beispiele sind die Laccasen aus *Ganoderma lucidum* (7-10%), *Trametes sp.* AH28-2 (11-12 %), *Trametes gallica* (3,6-5 %) oder die Laccase aus *Lentinula edodes* (8,6 %) (Tab. 4.7). Es handelt es sich bei den ermittelten Zuckergehalten jeweils um die N-gebundenen, also Asparagin-gekoppelten Oligosaccharidketten. Kohlenhydratketten, die über Serin oder Threonin (O-Glykosylierung) gebunden sind, werden durch Endo H nicht erkannt und entfernt. Da die chemische Deglykosylierung, die sowohl N- als auch O-Glykosylierungen entfernt hätte, aufgrund zu geringer Enzymkonzentrationen nicht funktioniert hat, kann zu ggf. vorhandenen O-gebundenen Zuckern keine Aussage getroffen werden. Allerdings ist das Vorhandensein von O-gekoppelten Oligosaccharidketten ein wesentlich seltenerer Vorgang als die N-Glykosylierung (Alberts, 1995) und wird bei der Untersuchung von Laccasen in der

Regel vernachlässigt (s. Referenzen in Tab.4.7). Die Laccasen aus *H. acidophila* weisen demnach einen geringen bis mittelmäßigen Glykosylierungsgrad auf. Viele Laccasen, in der Regel extrazelluläre Enzyme, sind aufgrund der höheren Stabilitätsanforderungen an ihrem Wirkort glykosyliert. Im Falle von *H. acidophila* hat das Außenmedium einen stark sauren Charakter, so dass auch hier eine solche Stabilisierung sinnvoll erscheint. Die Stabilitätserhöhung durch die kovalente Bindung der Oligosaccharidkette ans Protein soll dadurch zustande kommen, dass neutrale und anionische Kohlenhydrate Komplexe miteinander bilden, die das Gesamtprotein stabilisieren (Yang & Haug, 1979). Weiterhin können die Zuckerreste die negative Oberflächenladung der Enzyme verstärken (Perry *et al.*, 1993), was auch bei der Stabilität halophiler Proteine eine Rolle zu spielen scheint (Eisenberg & Wachtel, 1987).

#### **4.4.6 Inhibitionsspektrum**

Die hemmende Wirkung von Natriumazid, EDTA, SDS und verschiedenen Salzen auf die Laccasen aus dem Kulturüberstand und Zellextrakt von *H. acidophila* wurde untersucht. Die Inhibitionswirkung dieser Substanzen ist nicht laccasespezifisch. Ein spezifischer Laccaseinhibitor ist zurzeit jedoch nicht bekannt (Ratcliffe *et al.*, 1994). Da in verschiedenen Veröffentlichungen unterschiedliche Konzentrationen der einzelnen Inhibitoren verwendet wurden, ist ein Vergleich mit Literaturwerten nicht immer eindeutig.

##### **Natriumazid**

Durch 10 mM Azid wurden wie erwartet die Laccasen aus Kulturüberstand und Zellextrakt von *H. acidophila* vollständig gehemmt. Azid ist ein typischer Laccaseinhibitor, der jedoch nicht spezifisch auf Laccasen wirkt, sondern beispielsweise auch die Cytochromoxidase der Atmungskette hemmt. Dieser Hemmung liegt eine Bindung an die Typ 2 und 3 Kupferatome im aktiven Zentrum der Laccase zugrunde (Gianfreda *et al.*, 1999). Dadurch wird der interne Elektronentransfer unterbrochen und die Aktivität gehemmt. Auch die Laccasen aus *Trametes gallica* werden durch Zugabe von 0,05 mM Natriumazid vollständig inhibiert (Dong & Zhang, 2004). Die Laccase aus *Melanocarpus albomyces* wurde durch Zugabe von 1 mM Natriumazid zu 100 % gehemmt. Nach Zugabe von 10 mM Natriumazid zur Laccase aus *Chaetomium thermophilum* wurde eine 96%ige Hemmung detektiert (Chefetz *et al.*, 1998). Auch wenn die untersuchten Inhibitorkonzentrationen schwanken, kommt es doch bei allen untersuchten Laccasen zu einer fast vollständigen Hemmung durch Natriumazid. Das Verhalten der Laccasen aus *H. acidophila* ist also laccasetypisch.

## EDTA

EDTA scheint eine sehr unterschiedlich starke Auswirkung auf die verschiedenen Laccasen zu haben. Bei *H. acidophila* wurde L (55/70) aus Kulturüberstand durch 2 mM EDTA zu über 80 % gehemmt, während L (85) aus dem Zellextrakt nur zu 17 % beeinträchtigt wurde. EDTA wirkt als ionenchelierendes Agens, dessen inhibierende Wirkung auf Laccasen in der Komplexierung der Kupferionen aus dem aktiven Zentrum der Laccasen beruht. Im Vergleich mit anderen Laccasen stellt sich heraus, dass auch in der Literatur ein sehr unterschiedliches Verhalten von Laccasen gegenüber EDTA dokumentiert wird: Die Laccase von *Trametes multicolor* wird schon durch ein zehntel der bei den *H. acidophila* Laccasen eingesetzten Konzentration (0,1 M) EDTA zu 15 % gehemmt (Leitner *et al.*, 2002). Bei den Laccasen aus *Trametes gallica* kommt es erst bei einer EDTA-Konzentration von 100 mM zu einer ca. 50%igen Hemmung der Laccaseaktivität (Dong & Zhang, 2004). Die Laccase aus *Chaetomium thermophilum* zeigt bei einer Konzentration von 2 mM EDTA eine 39%ige Hemmung (Chefetz *et al.*, 1998). Die Laccase aus *Botrytis cinerea* wurde unter diesen Bedingungen zu 37% gehemmt (Dubernet *et al.*, 1977). Wie stark EDTA auf verschiedene Laccasen wirkt, ist also sehr unterschiedlich.

## SDS

Da für den Aktivitätstest im SDS-Gel sehr hohe Laccaseaktivitäten eingesetzt werden mussten, wurde untersucht, ob 2 mM SDS eine hemmende Wirkung auf die Laccasen aus Kulturüberstand bzw. Zellextrakt hatte. In der Tat konnte eine Hemmwirkung von 45 % für die Laccaseaktivität aus dem Kulturüberstand und von 64 % für die Laccaseaktivität aus dem Zellextrakt nachgewiesen werden (s. 3.5.3.1). Andere Laccasen werden kaum durch SDS beeinträchtigt. Die Laccase aus *M. albomyces* z.B. behält bei Behandlung mit 1 mM SDS ihre volle Aktivität (Kiiskinen *et al.*, 2002) und bei bakteriellen Laccasen wurde durch SDS-Behandlung mit 1,7 mM sogar eine Steigerung der Laccaseaktivität nachgewiesen (Castro-Sowinski *et al.*, 2002). Die Empfindlichkeit der Laccasen gegenüber SDS kann erklären, dass höhere Enzymkonzentrationen in den Aktivitätstest im SDS-Gel eingesetzt werden mussten als z.B. für die Positivkontrolle. Außerdem ist dadurch erklärbar, dass sich nach der IEF zwar mit Kulturüberstand, nicht jedoch mit Zellextrakt aktive Laccasebanden nachweisen ließen, da die Laccaseaktivität aus dem Zellextrakt stärker durch SDS beeinträchtigt wird als die Aktivität aus dem Kulturüberstand.

**Salze:** Die meisten Salze haben auch eine starke Wirkung auf die Aktivität von Laccasen. Die Laccasen aus *Trametes gallica* werden durch eine 100 mM NaCl-Konzentration vollständig gehemmt (Dong & Zhang, 2004). Auch die Laccasen aus *H. acidophila* zeigten eine reduzierte Aktivität (ca. 50 %) nach Salzbehandlung mit 500 mM Kalzium- oder Magnesiumchlorid (3.5.3.1). Eine Verdrängung der Kupferatome aus dem aktiven Zentrum ist hier als Hemmungsmechanismus denkbar oder aber eine Denaturierung der Proteinstruktur. Weiterhin wurde eine durch das Chlorid bedingte Hemmung gezeigt (Gianfreda *et al.*, 1999).

#### 4.4.7 Substratspektrum

Die *H. acidophila* Laccasen können verschiedene Laccasesubstrate umsetzen. Die Laccasen aus Kulturüberstand und Zellextrakt unterscheiden sich dabei kaum voneinander. Zu den umgesetzten Substraten gehören 1,6-DHN, 1,8-DAN, Ascorbinsäure, ABTS, DMOP und Guajacol. Laccasen besitzen üblicherweise ein relativ breites Substratspektrum und können verschiedene phenolische, aber auch nicht phenolische substituierte aromatische Verbindungen oxidieren. Dass das typische Laccasesubstrat Syringaldazin von den Laccasen aus *H. acidophila* nicht umgesetzt wurde, kann mehrere Gründe haben. So spielt z.B. das Redoxpotenzial (Xu, 1996) eine große Rolle. Nach Tetsch (2005) kodieren die in *H. acidophila* gefundenen Laccasegene allerdings für Laccasen, die ein mittleres bis stark elektropositives Redoxpotenzial aufweisen. Demnach müsste eigentlich auch Syringaldazin als Substrat umgesetzt werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Affinität der Laccase zu Syringaldazin zu gering war und so unter der Nachweisgrenze des hier verwendeten Testsystems lag. Außerdem musste Ethanol zum Lösen des Syringaldazin genutzt werden, was möglicherweise ebenfalls einen Einfluss auf das Testergebnis hatte, auch wenn Ethanol eigentlich keine deutlich laccasehemmenden Eigenschaften gezeigt hatte (s. 4.5.3).

Da die Laccasen in Verbindung mit der Melaninsynthese in *H. acidophila* stehen und durch die Tricyclazolhemmung deutliche Hinweise auf das Vorhandensein von 1,8-DHN-Melanin gegeben sind (Abb. 3.22), ist es wahrscheinlich, dass das natürliche Substrat der Laccasen 1,8-DHN ist. Die mehrkernigen Aromaten wie 1,6-DHN und 1,8-DAN wurden von den Laccasen auch deutlich besser umgesetzt als die phenolischen Substrate DMOP oder Guajacol, was einen weiteren Hinweis auf DHN als natürliches Substrat darstellt. 1,8-DHN ist das typische Substrat für Laccasen in Ascomyceten (Butler & Day, 1998; Hoopes & Dean, 2001).

## **4.5 Isolierung und Aufreinigung der Laccasen**

Um eine N-terminale Sequenzierung zu ermöglichen, sollte zumindest eine der Laccasen gereinigt werden. Primäres Ziel war es, die N-terminalen Aminosäuresequenzen zu bestimmen, um die den Laccasen zugehörigen Gene zu identifizieren. In einem ersten Schritt mussten die Laccaseaktivitäten isoliert bzw. konzentriert werden. Danach wurden einige wichtige Charakteristika wie pI und Stabilität ermittelt und verschiedene Methoden zur Aufreinigung getestet. Es wurden Gelfiltrationschromatographie, Anionen- und Kationenaustauschchromatographie, präparative SDS-PAGE und verschiedene native Fällungen auf ihre Eignung zur Aufreinigung getestet.

L (55) konnte aus dem Zellextrakt homogen und aus Kulturüberstand und von den Zellen abgewaschen partiell gereinigt werden (s. 4.5.5). Die N-terminale Aminosäuresequenz von L (55) aus dem Zellextrakt wurde daraufhin bestimmt. Auch von L (70) konnte eine Aminosäuresequenz aus der partiell aufgereinigten Probe ermittelt werden (Abb. 3.38). Insgesamt waren aber die Proteingehalte der gereinigten Proben sehr gering, so dass die Probenkonzentration für eine weiter gehende Charakterisierung der Laccasen nicht ausreichte. Aufgrund der im Vergleich zu anderen Pilzen geringen Laccaseaktivitäten war die Aufreinigung ausreichender Mengen aber auch nicht zu erwarten gewesen (s. 4.2.8). Deshalb wurde als Strategie die Vorbereitung einer Überexpression der Laccasegene gewählt. Für diese Methode musste aber zunächst über eine Teilcharakterisierung der Laccasen das jeweilige Potenzial der Laccasen evaluiert werden. Über Ermittlung der N-terminalen Aminosäuresequenzen wurde danach die Grundlage für eine spätere Überexpression der Enzyme geschaffen.

### **4.5.1 Isolierung der Laccasen**

Während die Laccasen aus dem Kulturüberstand bereits frei in Lösung vorlagen, mussten sowohl die zellassozierte Laccase als auch die intrazellulären Laccasen von den Zellen isoliert werden. Dabei war zu Anfang der Arbeit nicht bekannt, dass es neben den zellassozierten Laccasen auch intrazelluläre Laccasen gab. Es wurden verschiedene Versuche zur Ablösung der Laccase von den Zellen durchgeführt. Weder Inkubation mit zweiwertigen Kationen noch Waschen in SDS führte zu einer signifikanten Laccaseaktivität in Lösung. Deshalb wurde auch ein Zellaufschluss ins Auge gefasst, da die Hypothese bestand, dass die Laccase sich zwischen Plasmamembran und Melaninauflagerung von *H. acidophila* befinden könnte. Nach Zellaufschluss war im zellfreien Zellextrakt eine hohe Laccaseaktivität messbar.

Western-Blot-Analysen mit Immunhybridisierung mittels laccasespezifischem Antikörper zeigten jedoch, dass sich die intrazellulären Laccasen von der zellassozierten Laccase unterschieden. Die zellassozierte Laccase konnte in geringen Mengen durch Waschen der lyophilisierten *H. acidophila* Zellen gewonnen werden.

Für den Zellaufschluss wurde ein neues Zellaufschlussverfahren etabliert, da die herkömmlichen Verfahren für den Aufschluss von Hefen oder filamentösen Pilzen nicht zu einer ausreichenden Laccaseisolierung aus *H. acidophila* geführt hatten. Die Methode beinhaltete mehrfache Aufschlusszyklen mit Glassbeads und einem detergenzienhaltigen Puffer. Mit McIlvaine Puffer, der keine Detergenzien enthält, wurde eine wesentlich geringere Laccaseaktivität im Extrakt nachgewiesen (Tab. 3.6). Dies kann einerseits an einem besseren Zellaufschluss durch die Detergenzien gelegen haben. Für *H. werneckii* wurde gezeigt, dass auf die Zellwand eine Lipidschicht aufgelagert ist (Mittag, 1993), deren Aufschluss durch die Detergenzien unterstützt worden sein könnte. Ein Unterschied in der Güte des Zellaufschlusses konnte im mikroskopischen Bild jedoch nicht festgestellt werden. Deshalb ist auch eine verstärkte Lyse der melanosomen-ähnlichen Vesikel durch die Detergenzien im Puffer denkbar. Der Aufschluss von *H. acidophila* Zellen, die mit Ascorbinsäurezusatz zum Medium angezogen worden waren und die kein Melanin gebildet hatten, war im Gegensatz zum Aufschluss melanisierter Zellen schon mit einem Aufschlusszyklus erfolgreich. Da Melanin für eine Schutzwirkung gegenüber mechanischem Stress bekannt ist (Butler & Day, 1998), liegt der Schluss nahe, dass die dicke Melaninauflagerung auf die Zellwand (Abb. 4.1) für die extreme mechanische Festigkeit der Zellen verantwortlich war.

#### **4.5.2 Ultrafiltration**

Durch die Ultrafiltration des Kulturüberstandes konnte die Laccaseaktivität um ein Vielfaches konzentriert werden. Allerdings wurde auch das im Kulturüberstand enthaltene Melanin konzentriert (Abb. 3.2), was den Konzentrationsfaktor begrenzte. Ein weiteres Problem stellte die Verblockung der Membranen bei den herkömmlichen Systemen dar. Dies konnte durch Nutzung eines Ultrafiltrationsgerätes mit tangential angeströmter Membrankassette (LV Centramat) umgangen werden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Ultrafiltration mit der tangential angeströmten Membran effektiver war als die mit den üblichen Geräten (Tab. 3.2). Die Membranen verstopften bei diesem System nicht, Melanin wurde aber auch hier mit aufkonzentriert. Ein Nachteil des LV Centramates bestand auch darin, dass das Endvolumen mit 20ml im Vergleich zu den sonst möglichen Endvolumina von 1-2 ml noch

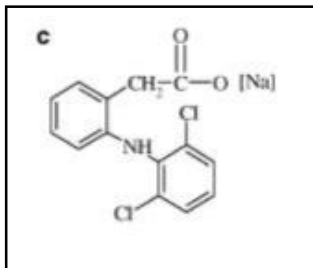
relativ groß war. Es mussten deshalb entweder große Mengen an Kulturüberstand verarbeitet werden, um ausreichende Laccaseaktivitäten zu erreichen oder die 20 ml mussten mit Zentrifugations-Konzentratoren noch weiter behandelt werden, was aber aufgrund der zunehmenden Viskosität durch den hohen Melaninanteil nur begrenzt möglich war.

Die Volumenaktivitäten der Laccase waren mit der VivaCell 250 zwar am höchsten, aber die Verluste waren ebenfalls sehr hoch (bis zu 93 %). Beim LV Centramate gab es praktisch keine Verluste an Laccaseaktivität. Durch eine weitere Aufkonzentrierung oder durch ein größeres Anfangsvolumen an Kulturüberstand hätte auch hier eine höhere Laccasekonzentration erreicht werden können. Der Zeitaufwand für die Ultrafiltration mit der VivaCell250 war mit ca. 8 Stunden beträchtlich, mit dem LV-Centramate konnte der Zeitaufwand auf 2 Stunden reduziert werden. Insgesamt sprechen die Argumente also für den Einsatz des LV Centramates mit tangential angeströmter Membran. Das Gerät stand allerdings nur für einen begrenzten Zeitraum zur Verfügung.

Dass Melanin in den Proben mit aufkonzentriert wurde, war ein generelles Problem. Nicht nur dass die Konzentrierung durch die steigende Viskosität der Proben begrenzt wurde, störte Melanin doch in zahlreichen Methoden (s. 3.6.1.1). Melanin ist ein komplexes Polymer, von dem man nicht erwarten würde, dass es eine einheitliche Größe hätte. Tatsächlich wird in der Literatur eine konkrete Größe für Melanin genannt: 4 kDa (Aghajanyan *et al.*, 2005). Dieser Wert wurde durch Reinigung des Melanins mit nachfolgender SDS-PAGE bestimmt und stammt aus dem grampositiven Bakterium *Bacillus thuringiensis*. Läge die Größe des Melanins auch in *H. acidophila* bei etwa 4 kDa (Aghajanyan *et al.*, 2005) hätte das Melanin eigentlich durch Ultrafiltration ebenso abgetrennt werden müssen, da die Filtermembranen ein Ausschlussvolumen von 30 kDa hatten. Dass Melanin nicht abgetrennt wurde, kann bedeuten, dass es an die Filtermembran gebunden hatte. Melanin verstopfte wie beschrieben bei den herkömmlichen Ultrafiltrationssystemen immer wieder die Filter und musste durch mehrere Spülgänge entfernt werden. Eine Bindung des Melanins an die Membran könnte die Konzentrierung des Melanins durch Ultrafiltration trotz größeren Ausschlussvolumens erklären. Eine typische Eigenschaft des Melanins ist ja auch seine Fähigkeit toxische Substanzen, Ionen, Wasser u.a. zu binden. In dieser hohen Bindeaffinität zu vielen Substraten besteht ein wesentlicher Teil der Schutzeigenschaften des Moleküls (Butler & Day, 1998). Bei den für VivaCell250 und LV Centramate verwendeten Membranen handelte es sich um Polyethersulfon (PES). Burba *et al* (2005) beschreiben, dass mehrere Substanzen, die durch



Ultrafiltration aufkonzentriert werden sollten, vor allem das Medikament Diclofenac, durch die PES-Membran zurückgehalten wurde. In Abb. 4.2 ist die Struktur von Diclofenac ([2-(2,6-Dichloranilino)phenyl]essigsäure, Natriumsalz) dargestellt. Die (hetero)-aromatisch substituierte Essigsäure könnte aufgrund der ähnlichen Struktur ggf. ähnliche Bindeeigenschaften aufweisen wie Melanin. Shao & Zydney (2004) zeigten, dass verschiedene geladene Substanzen, die durch die Ultrafiltration durch PES-Membranen entfernt werden sollten von der Membran zurückgehalten wurden, obwohl ihre Größe deutlich unter dem Ausschlussvolumen der Membran lag. Die Wissenschaftler erklärten diese Beobachtung durch elektrostatische Wechselwirkungen. Bei Melanin handelt es sich ebenfalls um ein kleines geladenes Molekül (Butler & Day, 1998), das demnach auch von diesen Wirkungen betroffen sein könnte. In der genannten Arbeit wurde weiterhin festgestellt, dass die Probleme nicht nur mit PES, sondern auch mit Cellulosemembranen auftraten (Shao & Zydney, 2004). Deshalb konnte das Problem nicht durch die Nutzung einer Cellulosemembran wie im Falle der Filtron-Ultrafiltrationseinheit gelöst werden.



**Abb. 4.2 Diclofenac, Natriumsalz.**

Bildnachweis: Burba *et. al.*, 2005

In vielen SDS-Gelen zeigten sich trotz Ultrafiltrationsbehandlung oft Banden um 14 kDa (Abb. 3.3, Abb. 3.14, Abb. 3.30), die sich aufgrund des Ausschlussvolumens (30 kDa) eigentlich nicht in den Proben befinden dürften. Wenn Melanin an die PES-Membran bindet, könnte es sich bei diesen Banden um Melanin oder melaninassoziierte Proteinbruchstücke handeln (s. auch 4.7).

### 4.5.3 Native Fällungen

Die nativen Fällungen sollten in erster Linie dazu verwendet werden, das Melanin aus den Proben zu entfernen. Es wurden eine Ammoniumsulfat- und eine Eisenchloridfällung sowie eine Ethanol-fällung durchgeführt. Das Ergebnis der Eisenchloridfällung war nicht eindeutig, da Reste des Eisenchlorids mit dem ABTS-Test interferierten. Außerdem war die Methode sehr fehleranfällig und reagierte schon auf kleine Änderungen der Rührfrequenz während der Fällung. Deshalb wurde im Weiteren mit der Ammoniumsulfatfällung gearbeitet, der das

gleiche Prinzip zugrunde liegt. Durch die Ammoniumsulfatfällung konnte weder das Melanin noch eine signifikante Menge anderer Proteine abgetrennt werden. Außerdem waren die Verluste sehr hoch und die Laccaseaktivität verteilte sich auf mehrere Fraktionen und konnte daher nicht konzentriert werden. Auch bei der Ethanol-fällung erfolgte keine gute Aufreinigung (Reinigungsfaktoren bis ca. 1,4) und auch keine Trennung vom Melanin trotz hoher Ausbeuten von bis zu 93 %. Generell funktionierten die nativen Fällungen umso besser je mehr Protein eingesetzt wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit der Aussage dass „Ammoniumsulfat Proteine aus verdünnten Lösungen nicht oder nur unvollständig ausfällt“ (Rehm, 2002). Diese Ergebnisse legten den Einsatz der getesteten nativen Fällungen für die Aufreinigung der gering konzentrierten Laccasen nicht nahe und die Methoden wurden nicht weiter verfolgt.

#### **4.5.4 Gelfiltrationschromatographie**

Von den Säulenmaterialien, die getestet worden waren, erwiesen sich nur die vorgepackten EconoPac 10 DG- Säulen als geeignet. Hiermit konnte eine Reduktion des Melaninanteils im Kulturüberstand um zwei Drittel und Reinigungsfaktoren bis zu 3 bei Ausbeuten zwischen knapp 50 und 80 % erreicht werden. Die Reinigungsfaktoren, die durch dieses Verfahren erreicht werden konnten, waren zwar nicht hoch, aber der Nebeneffekt war eine gute Vorbereitung auf die Kationenaustauschersäule durch Entsalzen und Entfernen des Melanins. Nimmt man für das von *H. acidophila* gebildete Melanin eine Größe von etwa 4 kDa an (Aghajanyan *et al.*, 2005), wäre eine Abtrennung des Melanins über die Gelfiltrationssäule mit Ausschlussvolumen von 6kDa gut zu erklären. Wie sich in SDS-PAGE-Versuchen gezeigt hat (Abb. 3.21), lagert sich das *H. acidophila*-Melanin aber oft wenig distinkt im oberen oder auch unteren Bereich der Gele an. Wahrscheinlich kann man also davon ausgehen, dass es verschiedene Melaninfraktionen unterschiedlicher Größen gibt (s. 4.7).

#### **4.5.5 Ionenaustauschchromatographie**

Die Ionenaustauschchromatographie konnte als Hauptaufreinigungsschritt für die Reinigung von L (55) etabliert werden. Für diese Methode wurden neben dem Säulenmaterial (Anionen- und Kationenaustauscher) die Startbedingungen variiert. So wurde die Chromatographie auf pH-Wert, Puffer und Probenkonzentration hin optimiert. Aufgrund des niedrigen pI der Laccasen eignete sich die Kationenaustauschchromatographie am besten für die Aufreinigung von L (55) aus Zellextrakt und bedingt auch für L (55) aus dem Kulturüberstand. Die

Ausbeuten waren mit ca. 20 % aber nicht optimal, was wohl an der suboptimalen Bindung der Proteine an die Säule lag, was durch Melanin mit verursacht gewesen sein könnte. Bei der Dokumentation von L (55) kam es zu Problemen, die unter 4.5.4 diskutiert werden. Wohingegen es bei L (55) zu einer Bindung mit anschließender Elution kam, konnte dies für die Laccasen L (85) und L (70) unter den getesteten Bedingungen nicht erreicht werden. Das kann am Melanin Gehalt der Proben gelegen haben. Melanin gilt als natürlicher Kationenaustauscher (Butler & Day, 1998) und müsste dementsprechend von einer Kationenaustauschersäule abgestoßen werden. Generell sind Proteine aus Melanosomen bzw. melaninassoziierte Proteine schwer aufzureinigen (Sharma *et al.* 2002), was die Probleme z.T. erklären kann.

Außerdem ist die Aufreinigung über Ionenaustauscher der Laccasen aufgrund des niedrigen pI doch nicht so günstig wie erwartet, da die pH-Stabilität der Enzyme auch im Sauren liegt. Laccasen werden oft erfolgreich über Gelfiltration und Ionenaustauscher aufgereinigt (Ullrich *et al.*, 2005; Dong & Zhang, 2004, etc.). Da diese aber in der Regel einen niedrigen pI (Tab. 4.6) und eine pH-Stabilität im Neutralen (Tab. 4.4) aufweisen, ist hier eine Reinigung über Anionenaustauschchromatographie problemlos möglich. Bei der Reinigung einer Laccase aus *Agaricus bisporus* wurden durch Anionen- bzw. Kationenaustauschchromatographie Reinigungsfaktoren zwischen 2 und 3 sowie Ausbeuten um die 20 % erreicht, was mit den in der hier vorliegenden Arbeit erzielten Werten durchaus vergleichbar ist (Tab. 3.15; Tab. 3.16). Da die Ausgangsaktivitäten in dem genannten Organismus aber sehr viel höher waren als in *H. acidophila*, reichten die Endkonzentrationen im Gegensatz zu *H. acidophila* immer noch aus, um eine Charakterisierung der Enzyme durchzuführen (Ullrich *et al.*, 2005).

Da im SDS-Gel nach der Aufreinigung eine einzige Bande nachgewiesen wurde, erscheinen die ermittelten Reinigungsfaktoren für L (55) aus dem Zellextrakt mit einer maximalen Reinigung um das zehnfache sehr niedrig. Möglicherweise liegt dies an den unterschiedlichen Methoden zur Proteinbestimmung. Nach der Reinigung waren die Proteinkonzentrationen so gering, dass sie mit der Bradford-Methode nicht bestimmbar waren. Deshalb wurden diese Aktivitäten aus der Extinktion bei 280 nm abgeschätzt, was unter Umständen aufgrund jeweils unterschiedlicher Melaninkonzentrationen in den Proben zu Varianzen führen könnte. Die aus diesen Proteingehalten abgeleiteten spezifischen Laccaseaktivitäten vor und nach Reinigung sind also möglicherweise nicht vergleichbar und die realen Reinigungsfaktoren höher als die berechneten.

#### 4.5.6 Präparative SDS-PAGE

Bei der präparativen SDS-PAGE sollte eine Separation durch die zuvor ermittelte Größe der Laccasen erfolgen. Durch die nicht fixierende Färbung ging aber sehr viel Protein durch Diffusion verloren, was bei den sowieso geringen Proteinkonzentrationen ein großes Problem darstellte. Schon vor der Färbung sollte das Gel in Wasser gewaschen werden, um überschüssiges SDS zu entfernen, das mit der Färbelösung interagiert hätte. Aber sogar die Banden des vorgefärbten Markers wurden bei diesem Schritt schon leicht entfernt. Eine Optimierung dieses Färbeschrittes brachte aber nicht den gewünschten Erfolg, so dass insgesamt nicht genug Protein für den Nachweis der Laccasebande in einem mit Silbernitrat gefärbten SDS-Gel übrig blieb. Für die Aufreinigung von Laccasen wird häufig auf die Präparation der Laccasen aus aktivitätsgefärbten Gelen zurückgegriffen (Ko *et al.*, 2001, Edens *et al.*, 1999). Die Vorteile hierbei sind, dass die Aktivität der Laccasen erhalten bleibt und die Aufreinigungsfaktoren extrem hoch sind. Bei *H. acidophila* konnte diese Methode aufgrund zu geringer Proteinkonzentrationen leider nicht eingesetzt werden, da schon bei der präparativen SDS-PAGE mit gefälltten Proteinen, bei der die eingesetzte Proteinkonzentration um den Faktor 100 höher eingesetzt werden konnte als bei den aktivitätsgefärbten SDS-Gelen, nicht genug Protein vorhanden war, dass es nach der Elution noch nachgewiesen werden konnte.

#### 4.5.7 Dokumentation der gereinigten Laccasen

Die Laccasereinigung wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert. Die Dokumentation der aufgereinigten L (55) war dabei nicht unproblematisch, da Schwankungen im errechneten Molekulargewicht von insgesamt ca. 7 % auftraten (nicht gezeigt). Dies könnte an verschiedenen Faktoren gelegen haben:

- 1) Der vorgefärbte Marker war ungenau. Der vorgefärbte Marker wurde zwar wie vom Hersteller empfohlen gegen den ungefärbten Marker kalibriert, es kam aber trotzdem noch zu Schwankungen wie mehrfaches Auftragen der verschiedenen genutzten Marker gegeneinander zeigte. Aufgrund dieser Ungenauigkeit der Marker könnte es, insbesondere bei Nutzung der verschiedenen Marker jeweils zu Unterschieden in der Molekulargewichtsbestimmung gekommen sein.
- 2) Da der Salzgehalt in den Proben aufgrund des Zellaufschlusspuffers oder der TCA-Fällung hoch war, könnte es zur Verzögerung der Proteine in der Elektrophorese gekommen sein.

- 3) Außerdem bestünde noch die Möglichkeit, dass die Laccase durch Proteasen oder möglicherweise Glykosidasen aus dem Zellextrakt angegriffen worden sein könnten. Dies ist aber sicherlich die unwahrscheinlichste Möglichkeit, da in allen Proben eine signifikante Laccaseaktivität gemessen wurde, die wahrscheinlich nicht von einem angegriffenen Protein stammen kann. Außerdem wurde die Zellextraktion auch unter Zusatz eines Proteaseinhibitor-Cocktails durchgeführt, wonach kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte.

Um optimale und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Probenaufbereitung und die SDS-PAGE selbst optimiert. Zur Probenvorbereitung wurden die Methanol-Chloroform-Fällung, die TCA-Fällung und Ultrafiltration getestet.

Die Methanol-Chloroform-Fällung war in der Regel am besten geeignet, die gering konzentrierten Proben zu konzentrieren. Auch Rehm (2002) empfiehlt die Verwendung dieser Methode für gering konzentrierte Proben. Die Ultrafiltration führte bei den gering konzentrierten Proben zu einem vollständigen Enzymverlust, bei stärker konzentrierten Proben, die kein Melanin enthielten, war diese Methode aber gut geeignet. Die TCA-Fällung führte zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen, vielen verschiedenen Proteinbanden und bei Färbung der SDS-Gele mit Silbernitrat zu einem starken Hintergrund. Sogar dieselbe Probe zeigte mitunter unterschiedliche Molekulargewichte, wenn die Proteine mit TCA ausgefällt worden waren. Dies könnte auf einer sauren Hydrolyse der Peptidketten beruhen, was für TCA-Fällungen schon beschrieben wurde (persönliche Mitteilung Prof. Dr. A. Schwartz). Die TCA-Fällung war eingeführt worden, weil sich die Chloroform-Methanol-Fällung nicht für die Fällung salzhaltiger Proben eignete wie sie z.B. nach dem Zellaufschluss vorlagen, da hier kein distinktes Bandenmuster zu erkennen war. Die TCA-Fällung in der verwendeten Form ist somit für die Behandlung der *H. acidophila*-Laccasen nicht optimal.

Außerdem wurden im späteren Verlauf der Arbeit 7,5%ige statt 10%iger SDS-Gele verwendet und die Bedingungen für die SDS-PAGE stringenter gewählt. So wurde eine höhere Konzentration an DTT und SDS im Probenpuffer eingesetzt. Diese Änderungen führten jedoch nicht zu einem verbesserten Laufverhalten der Proteine. Eine Senkung der Solubilisierungstemperatur auf 30 °C ergab schließlich konstante Ergebnisse. Dieser Schritt wurde zuvor bei 95 °C durchgeführt, um die Trennung der Untereinheiten zu gewährleisten. Es stellte sich aber heraus, dass eine Behandlung bei 95 °C zur Bildung größerer Banden

fürte (Abb. 3.28), möglicherweise Aggregate aus mehreren Laccaseuntereinheiten. Eine solche Zusammenlagerung durch Erhitzen wurde auch schon für Laccasen aus anderen Pilzen beschrieben (Thurston, 1994).

Wie erwähnt waren die Proteinkonzentrationen der Proben oft sehr gering. Deshalb sind die Proteinbanden in Serva Blue gefärbten SDS-Gelen oft schwer zu sehen. Mit Silbernitrat konnten aber nur die aufgereinigten Proteine angefärbt werden, da es durch den Melaningehalt der Proben zu so starken Interaktionen kam, dass die Gele nicht verwertbar waren (Abb. 3.18).

#### **4.6 Abgleich der Laccasen auf Gen- und Proteinebene**

In dieser Arbeit konnte das Vorliegen von mindestens drei aktiven Laccasen gezeigt werden (Abb. 3.14). Eine weitere Laccase könnte im Kulturüberstand von *H. acidophila* vorliegen (Tab. 3.11). Diese Zahl stimmt überein mit den Laccasegenen, die für *H. acidophila* bestimmt wurden (Tetsch, 2005). Die Sequenzen zweier Laccasegene wurden in der zitierten Arbeit vollständig bestimmt, zwei weitere Teilsequenzen wurden gefunden. Betrachtet man diese Ergebnisse zusammen, ist es sehr wahrscheinlich, dass mindestens drei der Gene auch exprimiert werden. Die vierte Laccase, L (65), wurde nur vereinzelt in Extrakten von *H. acidophila* nachgewiesen. Es kann also sein, dass es sich um eine induzierbare Laccase handelt, die unter den gegebenen Bedingungen herunterreguliert ist oder gar nicht gebildet wird. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die Zuordnung der einzelnen aktiven Laccasen zu den Laccasegenesequenzen. Deshalb wurden die N-terminalen Aminosäuresequenzen von L (55) aus dem Zellextrakt und L (70) aus dem Kulturüberstand ermittelt (Abb. 3.31). Allerdings waren die Sequenzen nicht ganz eindeutig, da es z.T. zur Überlagerung von Signalen gekommen war. Die wahrscheinlichen Aminosäuresequenzen wurden mit den annotierten Aminosäuresequenzen verglichen, die Frau Dipl. Biol. Larissa Tetsch von den vollständig bestimmten Laccasegenen *lacc1* und *lacc2* abgeleitet hatte (Tetsch, 2005). Die N-terminalen Bereiche der anderen Laccasegene sind unbekannt.

Der Vergleich mit den ersten 120 N-terminalen Aminosäuren zeigte eine Homologie von 90 % zwischen L (70) und Lacc1 und eine nur geringere Homologie von 50% zwischen L (55) und Lacc2 (Abb. 4.3). Es wurden weder Ähnlichkeiten zwischen Lacc2 und L (70) noch zwischen Lacc1 und L (55) gefunden. Dass es sich bei L (55) tatsächlich um Lacc2 handelt, ist aber unwahrscheinlich, da der ähnliche Sequenzbereich relativ weit vom N-terminalen

Ende entfernt lag. Geht man davon aus, dass es sich bei dem eingesandten L (55) um ein intaktes Protein handelte, ist auszuschließen, dass L (55) und Lacc2 identisch sind, da ansonsten die ersten Kupferbinderegionen bei der Prozessierung abgeschnitten worden wären, was wohl zu einem nicht-funktionalen Enzym geführt hätte. Da die ermittelte Homologie gering ist, ist es wahrscheinlicher, dass L (55) einem der anderen Laccasegene (*lacc3* oder *lacc4*) zuzuordnen ist, für die die N-terminale Aminosäuresequenzen noch nicht bekannt sind. Außerdem weist *lacc2* keine Signalsequenz für den Austransport aus der Zelle auf (Tetsch, 2005). Da es sich bei L (55) wahrscheinlich um eine zellwandgebundene Laccase und damit um ein extrazelluläres Enzym handelt, ist die Übereinstimmung von L (55) mit Lacc2 also eher unwahrscheinlich. Die N-terminale Aminosäuresequenz von L (70) stimmte zu 90 % mit der annotierten Sequenz von Lacc1 überein (Abb.4.4). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass L (70) und Lacc1 identisch sind, obwohl die ermittelte Sequenz ein Stück vor der errechneten Spaltungsstelle für die Signalsequenz liegt. In der Regel werden N-terminal um die 20 Aminosäuren (Propeptid) bei der Reifung einer Laccase abgeschnitten, was auch mit der von Frau Dipl. Biol. L. Tetsch errechneten Spaltungsstelle übereinstimmt. Es wurden aber auch schon kürzere Propeptide bei Laccasen beschrieben. Dies trifft z.B. für die Laccase aus *Coprinopsis cinerea* zu, bei der dieses N-terminale Propeptid nur vier Aminosäuren lang ist (Yaver *et al.*, 1999). Bei L (70) wäre das Propeptid 10 Aminosäuren lang, was demnach nicht typisch, aber auch nicht unrealistisch wäre. Außerdem gibt es neben der Aminosäuresequenz andere Hinweise auf die Identität von L (70) und Lacc1: Das Molekulargewicht von L (70) liegt um 70 kDa (Tab. 3.12). Für das reife, deglykosylierte Protein wurde ein Molekulargewicht von etwa 65 kDa ermittelt. Bei Abspaltung der Signalsequenz vor der N-terminalen Aminosäuresequenz von L (70) errechnet sich aus dem *lacc1*-Gen ein hypothetisches Molekulargewicht von 63 kDa. Die Molekulargewichte stimmen also in etwa überein. Weiterhin deuten das Vorhandensein der Signalsequenz und die potenziellen Glykosylierungsstellen von *lacc1* (Tetsch, 2005) auf ein extrazelluläres Enzym hin. L (70) ist definitiv extrazellulär und liegt außerdem glykosyliert vor, was ebenfalls für eine Übereinstimmung von Lacc1 und L (70) spricht.

Bei Lacc2 handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein intrazelluläres Enzym, da keine typischen Signalsequenzen für den Austransport und nur wenige Glykosylierungsstellen gefunden wurden (Tetsch, 2005). Signalsequenzen für melanosomen-ähnliche Vesikel sind in der Literatur bislang nicht beschrieben. Da es sich bei diesen Vesikeln um peroxisomenähnliche Zellkompartimente handelt, könnten hier ähnliche Signalsequenzen

zugrunde liegen. Für Peroxisomen ist eine C-terminale PST-Signalsequenz typisch, neuerdings wurde auch eine weitere N-terminale Signalsequenz beschrieben, die aber noch nicht näher charakterisiert wurde (Drescher *et al.*, 2005). Nimmt man nun an, dass es für die melanosomen-ähnlichen Vesikel auch spezifische Signalsequenzen gibt, die beim reifen Protein entfernt werden, könnte das reife Enzym wesentlich kleiner sein, als die errechneten 55 kDa. Demnach könnte es sich bei Lacc2 um L (85) handeln, das in diesem Fall in seiner aktiven Form als Tetramer vorliegen würde. Tetramere sind für Laccasen beschrieben worden, z.B. bei der Laccase aus *Podospira anserina*. Bei der 85 kDa großen Laccasebande, die nach Reduktion der Probe gefunden wurde, könnte es sich um ein Dimer oder Aggregat zweier Untereinheiten der Laccase handeln. Insgesamt erscheint es wahrscheinlich, dass es sich bei L (85) um Lacc2 handelt, da es sich wie aus der Gensequenz vorhergesagt um ein nicht-glykosyliertes intrazelluläres Enzym handelt. Wie gesagt sind intrazelluläre Laccasen durchaus unüblich, so dass das Vorliegen weiterer intrazellulärer Laccasen in *H. acidophila* eher unwahrscheinlich ist.

<b>Lacc1</b>	MAAHLILGALM	LGSA	LAI	SY	HKPAWIPLGDSLSPRLGQDVTNGNGVLGTLDAPRLAKFLP	60	
<b>L (70)</b>	-----	ELGS	LAI	SY	-----	10	
		*****					
<b>Lacc2</b>	MAFLINNQFP	GPM	IKAN	WGD	TVVVKLTNLLPNSIDNGTSL	60	
<b>L (55)</b>	-----	-----	-----	-----	HFHGV	-----	
<b>Lacc2</b>	QCPLAPGDTMTYTWR	ATSY	GS	WW	HS	SLQTYEGMFGPLVIEG	120
<b>L (55)</b>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
					-----	9	
					-----		
					: ** *		

**Abb. 4.3:** Sequenzvergleiche der N-terminalen Aminosäuresequenzen der 70 kDa großen Laccase (oben) und der 55 kDa großen Laccase (unten) mit den ersten 120 Aminosäuren der annotierten Sequenzen der Gene *lacc1* und *lacc2*. \* = Übereinstimmung, : = ähnliche Aminosäure. Die Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW durchgeführt. Für die N-terminalen Aminosäuresequenzen von L (70) und L (55) wurden 10 Aminosäuren über Edman-Verdau bestimmt. L (70) = wahrscheinliche N-terminale Aminosäuresequenz der 70 kDa große Laccase aus dem Kulturüberstand, L (55) = wahrscheinliche N-terminale Aminosäuresequenz der 55 kDa große Laccase aus dem Zellextrakt von *H. acidophila*; grün: Kupferbinderegionen *cbs1* und *cbs2*.

Während sich die Sequenzen von basidiomycetischen Laccasen oft ähneln, sind die Unterschiede bei Laccasen aus Ascomyceten in der Regel groß. In Abb. 4.4 ist ein Vergleich von N-terminalen Aminosäuresequenzen von Laccasen aus verschiedenen Pilzen dargestellt. Die Laccasen aus *H. acidophila* weisen keine signifikanten Ähnlichkeiten mit Laccasen aus anderen Pilzen auf. Dies ist bei Betrachtung dieses kurzen Sequenzstückes aber nicht verwunderlich, da ascomycetische Laccasen nur eine Sequenzähnlichkeit von ca. 20% aufweisen (Kiiskinen *et al.*, 2002). Die Laccasegene aus *H. acidophila* sind außerdem, vor



allem an den Enden, kaum konserviert (Tetsch, 2005). Auffällig ist, dass auch die N-terminale Aminosäuresequenz der basidiomycetischen Schwarzen Hefe *C. neoformans* von denen der anderen Basidiomyceten abweicht. Dies hängt möglicherweise mit den unterschiedlichen Funktionen zusammen, denn in *C. neoformans* ist die Laccase ein Virulenzfaktor während die Laccasen der Basidiomyceten überwiegend zur Delignifizierung von Holz genutzt werden.

1	<i>T. gallica</i> Lac I	A	I	G	P	V	A	D	L	T	I	Basidiomyceten
2	<i>T. gallica</i> Lac II	S	I	G	P	V	A	D	L	T	I	
3	<i>T. versicolor</i> Lac II	G	I	G	P	V	A	D	L	T	I	
4	<i>P. ostreatus</i> Lac I	A	I	G	P	T	G	D	M	Y	I	
5	<i>C. neoformans</i>	X	K	T	D	E	S	P	E	A	V	
<hr/>												
6	<i>N. crassa</i>	G	G	G	G	G	N	S	P	T	Ascomyceten	
7	<i>G. graminis</i> Lac II	T	A	T	T	R	S	K	W	C		D
8	<i>M. albomyces</i>	S	P	T	C	N	T	P	S	N		R
9	<i>A. nidulans</i>	M	Y	L	S	T	V	L	F	P		L
10	<i>C. thermophilum</i>	F	N	P	P	L	L	P	S	L		E
11	<i>B. cinerea</i>	G	T	T	M	H	W	H	G	I		R
12	<i>P. anserina</i>	A	P	S	L	P	G	V	P	R		E
13	<i>H. acidophila</i> L (70)	M	L	G	S	A	L	A	I	S		Y
14	<i>H. acidophila</i> L (55)	K	K	K	P	S	T	S	S	Y	P	

**Abb. 4.5: Vergleich von N-terminalen Aminosäuresequenzen verschiedener Pilze.** Die konservierten Regionen bzw. übereinstimmende Aminosäuren wurden jeweils farblich markiert. Die Basidiomyceten *Trametes gallica*, *Trametes versicolor* und *Pleurotus ostreatus* zeigen große Ähnlichkeiten untereinander: Eine Ausnahme bildet die basidiomycetische Schwarze Hefe *Cryptococcus neoformans*, deren Sequenz genauso wenig Ähnlichkeiten aufweist wie die ascomycetischen Laccasen. Die Sequenzen der Ascomyceten weisen kaum signifikante Übereinstimmungen auf.

Referenzen: 1, 2, 3, 4: Dong & Zhang, 2004; 5, 6, 10, 11: Chefetz *et al.*, 1998; 7: Litvintseva & Henson, 2002; 8: Kiiskinen *et al.*, 2002; 9: Aramayo & Timberlake, 1990; 12: Fernandez-Larrea & Stahl, 1996.

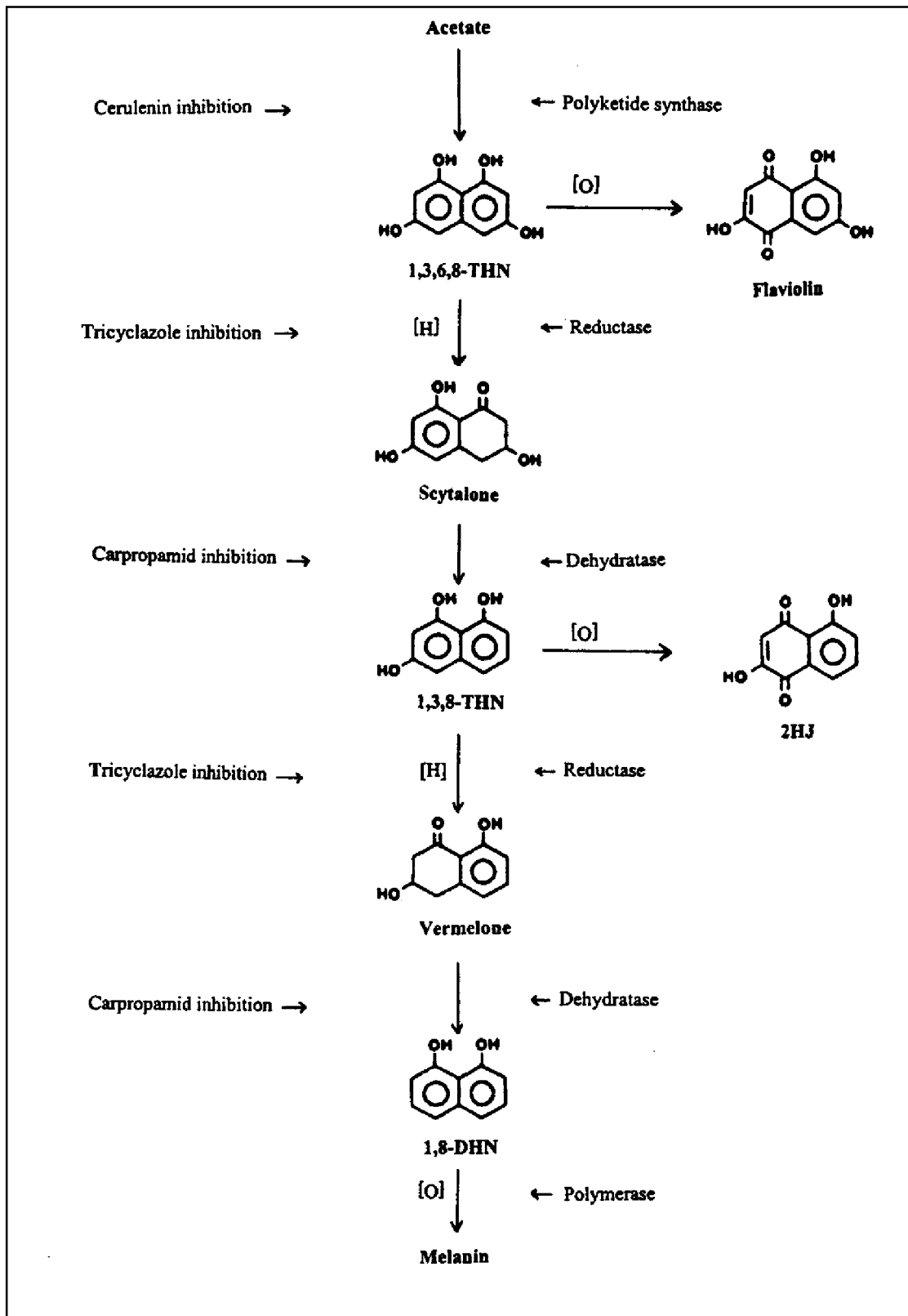
#### 4.7 Charakterisierung des *H. acidophila*-Melanins

Nach Butler & Day (1998) bilden die meisten Ascomyceten das so genannte DHN-Melanin, das aus den Monomeren 1,8-Dihydroxynaphthalin aufgebaut ist. Um zu untersuchen, ob es sich bei dem von *H. acidophila* gebildeten Pigment auch um DHN-Melanin handelt, wurden Inhibitionsversuche mit Tricyclazol durchgeführt. Dieses Fungizid verhindert den Pflanzenbefall durch phytopathogene Pilze, indem den Pilzen aufgrund fehlenden Melanins die Möglichkeit genommen wird, die Pflanzenzelle zu penetrieren. Es handelt sich also nicht um ein Fungizid im eigentlichen Sinne, das zum Absterben der Pilze führt. Deshalb kann Tricyclazol gezielt zur Untersuchung des Melanins eingesetzt werden, ohne die Pilze signifikant zu schädigen. Tricyclazol hemmt die DHN-Melanin-Synthese direkt nach dem

ersten Zwischenprodukt 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin (1,3,6,8-THN), das in der Folge nicht zu Scytalon reduziert werden kann (Abb. 4.5). Mutationsanalysen haben gezeigt, dass bei Hemmung dieses Schrittes rot-braune statt der sonst üblichen grün-schwarzen Kolonien entstehen und dass rot-braune wasserlösliche Pigmente ins Medium ausgeschieden werden. Nach Butler & Day entsteht diese veränderte Färbung durch Autoxidation des 1,3,6,8-THN, wobei hauptsächlich Flaviolin entsteht. Ein weiteres Nebenprodukt ist 2-Hydroxyjuglon, das durch Autoxidation von 1,3,8-Trihydroxynaphthalin (1,3,8-THN) entsteht. Die Reduktion von 1,3,8-THN zu Vermelon wird nämlich durch Tricyclazol ebenfalls gehemmt (Abb. 4.5).

Auch *H. acidophila* Kulturen zeigten unter Zusatz von Tricyclazole eine deutlich braunrötliche Färbung statt der sonst normalen grün-schwarzen Pigmentierung der Kulturen (Abb. 3.22). Da dies genau die erwartete Reaktion ist, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich bei dem von *H. acidophila* gebildeten Melanin um DHN-Melanin handelt. Denn auch *H. werneckii*, die nächste bekannte Verwandte von *H. acidophila* bildet DHN-Melanin (Kogej *et al.*, 2004). Letztendlich beweisen könnte man das Vorliegen von DHN-Melanin aber nur durch eine HPLC-Analyse der ins Medium abgegebenen und akkumulierten Substanzen. Eine solche Analyse war für die hier vorliegende Arbeit aber zu aufwändig, da die Bestimmung des Melanins nicht das primäre Ziel der Arbeit war.

Melanin wird prinzipiell eine Schutzwirkung für Mikroorganismen zugesprochen (Butler & Day, 1998, Bell & Wheeler, 1986). Neben dem Schutz vor der Immunantwort des Wirtes bei pflanzen- und humanpathogenen Arten, wurde insbesondere der Schutz vor UV-Licht, Austrocknung, lytischen Enzymen und hohen Schwermetallkonzentrationen hervorgehoben (Henson *et al.*, 1999; de Hoog *et al.*, 2000; Fogarty & Tobin, 1996). Auch für *H. acidophila* wurde ein Schutz des Melanins gegen hohe Kupferkonzentrationen nachgewiesen: Die Versuche zur Unterdrückung der Melaninbildung durch Zusatz von Ascorbinsäure liefen nur in Medium mit niedriger Kupferkonzentration ab. Bei 250 µM Kupfersulfat im Medium und Zusatz von Ascorbinsäure fand kein Wachstum mehr statt. Konnten die Zellen also kein Melanin bilden, war ein Wachstum bei hohen Kupferkonzentrationen nicht möglich.



**Abb. 4.5: DHN-Melaninsyntheseweg mit den einzelnen Inhibitoren.** Tricyclazol hemmt jeweils die Reduktion des 1,3,6,8-THN und des 1,3,8-THN und führt so zur Anhäufung von Intermediärprodukten, die durch Autooxidation zu melaninähnlichen Polymeren weiterreagieren. Bildnachweis: Butler & Day (1998)

Man kann also von einer Schutzwirkung des Melanins für die *H. acidophila*- Zellen ausgehen. Diese Schutzwirkung basiert wahrscheinlich z.T. auf dem Einbau von Kupfer ins Melaningerüst, was durch Messung des Kupfergehaltes in den Zelltrümmern von *H. acidophila* bestätigt werden konnte. Ungefähr ein Drittel des Kupfers aus dem Medium konnte in den Zelltrümmern nach einem Zellaufschluss nachgewiesen werden (s. 3.4.7). Der Einbau von Kupfer in melanisierte pilzliche Zellen wurde auch beim Ascomyceten *G. graminis* untersucht. Hier wurden 3,5 mg Kupfer/ g Mycel detektiert (Bell & Wheeler, 1986). Dies ist im Vergleich zu den 5,4 mg/g Zellen, die bei *H. acidophila* gemessen wurde zwar etwas weniger. Da *G. graminis* aber nicht so stark melanisiert ist wie *H. acidophila*, ist dieser Wert durchaus realistisch. Auch die mechanische Festigkeit wird durch die Melanisierung der Zellwände von *H. acidophila* deutlich verstärkt. Denn ein Zellaufschluss mit nicht melanisierten Zellen (nach Anzucht unter Zusatz mit Ascorbinsäure) war im Gegensatz zum Aufschluss melanisierter Zellen aus normaler Anzucht unproblematisch.

Methodisch stellte das Vorhandensein von Melanin in den Proben ein großes Problem dar (s. 3.6.1.1). Deshalb wurden im Verlauf der Arbeit verschiedene Ansätze zur Eliminierung des Melanins aus den Proben untersucht. Die Kultivierung von *H. acidophila* unter Zusatz von Ascorbinsäure führte zu einer effektiven Hemmung der Melanisierung. Allerdings waren auch die Laccaseaktivitäten gering, da diese Kulturen nicht durch Kupfer induziert werden konnten, weil dann kein Wachstum mehr erfolgte. Erfolgreich war die Durchführung der Gelfiltration mit 6 kDa Ausschlussvolumen. Hierbei konnte unter geringem Verlust an Laccaseaktivität ein Großteil des Melanins aus den Proben entfernt werden. Wie schon erwähnt, findet sich in der Literatur für Melanin eine Größenangabe von 4 kDa. Dass ein Großteil des Melanins durch die Gelfiltration (6 kDa Ausschlussvolumen) entfernt werden konnte, deutet darauf hin, dass das Melanin aus *H. acidophila* eine ähnliche Größe, eben kleiner als 6 kDa besitzt. Aufgrund der radikalischen Polymerisierung ist es aber unwahrscheinlich, dass das Melanin eine einheitlich gleiche Größe hat. Das gleichzeitige Vorhandensein von größeren und kleineren Strukturen ist denkbar, was auch erklären würde, warum nicht das gesamte Melanin über die Trennung nach Größe aus der Probe entfernt werden konnte. In SDS-Gelen traten oft neben einem Schleier über den gesamten Bereich Banden bei 10-14 kDa auf (Abb. 3.3, Abb. 3.14, Abb. 3.30), bei denen es sich evt. ebenfalls um Melanin handeln könnte. Wahrscheinlich ist das Vorliegen mehrerer Melaninfraktionen unterschiedlicher Größe. Dies ist allein schon durch die unterschiedliche Herkunft des Melanins wahrscheinlich. Wie innerhalb dieser Arbeit postuliert wird das Melanin in

melanosomen-ähnlichen Vesikeln in der Zelle synthetisiert und dann zur Zellwand transportiert. Das Melanin in diesen Vesikeln hat sehr wahrscheinlich eine andere Struktur und Größe als später in der Zellwandauflagerung. Weiterhin gibt es extrazelluläres Melanin, das entweder durch Oxidation von melaninähnlichen Monomeren gebildet wird.

#### **4.8 Potenzielle Funktionen der Laccasen aus *H. acidophila***

In den meisten ascomycetischen Pilzen dient die Laccase der DHN-Melaninbildung (Butler & Day, 1998). Die Ergebnisse aus dem Melanininhibitionsversuch mit Tricyclazol legen nahe, dass auch *H. acidophila* DHN-Melanin bildet (Abb. 3.22). Da für diesen Syntheseweg eine Polymerase benötigt wird (Abb. 4.5), ist davon auszugehen, dass zumindest eine der *H. acidophila* Laccasen den letzten Schritt der Melaninsynthese katalysiert. Dass Melanin nicht gebildet wird, wenn keine Oxidation stattfindet, konnte durch Zusatz von Ascorbinsäure zu den Kulturen gezeigt werden (Abb. 3.20). Kulturen mit Ascorbinsäurezusatz blieben weiß, färbten sich aber innerhalb von Minuten schwarz, wenn die Ascorbinsäure aufgebraucht war. Wahrscheinlich kam es hier zu einer kompetitiven Hemmung der Laccasen durch den großen Ascorbinsäureüberschuss. Diese These wird außerdem bestärkt durch die Versuche zum Substratspektrum, bei denen gezeigt wurde, dass die Laccasen aus Kulturüberstand und Zellextrakt Ascorbinsäure umsetzen können (Tab. 3.7). Die Melaninmonomere 1,8-DHN müssen aber gebildet worden sein, da der Melaninsyntheseweg nicht gehemmt war, sondern nur der letzte Schritt, die Oxidation, nicht stattfinden konnte. War die Ascorbinsäure oxidiert, wurde nicht mehr Ascorbinsäure sondern das natürliche Substrat 1,8-DHN von den Laccasen umgesetzt und es kam zu einer schlagartigen radikalischen Polymerisierung der Melaninmonomere: Die Kulturen färbten sich schwarz. Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf eine Beteiligung der Laccasen an der Melaninsynthese hin. Ein Beweis könnte jedoch nur über das Ausschalten der Laccasegene geführt werden, da spezifische Inhibitoren für Laccasen nicht bekannt sind und deshalb eine spezifische Hemmung der Laccasen ausgeschlossen ist.

Da in *H. acidophila* mehrere Laccasen nachgewiesen wurden, ist wahrscheinlich, dass die einzelnen Enzyme unterschiedliche Funktionen erfüllen. Die extrazelluläre Laccase L (70) könnte z.B. auch dazu genutzt werden, schwer abbaubare Substrate zugänglich zu machen. Hinweise dazu gibt der Versuch zur Isolierung von *H. acidophila*. *H. acidophila* wurde aus einem Medium isoliert, das nur Fulvin- und Huminsäuren enthielt. Um dieses Substrat zu verstoffwechseln, könnte eine der Laccasen beigetragen haben. Auch die basidiomycetischen

Weißfäulepilze nutzen Laccasen zur Degeneration von Lignin und anderen komplexen Substanzen, auch wenn sich die Pilze dadurch in erster Linie die eingelagerten Proteine als Stickstoffquelle zugänglich machen (Gianfreda *et al.*, 1999). Ob Laccasen die Synthese oder den Abbau von Substraten bevorzugen, könnte mit der Größe der Substratbindetasche zusammen hängen (Hakulinen *et al.*, 2002). Durch die Bevorzugung von Monomeren als Substrat ist aber die Fähigkeit zur Oxidation komplexer Substrate nicht ausgeschlossen, so dass der tatsächliche Substratumsatz wohl hauptsächlich von der Verfügbarkeit des Substrates abhängt. Diese Nutzung von komplexen Substraten könnte deshalb auch ein sekundärer Effekt sein.

Einige nah verwandte Arten wie *Trimmatostroma abietes* sind Bewohner von Felsoberflächen (Butin *et al.*, 1996). Durch Melanin kommt es bei diesen Arten zu einer Bindung von Metallen aus dem Stein in die organische Masse (Henson *et al.*, 1999). Melanin und indirekt auch die Laccase ist somit bei diesen Organismen an der Beschaffung von Mikronährstoffen beteiligt.

Laccasen wurden auch schon vielfach als Pathogenitätsfaktoren in Phytopathogenen beschrieben (Henson *et al.*, 1999). Viele nahe Verwandte von *H. acidophila* sind pflanzenpathogen (Butin *et al.* 1996; Hölker *et al.*, 2004). Laccasen werden genutzt, um Appressorien durch Melaninsynthese zu verstärken, um in die Pflanzenzellen einzudringen oder um Pflanzenabwehrstoffe wie Phytoalexine zu oxidieren und damit unschädlich zu machen. Auf diese Art entstehen in pilzbefallenen Pflanzen oft „Kampffronten“ zwischen Pilz und Pflanze, die durch Barrieren aus polymerisierten Phytoalexinen gekennzeichnet sind. Auch reaktive Sauerstoffspezies, die als Schutzreaktion von der Pflanze gebildet werden, können durch von Laccasen gebildetes Melanin gebunden und unschädlich gemacht werden (Henson *et al.*, 1999). Die extrazellulären Laccasen könnten evolutiv als solche Pathogenitätsfaktoren entstanden sein. Aufgrund des weiten Substrat- und Wirkungsspektrums von Laccasen könnten diese Laccasen auch zum Abbau von Huminsäuren genutzt worden sein. Darüber hinaus ist aber auch noch nicht bekannt, ob es sich bei *H. acidophila* nicht auch um einen Pflanzenschädling handelt.

Auch bei humanpathogenen Pilzen wird die Laccase bzw. das durch sie gebildete Melanin als Pathogenitätsfaktor diskutiert (Gomez & Nosanchuk, 2003). Aufgrund der fehlenden Fähigkeit des Wachstums bei 37 °C und die extremophilen Ansprüche an den pH-Wert kann

für *H. acidophila* aber weitgehend ausgeschlossen werden, dass es sich um eine humanpathogene Hefe handelt. Pigmentierte Pilze sind oft pathogen oder opportunistisch wie z.B. *Cryptococcus neoformans*, *Exophiala dermatitidis* oder die halophile Schwarze Hefe *Hortaea werneckii*. *H. werneckii*, die nächste Verwandte von *H. acidophila*, ist nicht fähig bei 36 °C zu wachsen, erzeugt aber nur Hautmykosen, die unproblematisch zu behandeln sind (de Hoog & van den Ende, 1992). Wahrscheinlich handelt es sich bei der Pathogenität von *H. werneckii* um einen sekundären Effekt, der von gutem Wachstum auf der salzhaltigen menschlichen Haut herrührt (Göttlich *et al.*, 1995).

#### **4.9 Biotechnologische Nutzbarkeit der Laccasen aus *H. acidophila***

Generell eignen sich Laccasen für verschiedene biotechnologische Applikationen. So wurden sie für Detoxifizierungsprozesse verschmutzter Böden und Abwässer genutzt, zur Behandlung und Stabilisierung von Säften und Wein, zur Bleiche und Delignifizierung bei der Papierherstellung und zur Modifikation von Naturstoffen, z.B. zur Herstellung von Medikamenten. Für einige dieser Prozesse, z.B. bei der Modifikation von Naturstoffen oder der Behandlung von Getränken wie Wein und Säften ist eine katalytische Aktivität bei niedrigen pH-Werten notwendig. Da die Laccasen aus *H. acidophila* im Gegensatz zu den meisten bisher genutzten basidiomycetischen Laccasen neben dem niedrigen pH-Optimum in diesem Bereich auch ihre höchste Stabilität zeigen, könnten die Laccasen aus *H. acidophila* das Spektrum der vorhandenen Laccasen sinnvoll ergänzen. Laccasen mit einem so sauren pH-Optimum wie bei den Laccasen aus *H. acidophila* sind in der Literatur bislang nicht beschrieben, wohingegen andere extremophile Enzyme bereits untersucht wurden. So gibt es verschiedene neutrophile und alkaliphile (Kiiskinen *et al.*, 2002; Sulistyaningdyah *et al.*, 2004) sowie thermophile Laccasen (Chefetz *et al.*, 1998, Kiiskinen *et al.*, 2002).

Um die Laccasen aus *H. acidophila* industriell einsetzen zu können, muss auf jeden Fall das Problem der geringen Ausbeute im natürlichen System gelöst werden, was wahrscheinlich durch Überexpression gelingen kann. Ob die Laccasen tatsächlich für biotechnologische Applikationen eingesetzt werden können, kann zum jetzigen Zeitpunkt aber nicht mit letzter Sicherheit ausgesagt werden, da sich noch nicht vorhersehen lässt, ob sich ein ökonomisches und effektives System zur Laccasegewinnung und zum Einsatz der Laccase wird etablieren lassen. Das extrem niedrige pH-Optimum von L (85), die pH-Stabilität im Sauren und der

niedrige isoelektrische Punkt machen die Etablierung eines solchen Systems aber in jedem Fall lohnenswert.

#### **4.10 Ausblick**

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Laccasen in *H. acidophila* identifiziert, lokalisiert und z.T. charakterisiert. Außerdem konnte L (70) dem Laccasegen *lacc1* und L (85) dem Laccasegen *lacc2* zugeordnet werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen zu den pH-bezogenen Parametern wie pH-Optimum, pH-Stabilität und isoelektrischer Punkt machen die Nutzbarkeit der Laccasen für die Biotechnologie wahrscheinlich. Zumindest für die intrazelluläre Laccase L (85) erscheint die Produktion sinnvoll. Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage für eine weitergehende Charakterisierung der Laccasen aus *H. acidophila* geschaffen. Die nächsten Schritte wären nun die Überexpression der Laccasen in einem eukaryontischen System, z.B. einer Hefe oder einem filamentösen Pilz. Ein bakterielles System würde wegen der erforderlichen posttranslationalen Modifikation nicht ausreichen. In Hefen kommt es häufig zu einer Hyperglykosylierung (Otterbein *et al.*, 2000), wodurch auch ein Hefesystem nicht so viel versprechend ist. Als Expressionssystem bietet sich *Trichoderma reesii* an, da dieser Schimmelpilz leicht anzuziehen ist und schon für die ascomycetischen Laccasen aus *Melanocarpus albomyces* und *Myceliophthora thermophila* erfolgreich als Expressionssystem etabliert wurde (Kiiskinen *et al.*, 2004; Berka *et al.*, 1997). Durch die Überexpression könnten ausreichende Enzymmengen für eine vollständige Charakterisierung und ggf. zur biotechnologischen Nutzung der Laccasen gewonnen werden. Wohingegen die Laccase L (70) wahrscheinlich Lacc1 (Tetsch, 2005) entspricht, ist die vollständige Gensequenz von L (55) noch unbekannt. Mit Hilfe der ermittelten N-terminalen Aminosäuresequenz kann der Versuch unternommen werden, das zugehörige Gen zu identifizieren. Mittels der bekannten Gen- und Aminosäuresequenzen könnten dann drei der wahrscheinlich vier Laccasen aus *H. acidophila* überexprimiert werden.

Auch die Hypothese über die Lokalisation der Laccase L (85) in den melanosomen-ähnlichen Vesikeln könnte nun bewiesen werden. Innerhalb dieser Arbeit konnte die Hypothese nicht bestätigt werden, da eine Isolierung der Melanosomen aufgrund der stabilen Zellwand von *H. acidophila* nicht möglich war, weil die Zellkompartimente durch den hohen mechanischen Stress beim Zellaufschlussverfahren zerstört wurden. Da es sich bei L (85) wahrscheinlich um Lacc2 handelt, könnte man über ein GFP-Fusionsprotein mit *lacc2* im Fluoreszenzmikroskop nun nachweisen, ob L (85) tatsächlich in den melanosomen-ähnlichen Vesikeln vorliegt. Da es



sich bei L (85) wie gesagt wahrscheinlich um Lacc2 handelt, ist Lacc2 auch der aussichtsreichste Kandidat für eine Überexpression, da L (85) besonders interessante Eigenschaften (pH-Optimum 1,5 mit DMOP) aufweist.

Weiterhin könnte durch Untersuchungen auf RNA-Ebene geklärt werden, wie die Laccasen, insbesondere L (85), reguliert sind. Wenn nach Überexpression der Laccasen genug Material zur Verfügung steht, kann auch eine weitergehende Charakterisierung des Enzyms vorgenommen werden. Insbesondere Tests zur Bestimmung des Redoxpotenzials wären zur weiteren Abschätzung des biotechnologischen Potenzials der Laccasen wichtig. Die Analyse der Laccasegene ließ bereits auf ein mittleres bis stark positives Redoxpotenzial schließen (Tetsch, 2005), was auf ein breites Substratspektrum und breite Anwendungsmöglichkeiten hindeutet.

## 5 Zusammenfassung

Die kurz vor Beginn der vorliegenden Arbeit erstmals beschriebene acidophile Schwarze Hefe *H. acidophila* gehört zur Ordnung der Dothideales und bildet Melanin, aufgrund dessen die Synthese einer Laccase postuliert wurde. Laccasen sind oxidative Enzyme mit einem breiten Substratspektrum (u.a. Polyphenole), die Elektronen vom Substrat auf Sauerstoff übertragen. Die Laccasen aus *H. acidophila* waren deshalb so interessant, weil es aufgrund der Acidophilie der Hefe wahrscheinlich war, dass auch die oxidativen Enzyme an saures Milieu angepasst waren. Laccasen mit pH-Optimum und pH-Stabilität im sauren Bereich sind bisher selten beschrieben worden, aber sehr interessant für biotechnologische Applikationen.

In ersten Versuchen wurde zunächst die Hypothese über das Vorliegen einer extrazellulären Laccase in *H. acidophila* bestätigt. Um das Potenzial dieser Laccase(n) einschätzen zu können, wurden daraufhin zunächst einige Charakteristika wie pH-Optima, Substratspektrum und Stabilitätsparameter ermittelt. Da *H. acidophila* noch vollkommen unbekannt und die gebildeten Laccaseaktivitäten sehr gering waren, wurden zunächst die Wachstumsbedingungen auf die extrazelluläre Laccaseaktivität hin optimiert. Die Wachstumszeit konnte dabei halbiert werden, was für die späteren Fermentationen eine große Zeitersparnis darstellte und die Laccaseaktivitäten wurden um das 70fache gesteigert.

Außerdem bestand die Notwendigkeit, die Laccase(n) zu isolieren, aufzukonzentrieren und aufzureinigen. Dazu wurde im Verlauf der Arbeit eine Methode zum Zellaufschluss etabliert, was aufgrund der stabilen, melaninhaltigen Zellwand aufwändig war. Auch die Isolierung der Laccaseaktivität aus dem melaninhaltigen Kulturüberstand war problematisch, da das Melanin durch Viskosität und Verblockung der Ultrafiltrationsmembranen die Aufkonzentrierung stark begrenzte und darüber hinaus verschiedene Methoden beeinträchtigte. Ein großer Teil der vorliegenden Arbeit bestand also in der Eliminierung der Melaninkomponente aus den Proben, was durch Gelfiltration mit EconoPac 10 DG zum großen Teil gelang.

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Extrakte auf Laccaseaktivität hin untersucht und die Laccasen mittels Immunhybridisierung im Western-Blot lokalisiert. Dabei stellte sich heraus, dass *H. acidophila* mindestens drei, möglicherweise vier verschiedene aktive Laccasen bildet: L (85), L (70) und L (55) sowie evt. L (130). Dabei lag L (85) aktiv im Zellextrakt vor und L (70) wurde im Kulturüberstand nachgewiesen. L (55) war mit den *H. acidophila* Zellen assoziiert und konnte von diesen abgewaschen werden.

L (55) konnte als Kontamination auch im Kulturüberstand und im Zellextrakt nachgewiesen werden. Trotz geringer Enzymkonzentrationen konnten den Laccasen bereits einige Charakteristika zugeordnet werden (Tab. 3.13). Bei L (70) und L (55) handelt es sich wahrscheinlich um Dimere, wohingegen L (85) möglicherweise eine tetramere Struktur aufweist.

L (55) wurde in einem drei Schritte umfassenden Reinigungsprotokoll homogen (aus dem Zellextrakt) bzw. partiell (aus dem Kulturüberstand) aufgereinigt. Als Methoden wurden hierbei Ultrafiltration, Gelfiltration und Kationenaustauschchromatographie genutzt. Auch L (70) konnte mit den genannten Methoden partiell aufgereinigt werden. Von beiden Laccasen wurde die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt. Diese erlaubte die Zuordnung der Laccase L (70) zu Lacc1 (Tetsch, 2005) und zeigten praktisch keine konservierten Bereiche im Vergleich zu anderen ascomycetischen Laccasen, was typisch für diese ist. Eine Aufreinigung von L (85) aus dem Zellextrakt war mit den genutzten Methoden nicht möglich, da es nicht zu einer Bindung dieser Laccase an einen der Ionenaustauscher kam und im Zellextrakt naturgemäß zu viele Proteine vorlagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit L (85) erstmals eine intrazelluläre Laccase in einem Ascomyceten beschrieben. Diese Laccase zeigte darüber hinaus ein ungewöhnlich niedriges pH-Optimum (pH 1,5 mit DMOP) und eine Stabilität über fast den gesamten sauren Bereich. Das niedrige pH-Optimum macht eine Lokalisation im Cytosol unwahrscheinlich. Man kann davon ausgehen, dass sich die Laccase in melanosomen-ähnlichen Vesikeln befindet, wo das Melanin synthetisiert wird, bevor es zur Zellwand transportiert wird. Bei der Melaninsynthese handelt es sich um einen für die Ordnung Dothideales typischen Vorgang, da er sowohl in *C. carionii* als auch in *A. pullulans* beschrieben ist. L (85) ist höchst wahrscheinlich mit Lacc2 (Tetsch, 2005) identisch. Neben der intrazellulären Laccase L (85) sind aber auch die anderen Laccasen aus *H. acidophila* interessant, da alle im Sauren eine hohe Stabilität aufweisen und einen niedrigen pI besitzen.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass es mindestens drei verschiedene Laccasen in *H. acidophila* gibt, von denen insbesondere L (85) interessante Eigenschaften in Bezug auf die Säuretoleranz aufweist. Diese Ergebnisse und die Charakterisierung der Laccasegene (Tetsch, 2005) schaffen die Grundlage für eine Überexpression von L (85) und die weitere Nutzung dieser Laccase für industrielle Applikationen.

## 6. Literatur

- Agematu, H, K Kominato, N Shibamoto, T Yoshioka, H Nishida, R Okamoto, T Shin, S Murao** (1993). Transformation of 7-(4-hydroxyphenylacetamido) cephalosporinc acid into a new cephalosporin antibiotic, 7-[1-oxaspiro(2.5)octa-6-oxo-4,7-diene-2-carboxamido]cephalosporanic acid, by laccase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1387-1388.
- Aghajanyan AE, AA Hambardzumyan, AS Hovsepyan, RA Asaturian, AA Vardanyan AA Saghyan** (2005) Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin. *Pigment Cell Res.* 18(2):130-5.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K, Watson, JD.** (1995) Molekularbiologie der Zelle, , VCH Weinheim, Deutschland.
- Assavanig, A., B. Amornkitticharoen, B, Ekpaisal, N, Meevootisom, V, Flegel, T.W** (1992) Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*, *Appl Microbiol Biotechnol* 38: 198-202.
- Bell, A. A., M. H. Wheeler** (1986) Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann Rev Phytopathol* 24:411-451.
- Berka, RM.; P. Schneider, E. J. Golightly, S. H. Brown, M. Madden, K. M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf, and F. Xu.** (1997) Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 63 (8):3151-3157.
- Bollag, J.-M., RD Sjoblad, SY Liu** (1979) Characterization of an enzyme of *Rhizocotina praticola* which polymerizes phenolic compounds. *Can J Microbiol* 25: 229-233.
- Bollag, J.-M.; KL Shuttleworth, DH Anderson** (1988) Laccase-mediated Detoxification of phenolic compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (12):3086-3091.
- Bourbonnais, RD Leech, MG Paice** (1998) Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochim Biophys Acta* 1379: 381-390.
- Bradford, M** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Burba P, H Geltenpoth, J Nolte** (2005) Ultrafiltration behavior of selected pharmaceuticals on natural and synthetic membranes in the presence of humic-rich hydrocolloids. *Anal Bioanal Chem.* 382(8):1934-41.
- Butin, H; L Pehl, GS de Hoog, U Wollenzien** (1996) *Trimmatostroma abietis* sp. nov. (hyphomycetes) and related species. *Antonie van Leeuwenhoek* 69 (3):203-209.
- Butler MJ, AW Day** (1998) Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol* 44:1115-1136.

- Call, HP, I Mücke.** (1997) History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym® –process). *J. Biotechnol.* 53:163-202.
- Caesar- Tonthat, TC, F Van Ommen Kloeke, GG Geesey, JM Henson.** (1995) Melanin Production by a Filamentous Soil Fungus in Response to Copper and Localization of Copper Sulfide by Sulfide- Silver Staining. *Appl Environl Microbiol* 61(5):1968-1975.
- Castro-Sowinski, S; G Martinez-Drets, Y Okon.**(2002) Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS* 209:119-125.
- Chefetz, B; Y Chen, Y Hadar.** (1998) Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification. *Appl Environ Microbiol* 64 (9):3175-3179.
- Chen S, D Ma, W Ge, JA Buswell** (2003) Induction of laccase activity in the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiol Lett.* Jan 21;218(1):143-8.
- Childs, RE, WG Bardsley** (1975) The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'azino-di-(-3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *J Biochem* 145:93-103.
- Claus, H** (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* 179 (3):145-150.
- Clutterbuck, AJ** (1972) Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* 70 (3):423-435.
- Coll, P.M.; JM Fernandez-Abalos, JR Villanueva, R Santamaria, P Perez.** (1993) Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Appl Environ Microbiol* 59 (8):2607-2613.
- Collins, PJ., AD Dobson** (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 63:3444-3450.
- Da Cunha, A., AM Barbosa, EC Giese, RFH Dekker** (2003) The effect of carbohydrate sources on the production of constitutive and inducible laccases by *Botryosphaeria* sp. *J Basic Microbiol* 43(5): 385-392.
- de Hoog, G.S.; AHG Gerrits van den Ende** (1992) Nutritional pattern and eco-physiology of *Hortaea werneckii*, agent of human Tinea nigra. *Antonie van Leeuwenhoek* 62 (321):329.
- de Hoog, GS.** (1993) Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. *Antonie van Leeuwenhoek* 63: 105-109.
- de Hoog, GS; Q Telles, G Haase, G Fernandez-Zeppenfeldt, DA Angelis, AHG Gerrits van den Ende, T Matos, H Peltroche-LLacsahuanga, AA Pizzirani-Kleiner, J Rainer, N Richard-Yegres, V Vicente, and F Yegres.** (2000) Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Medical Mycology* 38:243-250.
- de Hoog, G.S.,** (1999) Ecology and evolution of black yeasts and their relatives. *Studies in Mycology* 43, Baarn/ Delft, Niederlande.

- Doerge, DR, RL Divi, MI Churchwell** (1997) Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. *Anal Biochem* 250, 10-17.
- Dong JL, YZ Zhang.** (2004) Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus *Trametes gallica*. *Prep Biochem Biotechnol.* 34(2):179-94.
- Drescher, DC, MJ Schmitt** (2005) Protein co-import of yeast catalase A into mitochondria and peroxisomes. Posterbeitrag auf dem VAAM-Symposium "Molecular Biology of Fungi", September 2005 in Bochum.
- Dubernet, M; P Ribereau-Gayon, HR Lerner, E Harel, AM Mayer** (1977) Purification and properties of laccase from *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 16:191-193.
- Edens, WA; TQ Goins, D Dooley, JM Henson.** (1999) Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl Environ Microbiol* 65 (7):3071-3074.
- Eisenberg, H., EJ Wachtel** (1987) Structural studies of halophilic proteins, ribosomes and organelles of bacteria adapted to extreme salt concentrations. *Annu Rev Biophys Chem* 16: 69-92.
- Feng, B; X Wang, M Hauser, S Kaufmann, S Jentsch, G Haase, JM Becker, PJ Szaniszló.** (2001) Molecular cloning and characterization of WdPKS1, a gene involved in dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis and virulence in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. *Infection and Immunity* 69 (3):1781-1794.
- Fernandez, E; A Sanchez-Amat, F Solano** (1999) Location and catalytic characteristics of a multipotent bacterial polyphenol oxidase. *Pigment Cell Research* 12:331-339.
- Fernandez-Larrea, J., U Stahl** (1996). Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* 252: 539-551.
- Fogarty RV, JM Tobin** (1996) Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb Technol.* 19(4):311-7.
- Gadd, GM, L de Rome** (1988) Biosorption of copper by fungal melanins. *Appl Microbiol Biotechnol* 29: 610-617.
- Galhaup C, D Haltrich** (2001) Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56(1-2):225-32.
- Gianfreda, L; F Xu, JM Bollag** (1999) Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal* 3 (1):1-25, 1999.
- Giardina, P, V Aurilia, R Cannio, L Marzullo, A Amoresano, R Siciliano, P Pucci, G Sannia** (1996) The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 61: 2408-2413.
- Gomez, B.; JD Nosanchuk.** (2003) Melanin and fungi. *Curr Opin Infekt Dis* 16:91-96.

- Göttlich, E, GS de Hoog, S Yoshida, K Takeo, K Nishimura, M Miyaji** (1995) Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycoses* 38: 489-494.
- Hakulinen, N; LL Kiiskinen, K Kruus, M Saloheimo, A Paananen, A Koivula, J Rouvinen.** (2002) Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat Struct Biol* 9 (8):601-605.
- Hamilton, A.J; BL Gomez.** (2003) Melanins in fungal pathogens. *J Med Microbiol* 51:189-191.
- Henson, J.M; MJ Butler, AW Day.** (1999) The dark side of the mycelium: Melanins of Phytopathogenic Fungi. *Annu Rev Phytopathol* 37:447-471.
- Higgins D, J Thompson, T Gibson, JD Thompson, DG Higgins, TJ Gibson** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.
- Hoegger, PJ, M. Navarro-González, S. Kilaru, M. Hoffmann, ED. Westbrook, U. Kües** (2004) The laccase family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Curr Gen* 45:351-355.
- Hoffmann CS, F Winston** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherischia coli*. *Gene* 57: 267-272.
- Hölker U, J Dohse, and M Höfer** (2002) Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol (Praha)* 47 (4):423-427.
- Hölker U, H Schmiers, S Grosse, M Winkelhofer, M Polsakiewicz, S Ludwig, J Dohse, M Höfer.** (2002) Solubilization of low-rank coal by *Trichoderma atroviride*: evidence for the involvement of hydrolytic and oxidative enzymes by using <sup>14</sup>C-labelled lignite. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 28(4):207-12.
- Hölker U, M Höfer, J Lenz** (2004) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(2):175-86.
- Hölker, U, J Bend, R Pracht, L Tetsch, T Müller, M Höfer, GS de Hoog** (2004) *Hortaea acidophila*, a new acid-tolerant black yeast from lignite. *Antonie van Leeuwenhoek* 86: 287-294.
- Hoopes, JT, JFD Dean** (2001) Staining Electrophoretic Gels for Laccase and Peroxidase Activity Using 1,8-Diaminonaphthalene. *Anal Biochem* 298: 96-101.
- Jakob, H; M Del Grosso, A Küver, N Nimmerfroh, HU Süß.** (1999) Delignifizierung von Zellstoff mit Laccase und Mediator - Ein Konzept mit Zukunft? *Papier* 53 (2):85-95.
- Junghanns, C, M Moeder, G Krauss, C Martin, D Schlosser** (2005) Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151:45-57.

- Kiiskinen, LL, L Viikari, K Kruus.** (2002) Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59 (2-3):198-204.
- Kiiskinen, L; K Kruus, M Bailey, E Ylosmaki, M Siikaaho, M Saloheimo** (2004) Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology* (2004), 150, 3065–3074.
- Ko, EM; YE Leem, HT Choi.** (2001) Purification and characterization of laccase isozymes from the white- rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 57 (1-2):98-102.
- Kogej, T, MH Wheeler, T Rizner, N Gunde-Cimerman** (2004) Evidence for 1,8-Dihydroxynaphthalene melanin in three halophilic black yeasts grown under saline and non-saline conditions. *FEMS Letters* 232 (2):203-209.
- Kundu M, J Basu, M Guchhait, P Chakrabarti** (1987) Isolation and characterization of an extracellular lipase from the conidia of *Neurospora crassa* *J Gen Microbiol.* 133(1):149-53.
- Langfelder, K; M Streibel, B Jahn, G Haase.** (2003) Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* 38:143-158.
- Leitner, CJ Hess, C Galhaup, R Ludwig, B Nidetzky, KD Kulbe, D Haltrich** (2002) Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Appl Biochem Biotechnol* 98-10:497-507.
- Leonowicz, A, K Grzywnowicz** (1981) Quantitative estimation of laccase forms in some white rot fungi using syringaldazine as substrate. *Enzyme Microb. Technol.* 3: 55-58.
- Lindequist, U, F Schauer** (2002) Bioaktive Naturstoffe und neue Möglichkeiten zu ihrer Derivatisierung. *BIOforum* 4:212-214.
- Litvintseva AP, Henson JM** (2002) Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus *Appl Environ Microbiol.* 68(3):1305-11.
- Marbach I, E Harel, AM Mayer** (1984) Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry* 23 (12):2713-2717.
- Mayer AM** (1987) Polyphenoloxidases in plants - recent progress. *Phytochemistry* 26 (1):11-20.
- Mayer AM, I Marbach, A Marbach, A Sharon.** (1977) Amino acid composition and molecular weight of *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry* 16:1051-1052.
- Mayer, AM, RC Staples** (2002) Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60:551-565.
- McCoy-Messer, JM, RC Bateman** (1993) Instability of the ABTS/ peroxidase reaction product in biological buffers. *Biotechniques* 15(2):270-3.



- McIlvaine, TC** (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* 49: 185-186.
- Minuth, W, M Klischies, K Esser** (1978) The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. Structural differences between laccases of high and low molecular weight *Eur J Biochem* 90: 73-82.
- Mittag, H** (1993) The fine structure of *Hortaea werneckii*. *Mycoses* 36:343-350.
- Nagai, M, M Kawata, H Watanabe, M Ogawa, K Saito, T. Taksawa, K Kanda, T Sato** (2003) Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* 149: 2455-2462.
- Nosanchuk, D, A Casadevall** (2003) The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 5 (4): 203-223.
- Otterbein, L, E Record, S Longhi, M Asther, S Moukha** (2000) Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris*. *FEBS* 267: 1619-1625.
- Palmieri G, C Bianco, G Cennamo, P Giardian, G Marino, M Monti, G Sannia** (2001) Purification, characterization and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 67 (6): 2754-2759.
- Perry, CR, M Smith, CH Britnell, DA Wood, CF Thurston** (1993) Identification of two Laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol* 139: 1209-1218.
- Petrovic U, N Gunde-Cimerman, A Plemenitas.** (2002) Cellular responses to environmental salinity in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii*. *Mol Microbiol* 45 (3):665-672.
- Pilz, R, E Hammer, F Schauer, U Kragl** (2003) Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 707-712.
- Piontek K, M Antorini, T Choinowski.**(2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem.*
- Pracht, R,** (2002) Physiologische Charakterisierung einer bisher unbeschriebenen pH-toleranten schwarzen Hefe unter besonderer Berücksichtigung einer an der Melaninbildung beteiligten Laccase. Diplomarbeit, Universität Bonn.
- Prillinger, HK Lopandic, W Schweigkofler, R Deak, HJM Aarts, R Bauer, K Sterflinger, GF Kraus, A Maraz** (2002) Phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the ascomycota and basidiomycota. In: Fungal allergy and pathogenicity. *Chem Immunol* Vol. 81 (Breitenbach, Cramer, Lehrer): 207-295.

- Rademaker GJ, SA Pergantis, L Blok-Tip, JI Langridge, A Kleen, JE Thomas-Oates** (1998) Mass spectrometric determination of the sites of O-glycan attachment with low picomolar sensitivity. *Anal Biochem.* 257(2):149-60.
- Raeder, U, P Broda** (1988) Preparation and characterization of DNA from lignin degrading fungi. *Method Enzymol* 161: 211-220.
- Ratcliffe, B, WH Flurkey, J Kuglin, R Dawley.** (1994) Tyrosinase, laccase, and peroxidase in mushrooms (*Agaricus*, *Crimini*, *Oyster*, and *Shiitake*). *Journal of Food Science* 59 (4):824-827.
- Reid, ID** (1995) Biodegradation of lignin. *Can J Bot*, 73: 1011-1018.
- Rehm, H** (2002) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics.* Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- Rinderknecht, H, MC Geokas, P Silverman, BJ Haverback.** (1968) A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin Chim Acta.* 21(2):197-203.
- Ruel, K, V Burlat, J Comtat, S Moukha, JC Moukha, M Asther, JP Joseleau** (1998) Visualization of the Action of Ligninolytic Enzymes on High-Yield Pulp Fibers. ACS Symposium Series, American Chemical Society (Washington DC), 10:116-32.
- Salas, SD, JE Bennett, KJ Kwon-Chung, JR Perfect, PR Williamson** (1996) Effect of the laccase gene CNLAC1, on virulence of *Cryptococcus neoformans*. *J Exp Med* 184(2):377-86.
- San-Blas, G, O Guanipa, B Moreno, S Pekerar, F San-Blas** (1996) *Cladosporium carrionii* and *Hormoconis resiniae* (*C. resiniae*): Cell wall and melanin studies. *Curr Microbiol* 32:11-16.
- Sanchez-Mirt, A, H Romero, G Fernandez-Zeppenfeldt** (1997) Growth and mycology of *Cladophialophora* (*Cladosporium*) *carrionii*. *Mycol Med* 7:1-4.
- Schäfer A., M Specht, A Hetzheim, W Francke, F Schauer** (2001) Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*. *Tetrahedron* 57:7693-7699.
- Schägger, H, Jagov, G** (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of the protein in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Scheel, T** (2000) Molekularbiologische Charakterisierung ligninolytischer Enzyme in den Weißfäulepilzen *Clitocybula dusenii*, i63-2 und *Nematoloma frowardii* vor dem Hintergrund ihrer biotechnologischen Nutzung. Dissertation, Universität Bonn.
- Scherer M, R Fischer.** (1998) Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* 170 (2):78-84.
- Schlosser, D, R Grey, W Fritsche** (1997) Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Appl Microbiol Biotechnol* 47: 412-418.

- Shao, J, AL Zydney** (2004) Retention of small charged impurities during ultrafiltration. *Biotechnol Bioeng* 87(1):7-13.
- Sharma S, S Wagh, R Govindarajan** (2002) Melanosomal proteins--role in melanin polymerization *Pigment Cell Res* 15(2):127-33.
- Solano, F, P Luca-Elio, D Lopez-Serrano, E Fernande, A Sanchez-Mirt** (2001) Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiol Letters* 204:175-181.
- Sulistyaningdyah WT, J Ogawa, H Tanaka, C Maeda, S Shimizu** (2004) Characterization of alkaliphilic Laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. *FEMS Microbiol Lett* 230: 209-214.
- Tetsch, L,** (2005) Laccasen und Laccasegene des acidophilen Ascomyceten *Hortaea acidophila*, Dissertation, Universität Bonn.
- Thiele S, E Fernandes, JM Bollag** (2002) Enzymatic transformation and binding of labeled 2,4,6-trinitrotoluene to humic substances during an anaerobic/aerobic incubation. *J Environ Qual* 31(2):437-44.
- Thurston, CF** (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19-26.
- Turner, EM, M Wright, T Ward, DJ Osborne, R Self** (1975) Production of ethylene and other volatiles and changes in cellulase and laccase activities during the life cycle of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol* 91(1):167-76.
- Ullrich, R, M Huong le, NL Dung, M Hofrichter** (2005) Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 67(3):357-63.
- Valderrama, B, P Oliver, A Medrano-Soto, R Vazquez-Duhalt.** (2003) Evolutionary and structural diversity of fungal laccases. *Antonie van Leeuwenhoek*.
- van Duin, D, A Casadevall, JD Nosanchuk** (2002) Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* 46(11):3394-400.
- Wahleithner JA, F Xu, KM Brown, SH Brown, EJ Golightly, T Halkier, S Kauppinen, A Pederson, P Schneider.** (1996) The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* 29 (4):395-403.
- Wessel, D, UJ Flügge,** (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138: 411-413.
- White-Stevens, RH** (1982) Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. I. Reversible indicators and the effects of copper, iron, and mercury. *Clin Chem* 26 (4):578-588.
- Williamson, PR** (1994) Biochemical and molecular characterization of the diphenol oxidase of *Cryptococcus neoformans*: identification as a laccase. *J Bacteriol* 176(3):656-664

- Williamson, PR** (1997) Laccase and Melanin in the Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Bioscience* 2:99-107.
- Xiao, YZ, XM Tu, J Wang, M Zhang, Q Cheng, WY Zeng, YY Shi** (2003) Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Appl Microbiol Biotechnol* 60(6):700-7.
- Xu, F** (1996) Oxidation of phenols, anilines, benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35(23): 7608-7614.
- Yang, LL, A Haug** (1979) Purification and partial characterization of a prokaryotic glycoprotein from the plasma membrane of *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim Biophys Acta* 556: 265-277.
- Yaver, DM, F Xu, B Nelson, K Brown, T Halkier; S Bernauer, S Brown, S Kauppinen** (1999) Molecular Characterization of Laccase Genes from the Basidiomycete *Coprinus cinereus* and Heterologous Expression of the Laccase Lcc1. *Appl Environ Microbiol* 65(11): 4943-4948.
- Yoshida, H** (1883) Chemistry of Lacquer (Urushi) *J Chem Soc* 43: 472-486.
- Zhu, X, J Gibbons, J Garcia-Rivera, A Casadevall, and PR Williamson.** (2001) Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun* 69 (9):5589-5596.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

#### 7.1.1 Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis 3-ethylbenzthiazolin-Schwefelsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua demin.	Demineralisiertes Wasser
BCIP	5-Bromo, 4-Chloro,3-Indoylphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CAPS	3-Cyclohexylamino-1-Propansulfonsäure
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]1-Propansulfonat
DAN	Diaminonaphthalin
DEAE	Diethylaminoethyl
DHN	Dihydroxynaphthalin
DMOP	2,6-Dimethoxyphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo H	Endoglykosidase H
FDA	Fluoresceindiacetat
FPLC	Niedrigdruckflüssigchromatographie
g	Erdbeschleunigung
GFP	Green Fluorescent Protein
HPA	Hide Powder Azur
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
kDa	kilo-Dalton
l	Liter
L-DOPA	Dihydroxyphenylalanin
M	mol/ Liter

mA	milli-Ampere
mg	Milligramm
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda (USA)
ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAK	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PDA	Kartoffel-Glukose-Agar
PES	Polyethersulfon
pI	Isoelektrischer Punkt
PU	Polyurethan
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TFMS	Trifluormethansulfonsäure
THN	Tetrahydroxynaphthalin
TNT	Trinitrotoluol
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
V	Volt
Vh	Voltstunden
YBB	Yeast Breakage Buffer (Aufschlusspuffer)
ZBA	Zentrale Bioanalytik Köln
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>

### 7.1.2 Bezeichnungen für Laccasen und Laccasegene aus *H. acidophila*:

L (55)	zellossoziierte Laccase, 55 kDa
L (70)	freie extrazelluläre Laccase, 70 kDa
L (85)	intrazelluläre Laccase, 85 kDa
<i>lacc1</i>	Laccasegen 1 (Tetsch, 2005)
<i>lacc2</i>	Laccasegen 2 (Tetsch, 2005)
Lacc1	hypothetisches Genprodukt von <i>lacc1</i> (Tetsch, 2005)
Lacc2	hypothetisches Genprodukt von <i>lacc2</i> (Tetsch, 2005)

### 7.1.3 Aminosäuren

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	F	Phenylalanin
D	Aspartat	P	Prolin
C	Cystein	S	Serin
E	Glutamat	T	Threonin
Q	Glutamin	W	Tryptophan
G	Glycin	Y	Tyrosin
H	Histidin	V	Valin
I	Isoleucin	M	Methionin

## **7.2 Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Milan Höfer für die Übernahme des Referates dieser Arbeit, die Überlassung des Arbeitsplatzes und die fachliche Unterstützung bei wissenschaftlichen Veröffentlichungen und Tagungsbeiträgen danken.

Herrn Prof. Dr. Erwin Galinski danke ich für die Übernahme des Koreferates und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Für die Überlassung des Themas, die Sicherstellung der Finanzierung, seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders Herrn Dr. Udo Hölker danken.

Frau Dipl. Biol. Larissa Tetsch danke ich besonders herzlich für die konstruktive Zusammenarbeit, den gegenseitigen Austausch und das Korrekturlesen meiner Arbeit: Danke für eine schöne, wenn auch nicht immer leichte Zeit.

Danken möchte ich auch Frau PD Gerhild van Echten-Deckert und Herrn Prof. Dr. Arnold Schwartz für ihre Bereitschaft an der Prüfungskommission mitzuwirken. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Arnold Schwartz, der viele hilfreiche Hinweise zu meiner Arbeit gegeben hat.

Herrn Dr. H.P. Call danke ich für die Bereitstellung seiner Laborausstattung und seine Unterstützung bei den Kultivierungsversuchen. Herrn Dipl. Biol. Rolf Pracht danke ich für die Zusammenarbeit bei der Feststofffermentation.

Für die stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit danke ich den Mitarbeitern des IZMB und der HöFer Bioreact GmbH, insbesondere Herrn Prof. Dr. Volker Knoop, PD Dr. Jost Ludwig, Dr. Martina Janssen, Frau Dipl. Chem. Monika Polsakiewicz, Herrn Dipl. Biol. Sven Ludwig, Frau Dipl. Biol. Friederike Manger-Jacob, Frau Dipl. Biol. Petra Schwanewilm und Frau Dipl. Biol. Sarah Schwarzer.

Für die Bereitstellung des laccasespezifischen Antikörpers aus *Melanocarpus albomyces* danke ich Frau Dr. Laura-Leena Kiiskinen. Dr. Eckhard Thines möchte ich für die Überlassung des Melaninsynthesehemmstoffs Tricyclazol danken.



Der Deutschen Bank in Bonn-Beuel danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der gedruckten Ausgabe dieser Arbeit.

Persönlich danken möchte ich meinen Eltern Hildegard Dohse und Dr. Wolf Dohse, die durch ihr Interesse und ihre bedingungslose Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben. Schließlich gilt mein besonderer Dank meinem Mann Axel, der mir durch alle Phasen dieser Arbeit hindurch beigestanden hat. Ich danke ihm für seine Geduld, seine unermüdlichen Unternehmungen zur Stärkung meines Selbstvertrauens und nicht zuletzt für die Unterstützung beim Layout dieser Arbeit.

**LEBENS LAUF  
AUS  
DATENSCHUTZRECHTLICHEN  
GRÜNDEN  
ENTFERNT**

## 7.4 Wissenschaftliche Veröffentlichungen

**Holker U, Dohse J, Hofer M. (2002)** Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiol (Praha)*; 47(4):423-7.

**Holker U, Bend J, Pracht R, Tetsch L, Muller T, Hofer M, de Hoog GS. (2004)** *Hortaea acidophila*, a new acid-tolerant black yeast from lignite. *Antonie Van Leeuwenhoek*; 86(4):287-94.

**Tetsch L, Bend J, Janssen M, Holker U. (2005)** Evidence for functional laccases in the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila* and isolation of laccase-specific gene fragments. *FEMS Microbiol Lett.*; 245(1):161-8.

**Pokorny R, Vargovic P, Hölker U, Janssen M, Bend J, Hudecova D, Varecka L. (2005)** Developmental changes in *Trichoderma viride* enzymes abundant in conidia and the light-induced conidiation signalling pathway. *J. Basic Microbiol.* 45(3): 219–229.

**Pokorny R, Olejnikova P, Balog M, Zifcak P, Holker U, Janssen M, Bend J, Hofer M, Holiencin R, Hudecova D, Varecka L. (2005)** Characterization of microorganisms isolated from lignite excavated from the Zahorie coal mine (southwestern Slovakia). *Res Microbiol.* 2005 Aug 4; [Epub ahead of print].

**Bend, J., Tetsch, L., Hölker, U.** Laccase production by the black yeast *Hortaea acidophila*: Evidence for optimal catalytic activity at low pH-values, in Vorbereitung.

Poster:

**Bend, J., Tetsch, L., Pracht, R., Höfer, M., Hölker, U. (2003)** Isolation and physiological characterization of the new, acidophilic black yeast dH 11932, VAAM<sup>1</sup> Jahrestagung 2003, Berlin.

**Tetsch, L., Bend, J., Pracht, R., Höfer, M., Hölker, U. (2003)** Characterization of a laccase from an acidophilic black yeast participating in the synthesis of melanin, VAAM Jahrestagung 2003, Berlin.

**Bend, J., Hölker, U. (2003)** Laccases in melanized fungi, VAAM Symposium Molekularbiologie der Pilze 2003, Göttingen.

**Bend, J., Hölker, U., (2004)** *Hortaea acidophila*: Development of optimal culture conditions for laccase production, VAAM Jahrestagung 2004, Braunschweig.

**Bend, J., Hölker, U., (2004)** Partial Purification of acidic laccases of *Hortaea acidophila*, VAAM Symposium Stoffwechsel der Pilze 2004, Senftenberg.

**Bend, J., Hölker, U. (2005)** Intracellular laccases from the acidophilic black yeast *Hortaea acidophila*, VAAM Symposium Molekularbiologie der Pilze 2005, Bochum.

---

<sup>1</sup> VAAM = Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie

## ***Erklärung***

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Bonn, im November 2005

Jutta Bend